

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL E  
DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA DE GENES  
CANDIDATOS EM PACIENTES PORTADORES DE  
MUTAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE *TP53***

**FERNANDA PASCHOAL FORTES**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do título de Mestre  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra Maria Isabel Alves de Souza  
Waddington Achatz**

**Co-Orientadora: Dra Silvia Regina Rogatto**

**São Paulo**

**2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Fortes, Fernanda Paschoal

**Análise do perfil de expressão gênica global e do padrão de metilação do DNA de genes candidatos em pacientes portadores de mutações germinativas no gene *TP53*** / Fernanda Paschoal Fortes – São Paulo, 2014.

109p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz

Descritores: 1. METILAÇÃO DE DNA. 2. EXPRESSÃO GÊNICA. 3. GENES TP53. 4. CARCINOMA ADRENOCORTICAL. 5. SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

“ Sempre parece impossível  
até que seja feito”

Nelson Mandela  
(1918 - 2013)

## DEDICATÓRIA

*À Hellen Kuasne pela amizade e pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de fraqueza e incerteza, que são muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.*

*Aos meus pais Cesar (in memoriam) e Creuza, que dignamente me apresentaram à importância da família e o caminho da honestidade e persistência.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** pela família e pela vida que tem sido repleta de alegrias e grandes oportunidades.

Agradeço à **Dra Maria Isabel Achatz**, por me aceitar em seu grupo, pela orientação desse trabalho, pela paciência, dedicação e carinho ao longo dos anos em que trabalhamos juntas. Obrigada por me ajudar com seus ensinamentos e por sempre me mostrar que eu conseguiria vencer esta etapa da minha vida.

Agradeço à **Dra Silvia Rogatto** pela prontidão, boa vontade e compreensão. Obrigada por ter me acolhido em seu grupo, por todo o carinho, tempo despendido com o meu trabalho e por todas as oportunidades, não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim.

À todos os **pacientes** que participaram desse estudo. Sendo que a busca do conhecimento sempre terá como objetivo principal a tentativa de beneficiar o maior número de pessoas possível.

Agradeço de forma especial a **Hellen** (Ré), palavras não seriam suficientes, um anjo que Deus colocou na minha vida. Amiga, irmã, professora e orientadora tanto na parte profissional quanto na pessoal. Uma pessoa que não me deixou desistir quando eu estive muito próximo disso e que sempre me deu forças. Obrigada pela sua paciência em me ensinar, pela sua dedicação e principalmente por acreditar e me convencer de que eu era capaz. Muito obrigada! E o rim está aqui!!!

Agradeço muito ao meu **Bro Fabio**, por toda a ajuda, paciência, boa vontade e amizade. Jamais me esquecerei da parceria nos dias mais peculiares. Foi LEGEN...*wait for it*...DARY!!!

Agradeço à minha mãe **Creuza**, que é o poder que me levanta e a força que não me deixa cair, muito obrigada, principalmente por se preocupar tanto com a minha formação e com a pessoa que eu sou. TE AMO!

Ao meu pai **Cesar**, que sempre me apoiou em tudo e sempre esteve presente na minha vida, tenho a certeza que nunca será diferente. TE AMO MUITO! Saudades eternas.

Ao meu irmão, **Jota** e a **Dani** que me presentearam com o sobrinho mais lindo do mundo, dono de um sorriso que recarraga minhas energias e opera milagres em mim. Se não fosse o **Cesar** talvez eu não estivesse aqui. AMO VOCÊS!!!

Agradeço à todos que foram e que são da **equipe da Oncogenética** (Amanda, Andreia, Juliana, Karina, Kelvin, Lisley, Marina, Dra Rima Jbili e Dra Nirvana) obrigada pela recepção no grupo e por todos os momentos.

Agradeço em especial à **Lisley**, que sempre esteve ao meu lado, me ajudando com todas as adversidades da vida. Uma amizade para sempre.

Agradeço à **Karina**, por todas as canções, e por todos os momentos divertidos compartilhados nesses anos de convivência.

Agradeço a todo o **grupo NeoGene** (André, Caroline, Fabiana, Fábio, Graziela, Hellen, Juan, Luisa, Maísa, Mariana, Mateus, Marco, Priscila, Tatiane e Sara) por toda ajuda, por tudo que me ensinaram e pelos incontáveis momentos de descontração.

Agradeço a todos que *characterized e contribute* comigo esses anos, pelas risadas e lágrimas compartilhadas, pela amizade, apoio, força e momentos maravilhosos, obrigada por fazerem a minha vida uma doce alegria: **Bruna Roz, Cecília, Deborah, Fabio, Fidalgo, Graziela, Hellen,**

**Iara, Juliana Laino, Juliana Rocha, Júlia, Maísa, Mário Sérgio (Roberto), Pri, Rogério, Ton e Vanessa.**

Agradeço à **Graziela Spilborghs**, simplesmente por estar sempre ao meu lado. Grá a gente vive junto, a gente se dá bem!!! E isso será pra sempre!!!!

Agradeço à **Pri**, por todas as consultorias farmacológicas, por todo o apoio, companheirismo e ajuda. Sua amizade me faz muito bem.

Agradeço ao **Dr. Antonio Hugo Campos**, ao **Departamento Patologia**, às meninas do **Biobanco (Ana Paula, Eloisa e Louise)**, aos **pesquisadores e funcionários do CIPE**, à **Biblioteca** e à **Pós-Graduação**.

Ao **CNPq** e ao **INCITO**, pelo suporte financeiro.

## RESUMO

Fortes FP. **Análise do perfil de expressão gênica global e do padrão de metilação do DNA de genes candidatos em pacientes portadores de mutações germinativas no gene *TP53***. São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

A Síndrome de Li Fraumeni (LFS) é uma síndrome rara autossômica dominante de câncer hereditário. No Brasil, uma forma variante da LFS, é frequente devido à ocorrência de uma mutação fundadora p.R337H *TP53*. A ocorrência de câncer e a idade de acometimento são variáveis mesmo em portadores da mesma mutação. Pacientes com mutações no gene *TP53* podem desenvolver amplo espectro tumoral, incluindo carcinomas adrenocorticais (ADR). Vários mecanismos podem estar envolvidos nesta variabilidade, tais como alterações genéticas e epigenéticas em genes envolvidos na carcinogênese. Entretanto, tais eventos ainda não foram esclarecidos. Além disso, é bem estabelecido que a proteína p53 regula diversas vias, incluindo a via da TDG. A TDG é uma timina DNA glicosilase importante na regulação dos níveis de metilação do DNA de diversos genes. O primeiro objetivo deste estudo foi identificar o padrão de metilação do DNA dos genes potencialmente relacionados com a via da TDG (*CDKN2A*, *FOXA1*, *HOXD8*, *JUN*, *NKX2-2*, *OCT4*, *SOX2* e *SOX17*) em pacientes portadores de mutações germinativas no gene *TP53* e controles, além de verificar os níveis de expressão da TDG em carcinomas adrenocorticais (ADR) de pacientes portadores e não portadores da mutação p.R337H *TP53*. O segundo objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de expressão gênica global em ADR de pacientes portadores e não portadores da mutação p.R337H *TP53*. O padrão de metilação dos genes foi avaliado por pirosequenciamento e os níveis de expressão da TDG foram avaliados por RT-qPCR e a análise de expressão gênica global foi avaliada pela técnica de *microarray* (4x44K, *Agilent Technologies*). A análise de metilação dos

genes associados à via TDG, não revelou diferença estatisticamente significativa nas amostras de DNA de sangue periférico. Entretanto foi identificado um aumento dos níveis de expressão da TDG nos ADR positivos para a mutação p.R337H. Foram identificados 135 genes diferencialmente expressos na comparação entre ADR de pacientes com e sem a mutação p.R337H *TP53*. Genes que tem expressão aumentada e que são relacionados a um pior prognóstico em carcinomas adrenocorticais foram identificados com expressão diminuída nos portadores da mutação p.R337H. Concluímos com esse estudo que aparentemente a TDG não exerce papel na regulação da metilação dos genes candidatos avaliados. Este estudo revelou um perfil diferencial de expressão de transcritos nos ADR em portadores da mutação germinativa p.R337H *TP53* sugerindo que a presença da mutação p.R337H possa exercer um efeito protetor nos pacientes porém está hipótese deverá ser confirmada em estudos conduzidos em um grupo amostral maior.

## SUMMARY

Fortes FP. **[Analysis of global gene expression and DNA methylation pattern of candidate genes in patients with germline mutations in *TP53* gene]**. Sao Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Li Fraumeni Syndrome (LFS) is a rare autosomal dominant hereditary cancer syndrome. In Brazil, a variant form of LFS is often due to a founder mutation p.R337H *TP53*. The occurrence of cancer in patients and the age of onset may vary even in patients who carry the same mutation. Patients with mutations in *TP53* gene may develop a broad spectrum of tumors, including adrenocortical carcinomas (ADR). Several mechanisms may be involved in this variability, such as genetic and epigenetic alterations in genes involved in carcinogenesis. However, such events have not been clarified. Furthermore, it is well established that p53 regulates several pathways, including TDG pathway. TDG is a thymine DNA glycosylase that regulates DNA methylation levels of various genes. The first aim of this study was to identify the pattern of DNA methylation of genes potentially related to the TDG pathway (*CDKN2A*, *FOXA1*, *HOXD8*, *JUN*, *NKX2-2*, *OCT4*, *SOX2* and *SOX17*) in patients with germline mutations in *TP53* gene and controls, and to check the expression levels of TDG in ADR patients with and without p.R337H *TP53* mutation. The second objective of this study was to evaluate the global gene expression profile of ADR in patients with and without p.R337H *TP53* mutation. The gene methylation pattern was assessed by pyrosequencing and TDG expression levels were assessed by RT-qPCR. Analysis of global gene expression was evaluated by microarray (4x44K, Agilent Technologies). The analysis of methylation-associated genes via TDG revealed no statistically significant difference in DNA samples from peripheral blood. However it was identified an increased expression level of TDG in ADR p.R337H mutation carrier. The presence of 135 differentially

expressed genes between the ADR patients with and without p.R337H *TP53* mutation was detected. Genes which have increased expression and are related to a worse prognosis in adrenocortical carcinoma were identified with decreased expression in carriers of p.R337H mutation. This study concluded that TDG apparently does not play a role in regulating the methylation of evaluated candidate genes. Furthermore, a differential expression profile of transcripts in ADR p.R337H *TP53* germline mutation carriers was revealed, suggesting that the presence of p.R337H mutation appears to exert a protective effect in patients with ADR. However, this hypothesis should be confirmed in studies conducted on a larger sample.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Distribuições das mutações germinativas do gene <i>TP53</i> de acordo com o códon.....	4
<b>Figura 2</b>	Esquema representativo dos diferentes domínios da proteína p53.....	5
<b>Figura 3</b>	Rede gênica indicando as interações entre os genes da via <i>TDG/TP53</i> .....	25
<b>Figura 4</b>	Produto da PCR após eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando que o DNA foi convertido completamente após tratamento com bissulfito de sódio.....	27
<b>Figura 5</b>	Demonstração do processo enzimático da reação de pirosequenciamento.....	33
<b>Figura 6</b>	Pirograma do controle 100% metilado e 0% metilado. A ordem de dispensação é referente ao gene <i>HOXD8</i> .....	35
<b>Figura 7</b>	Resultados esperados para a análise da presença da p.R337H	39
<b>Figura 8</b>	Dot Plots representando os níveis de metilação dos genes candidatos <i>CDKN2A</i> , <i>FOXA1</i> , <i>HOXD8</i> , <i>JUN</i> , <i>NKX2-2</i> , <i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> e <i>SOX17</i> e região controle ALUYb8 nos grupos G1 a G5	47
<b>Figura 9</b>	Níveis de expressão da <i>TDG</i> em carcinomas adrenocorticais positivos e negativos para a mutação p.R337H.....	48
<b>Figura 10</b>	Agrupamento hierárquico supervisionado dos 11 casos de carcinomas adrenocorticais.....	50

<b>Figura 11</b>	Biofunções correlacionando com os genes diferencialmente expressos com média dos valores das sondas para cada gene.	54
<b>Figura 12</b>	Redes gênicas (1 e 4) representando as interações entre os principais genes alterados na comparação entre tumores com e sem a mutação p.R337H.....	56
<b>Figura 13</b>	Genes com alterações na expressão em cada uma das vias obtidas pelo programa Ingenuity Pathways Analysis.....	57
<b>Figura 14</b>	Genes com baixa expressão (em verde) nas amostras positivas para a mutação p.R337H e preditos de serem regulados pela alfa catenina.....	58
<b>Figura 15</b>	Vias canônicas correlacionando os genes diferencialmente expressos com média dos valores das sondas para cada gene.	64
<b>Figura 16</b>	Redes gênicas A e B (2 e 12) representando as interações entre os principais genes alterados na comparação entre carcinomas adrenocorticais e adrenal normal.....	66
<b>Figura 17</b>	Genes com baixa expressão (em verde) nas amostras tumorais e preditos de serem regulados pelo gene <i>TGFβ3</i> .....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Vinte genes diferencialmente expressos e que apresentaram os maiores <i>fold-change</i> obtidos da análise supervisionada de pacientes com carcinoma adrenocortical portadores e não portadores da mutação p.R337H.....	52
<b>Tabela 2</b>	Vinte genes diferencialmente expressos e que apresentaram os maiores fold-change obtidos da análise supervisionada de pacientes com carcinoma adrenocortical e pool de amostras normais de glândula de adrenal.....	59
<b>Tabela 3</b>	Genes identificados em cinco ou mais estudos da meta-análise.....	63

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Critérios para diagnóstico da Síndrome de Li-Fraumeni.....	2
<b>Quadro 2</b>	Estudos publicados em literatura que descreveram o perfil de expressão gênica em larga escala em tumores adrenocorticais.....	16
<b>Quadro 3</b>	Características clínicas e biológicas dos pacientes portadores de LFS/LFL.....	22
<b>Quadro 4</b>	Características dos 11 pacientes com carcinomas adrenocorticais.....	23
<b>Quadro 5</b>	Sequência dos iniciadores e as propriedades dos genes avaliados por pirosequenciamento.....	28
<b>Quadro 6</b>	Sequência dos ensaios e as propriedades dos genes avaliados por pirosequenciamento.....	29
<b>Quadro 7</b>	Lista de iniciadores utilizados para os genes alvos e endógenos.....	37
<b>Quadro 8</b>	Características clínicas e biológicas dos pacientes com carcinoma adrenocortical.....	61

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>5mC</b>	5 metil citosina
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ADR</b>	Adrenocortical
<b>ATP</b>	Adenosina Trisfosfato
<b>C</b>	Citosina
<b>cDNA*</b>	Complementary DNA
<b>CpG</b>	Citosina-fosfato-Guanina
<b>cRNA*</b>	Complementary RNA
<b>Ct*</b>	Cycle Threshold
<b>Cy*</b>	Cyanine
<b>DNA*</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>dNTP*</b>	Deoxynucleotide Triphosphates
<b>DTT*</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA*</b>	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
<b>FDR*</b>	False Discovery Rate
<b>G</b>	Guanina
<b>GEO*</b>	Gene Expression Omnibus
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IPA*</b>	Ingenuity Pathways Analysis
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>LFL*</b>	Li-Fraumeni-like
<b>LFS*</b>	Li-Fraumeni syndrome
<b>Log</b>	Logaritmo
<b>LOH*</b>	Loss of heterozygosity
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>miRNA*</b>	microRNA
<b>NA*</b>	Not Available
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio

<b>pb</b>	pares de base
<b>PCR*</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PPi</b>	Pirofosfato
<b>PPI</b>	Interação proteína-proteína
<b>RNA*</b>	Ribonucleic Acid
<b>RT-qPCR*</b>	Reverse Transcription – qPCR
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>T</b>	Timina
<b>TBE</b>	Tris-Borato-EDTA
<b>TDG*</b>	Timidina DNA Glicosilase
<b>TP53*</b>	Tumor Protein p53
<b>UBC</b>	Ubiquitina C

\*siglas ou abreviaturas derivadas do inglês

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	A Síndrome de Li Fraumeni.....	1
1.2	A Síndrome de Li-Fraumeni e a mutação p.R337H.....	4
1.3	A associação entre <i>TP53</i> , <i>TDG</i> e metilação do DNA .....	8
1.4	O processo de metilação do DNA .....	11
1.5	Análise da expressão gênica em larga escala em carcinomas adrenocorticais de pacientes portadores da Síndrome de Li-Fraumeni	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos .....	18
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1	Casuística.....	20
3.1.1	Comparação do padrão de metilação do DNA da região promotora dos genes relacionados a via da <i>TDG</i> .....	21
3.1.2	Avaliação do perfil global de expressão gênica em pacientes com carcinoma adrenocortical.....	23
3.2	Métodos.....	24
3.2.1	Extração de ácidos nucleicos (DNA e RNA).....	24
3.2.2	Seleção dos genes candidatos para avaliação dos níveis de metilação do DNA .....	24
3.2.3	Tratamento das amostras com bissulfito de sódio.....	26
3.2.4	Pirosequenciamento para a investigação das ilhas CpGs metiladas ....	27
3.2.5	Síntese de cDNA e análise da expressão de transcritos (RT-qPCR)....	35
3.2.6	Investigação da mutação germinativa <i>TP53</i> p.R337H em pacientes portadores de carcinomas adrenocorticais.....	37
3.2.7	Sequenciamento de Sanger .....	39
3.2.8	Perfil de expressão gênica global.....	41

3.2.9	Análise estatística (pirosequenciamento e RT-qPCR).....	44
3.2.10	Meta-análise .....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.1	Análise do padrão de metilação do DNA de genes candidatos em sangue periférico por pirosequenciamento.....	45
4.2	Avaliação dos níveis de expressão da <i>TDG</i> por RT-qPCR em carcinomas adrenocorticais .....	48
4.3	Expressão gênica global pela técnica de <i>microarray</i> em amostras de carcinomas adrenocorticais .....	49
4.3.1	Análise comparativa entre pacientes positivos e negativos para a mutação p.R337H.....	50
4.3.2	Análise comparativa entre carcinomas adrenocorticais e <i>pool</i> de amostras normais da glândula adrenal.....	59
4.3.3	Meta-análise.....	62
4.3.4	Comparação dos dados deste estudo e da meta-análise .....	64
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>
	<b>ANEXOS</b>	
<b>Anexo 1</b>	Figuras dos genes candidatos avaliados e suas respectivas ilhas CpGs.	
<b>Anexo 2</b>	Foto dos géis de agarose 1% obtidos no produto das PCRs específicas para cada gene. M: Marcador de peso molecular Ladder 1kb plus ou Ladder 100 pb. CN: Controle negativo.	
<b>Anexo 3</b>	<i>Heatmap</i> mostrando as alterações nos níveis de expressão gênica de quatro carcinomas adrenocorticais positivos para a mutação p.R337H e sete carcinomas	

negativos para a mutação. Horizontalmente estão representados os 135 genes alterados.

**Anexo 4** Tabela com todos os genes identificados como diferencialmente expresso na análise de pacientes com carcinomas adrenocorticais com e sem a mutação p.R337H.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS, OMIM #151623) é caracterizada pela predisposição hereditária ao câncer, alto risco de desenvolvimento de tumores em idade precoce e a múltiplos tumores primários devido à inativação do gene *TP53* (MALKIN et al. 1990; ACHATZ et al. 2007; MARCEL et al. 2009; PALMERO et al. 2010). Os tumores mais frequentemente associados à LFS são os de mama, carcinoma adrenocortical (ADR), sarcoma de partes moles, osteossarcoma e tumor do sistema nervoso central (SNC).

Estima-se que pacientes com LFS apresentem 50% de chance de desenvolver tumores antes dos 30 anos de idade (MALKIN et al.1990; BIRCH et al. 2001). Evidências em literatura indicam que indivíduos portadores desta síndrome e que desenvolveram algum tumor na infância sejam mais predispostos à ocorrência de múltiplos tumores primários (HISADA et al. 1998).

O diagnóstico clínico da síndrome foi inicialmente descrito por LI e FRAUMENI (1969). Pacientes que apresentam tumores característicos da LFS, mas que não preenchem o critério clássico típico da síndrome, são denominados como portadores da síndrome de Li-Fraumeni-*like* (LFL) (EELES 1995). Atualmente, o diagnóstico clínico na determinação da LFS e

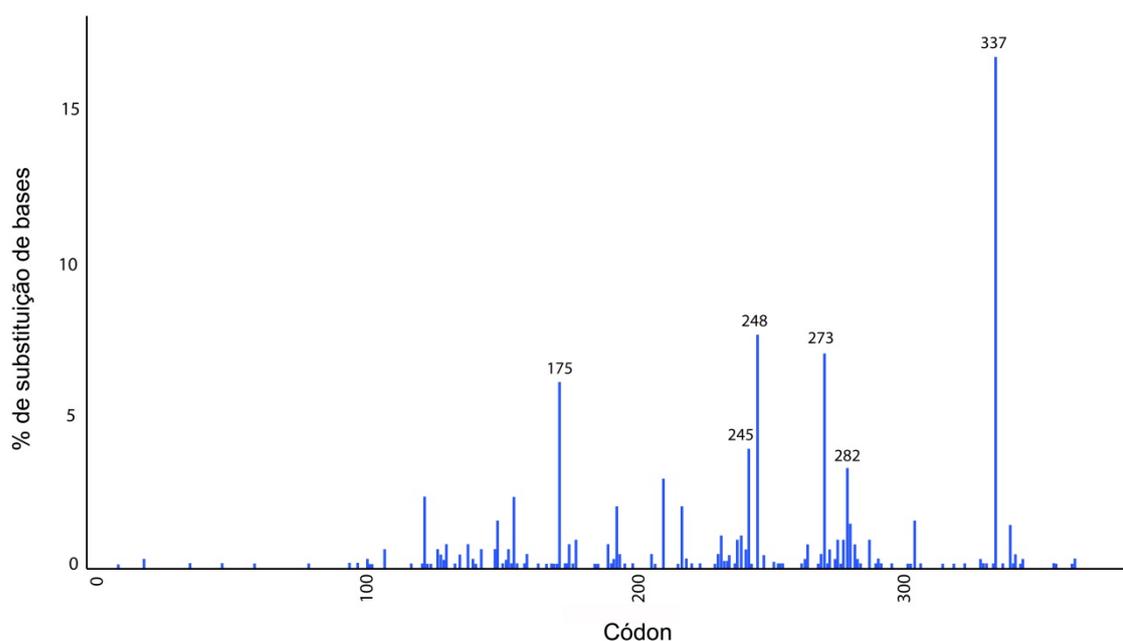
da LFL são os mesmos propostos por LI e FRAUMENI em 1969 e os critérios de Birch, Eeles e Chompret (BIRCH et al. 1994; EELES 1995; BOUGEARD et al. 2008) (Quadro 1). O critério de Chompret é considerado o de maior utilidade clínica. Foi estimado que a sensibilidade e a especificidade desse critério são de 82% e 58%, respectivamente (TINAT et al. 2009).

**Quadro 1** - Critérios para diagnóstico da Síndrome de Li-Fraumeni.

<b>Clássico Li e Fraumeni</b>	Sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos) e familiar de 1º grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e familiar de 1º ou 2º grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade.
<b>Variante Birch</b>	Câncer na infância ou sarcoma, SNC ou ADR antes dos 45 anos e familiar de 1º ou 2º grau com câncer típico da síndrome de Li- Fraumeni em qualquer idade e familiar de 1º ou 2º grau com qualquer câncer antes dos 60 anos de idade.
<b>Eeles</b>	<b>LFL- E1</b> - Presença de dois familiares de 1º ou 2º grau com tumor típico em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama, tumor SNC, leucemia, ADR, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático) <b>LFL- E2</b> - Sarcoma em qualquer idade no paciente índice com dois dos seguintes tumores (podendo estar presentes no mesmo indivíduo): câncer de mama (pacientes com idade inferior à 50 anos) e/ou tumor SNC, leucemia, ADR, melanoma, câncer de próstata e pâncreas (pacientes com idade inferior à 60 anos) ou sarcoma em qualquer idade.
<b>Chompret</b>	Sarcoma, SNC, ADR ou câncer de mama antes dos 36 anos e familiar de 1º ou 2º grau com câncer antes dos 46 anos ou familiar com múltiplos tumores primários em qualquer idade. Múltiplos tumores, incluindo dois que sejam do tipo sarcoma, ADR, mama ou SNC com o primeiro tumor diagnosticado antes dos 36 anos, independente da história familiar, ou ADR em qualquer idade independente da história familiar.
<b>Chompret Modificado</b>	Paciente índice com câncer típico da síndrome de Li- Fraumeni antes dos 46 anos e familiar de 1º ou 2º grau com câncer típico da Síndrome de Li- Fraumeni antes dos 56 anos (exceto câncer de mama, caso o probando tenha câncer de mama) ou múltiplos tumores. Paciente índice com múltiplos tumores, sendo pelo menos dois do espectro da LFS e o primeiro antes dos 46 anos ou ADR em qualquer idade ou câncer de mama antes dos 36 anos sem mutação nos genes BRCA1 ou 2.

A LFS/LFL tem caráter autossômico dominante. As mutações germinativas no gene *TP53* foram reconhecidas como o principal mecanismo molecular responsável pela síndrome (FREBOURG et al. 1991). O gene *TP53*, um dos principais supressores de tumor, codifica uma fosfoproteína nuclear que atua como um fator de transcrição ativado em resposta a diversas formas de estresse celular e que exerce funções anti-proliferativas (PETITJEAN et al. 2007; APARICIO e EAVES 2009; DEY et al. 2010; FENG et al. 2011; GAMBINO et al. 2013). A proteína p53 possui diversos papéis, como por exemplo, a supressão da replicação do DNA e da proliferação celular em resposta a danos ao DNA. Neste último caso, a p53 é ativada e pode induzir a parada do ciclo celular, permitindo que ocorra o reparo antes que a célula reinicie o ciclo celular. Em situações nas quais o dano ao DNA não é passível de correção, a p53 pode induzir à apoptose, evitando a propagação deste dano ou a disfunção celular (LANE 1992; CICALESE et al. 2009; FENG et al. 2011).

As mutações do *TP53* são encontradas em mais de 50% dos tumores (LATRONICO et al. 2001). Além disso, indivíduos que herdaram uma mutação germinativa em *TP53* apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de tumores na infância (MALKIN et al. 1990). As mutações germinativas do *TP53* tendem a ocorrer predominantemente no domínio central de ligação ao DNA, codificado pelos éxons 5 a 8 e ainda nos éxons 4 e 9 (OLIVIER et al. 2003). As mutações germinativas do gene *TP53* de acordo com o códon estão representadas na Figura 1.

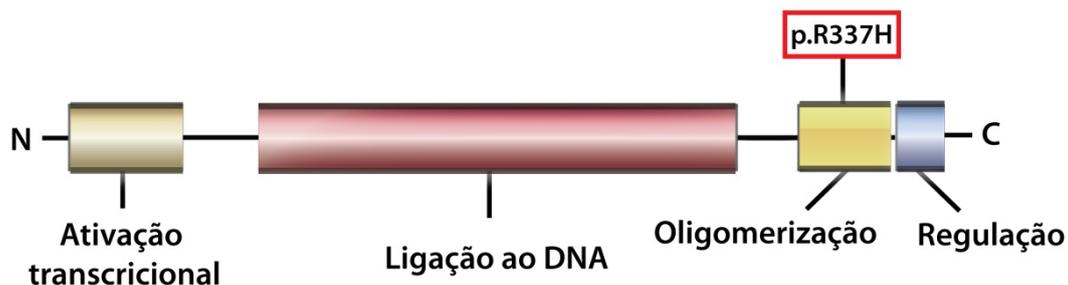


Fonte: PETITJEAN et al. (2007)

**Figura 1** - Distribuição das mutações germinativas do gene *TP53* de acordo com o códon (n=636)

## 1.2 A SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E A MUTAÇÃO p.R337H

No Brasil, uma forma variante da LFS é frequente devido à ocorrência de uma mutação fundadora, que corresponde à troca de uma arginina por uma histidina no códon 337, denominada p.R337H. O códon 337 está localizado no éxon 10 do gene *TP53*, dentro do domínio de oligomerização (DI GIAMMARINO et al. 2002) (Figura 2).



**Figura 2** - Esquema representativo dos diferentes domínios da proteína p53 (representação sem escala). A p.R337H encontra-se fora do *hot spot* de mutações (domínio de ligação ao DNA).

Em 1999, a mutação p.R337H do gene *TP53* foi descrita pela primeira vez em um paciente pediátrico com carcinoma adrenocortical (ADR) (VARLEY et al.1999). Em 2001, RIBEIRO et al. identificaram a presença da mutação germinativa p.R337H em 35 dentre 36 crianças com ADR provenientes de 28 famílias da periferia de Curitiba. Neste estudo, os autores relataram não haver aumento do número de casos de câncer na família dos indivíduos portadores desta mutação. No entanto, descrevem a ocorrência de casos de câncer de mama, leucemia e câncer colorretal em parentes de primeiro e segundo grau. A partir deste estudo, ficou caracterizada uma forte associação entre a mutação germinativa p.R337H no gene *TP53* e o alto risco para o desenvolvimento de carcinomas adrenocorticais em crianças da região sul do Brasil (RIBEIRO et al. 2001).

O acúmulo excessivo da proteína p53 no núcleo da célula tumoral do córtex da adrenal, no qual ocorre alto índice de remodelamento tecidual no período neonatal e em crianças, corroborou inicialmente para a hipótese proposta por RIBEIRO et al. (2001), que propunham que essa mutação fosse tecido-específica. Entretanto, os portadores da mutação p.R337H

podem desenvolver todo o espectro de tumores característicos da LFS. Essa diversidade fenotípica, apesar da herança da mesma mutação, sugere que outras variações somáticas ou germinativas podem ter um papel importante na caracterização do tipo de tumor além da idade e risco de desenvolvimento.

A mutação p.R337H foi inicialmente avaliada em estudo conduzido por KATO et al. (2003). Neste estudo, a alteração *missense* foi considerada patogênica em ensaio de transativação de levedura (KATO et al. 2003). Posteriormente, foram realizados estudos bioquímicos e estruturais para avaliar o efeito mutagênico da proteína frente a ocorrência da alteração p.R337H. Foi verificado que a p.R337H formava oligômeros somente se houvesse condições de pH específicas (DI GIAMMARINO et al. 2002). A ocorrência de pH intracelular alcalino (acima de 7,0) e/ou temperatura acima de 36,5°C resulta na perda da função da p53, alterando as propriedades funcionais da proteína de forma pH-dependente (DI GIAMMARINO et al. 2002; HAINAUT 2002).

Em um estudo conduzido em 2007, foi verificado que a mutação p.R337H estava relacionada à ocorrência da LFS/LFL em pacientes brasileiros. Neste estudo foram avaliadas 45 famílias portadoras da LFS/LFL para a presença de mutações germinativas do gene *TP53*. A mutação p.R337H foi encontrada em 50% das famílias com critérios clínicos para LFS/LFL portadoras de mutações no gene *TP53*, sendo observada uma forte associação entre a mutação p.R337H e a LFL (ACHATZ et al. 2007). Os

autores verificaram que outros tumores, além dos carcinomas adrenocorticais, estavam presentes nestas famílias.

Posteriormente, estudos para a detecção de mutações patogênicas no gene *TP53* detectaram a alta ocorrência do mutante p.R337H em indivíduos provenientes da região Sul e Sudeste do Brasil (ACHATZ et al. 2007). Acredita-se que esta mutação esteja presente em 0,3% da população desta mesma região do país (ACHATZ et al. 2009; GARRITANO et al. 2010; CUSTÓDIO et al. 2013). A partir de um estudo realizado no estado de São Paulo, os autores verificaram a presença da mutação p.R337H em aproximadamente 78% das crianças e em 13,5% dos adultos que apresentavam ADR esporádico e sem história familiar de câncer (LATRONICO et al. 2001).

Para confirmar a origem desta mutação, foram conduzidos dois estudos avaliando marcadores polimórficos intragênicos. Em 2004, um painel de cinco marcadores polimórficos intragênicos foi avaliado em 22 pacientes (16 crianças e 6 adultos) e em 60 indivíduos normais. A hipótese do estudo era que esta mutação tem origem comum, sendo caracterizada como uma mutação fundadora (PINTO et al. 2004). Posteriormente, esses dados foram confirmados em um estudo no qual 12 indivíduos portadores da mutação p.R337H provenientes de oito famílias brasileiras aparentemente não-relacionadas foram genotipados para 29 TAG SNPs (GARRITANO et al. 2009). Os autores identificaram o haplótipo H3 em todos os indivíduos. Foi realizada uma PCR alelo-específica e demonstrou-se que a p.R337H está presente somente no haplótipo que apresenta o

genótipo T no SNP28. Estes dados confirmaram que havia um efeito fundador associado com a mutação p.R337H do gene *TP53*.

Até o momento, não foi documentada em literatura outra mutação fundadora no gene *TP53*. Um grande número de famílias portadoras da mutação p.R337H está sendo acompanhado no Departamento de Oncogenética do A.C. Camargo Cancer Center desde 2003, com o apoio financeiro do Projeto Temático da FAPESP INCITO (Projeto nº 08/57887-9), da bolsa de transferência de tecnologia (ICRETT) da Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) nº 978/2004 e do projeto Regular da FAPESP nº 03/10121-8. Todos os pacientes envolvidos neste estudo são provenientes deste centro, que possui uma coorte única que permite a realização de estudos para a identificação de fatores genéticos e epigenéticos que modulam as correlações fenótipo/genótipo em um número expressivo de portadores da mesma mutação germinativa no gene *TP53*.

### **1.3 A ASSOCIAÇÃO ENTRE *TP53*, *TDG* E A METILAÇÃO DO DNA**

Dados recentes da literatura apontam que mutações em *TP53* podem alterar indiretamente os níveis de diversos transcritos (PARIKH et al. 2013) e segundo DA COSTA et al. (2012), a proteína p53 é responsável pela regulação da transcrição da TDG. A timina-DNA glicosilase (TDG) é uma glicosilase especializada que remove a uracila e a timina do mau-pareamento entre G-U ou G-T, atuando como a primeira enzima da via de

reparo por excisão de bases. Ela é responsável por reparar os erros de pareamento resultantes da desaminação espontânea da citosina metilada e pelo controle da desmetilação fisiológica do promotor de diversos genes responsáveis pelo desenvolvimento (MAITI e DROHAT 2011).

A enzima TDG é necessária para o recrutamento da p300 que, por sua vez, permite que os promotores regulados pelo ácido retinóico protejam as ilhas CpG da hipermetilação, além de ativar a desmetilação de promotores e estimuladores tecido-específicos em diferentes fases do desenvolvimento e por diferentes condições hormonais. Esta enzima também interage com a desaminase AID (*activation induced desaminase*) e com a proteína de resposta a danos GADD45a, produto de outro gene regulado pela p53. Assim, a TDG é responsável por promover estados epigenéticos adequados durante o desenvolvimento por dois passos: (1) a 5-metilcitosina e a 5-hidroximetilcitosina são desaminadas pela AID resultando em timina e 5-hidroximetiluracila, respectivamente. (2) Posteriormente são submetidas ao processo de reparo por excisão mediado por TDG (MAITI e DROHAT 2011; CORTÁZAR et al. 2011; CORTELLINO et al. 2011). Esse processo pode ser diretamente influenciado pela p53 com regulação transcricional de TDG e GADD45a. As células que não possuem a atividade adequada da TDG apresentam duas alterações principais: (1) a diminuição da capacidade do reparo por excisão de bases, levando a maior sensibilidade aos danos mutagênicos (fenótipo mutante) e ao acúmulo de mutações e (2) o comprometimento da capacidade de manutenção do

padrão normal de metilação da região promotora de genes, levando à expressão inapropriada de genes do desenvolvimento (fenótipo epigenético).

Resultados prévios de estudos dos colaboradores desse projeto, Dr. Pierre Hainaut e Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto (Instituto Nacional de Câncer-INCA, Rio de Janeiro, Brasil), elucidaram a interligação entre a função da p53 e a metilação do DNA (DA COSTA et al. 2012), porém ainda não há evidências na literatura de como mutações em *TP53* podem alterar os perfis epigenéticos. Alterações dos padrões normais de metilação de genes mediadas via TDG (enzima regulada pela p53) podem ser um dos mecanismos relacionados à carcinogênese e à idade de ocorrência de tumores em portadores de mutações germinativas no gene *TP53*.

De acordo com estudos publicados na literatura, sabe-se que a TDG tem papel fundamental na embriogênese e no desenvolvimento. Considerando que os genes relacionados com o desenvolvimento e com a embriogênese são os mais significativamente desregulados na ausência da TDG (CORTÁZAR et al. 2011), foram selecionados alguns genes cujos níveis de metilação da região promotora são provavelmente dependentes da atividade da TDG. Dentre os transcritos codificadores avaliados encontram-se genes relacionados à pluripotência (*SOX2* e *OCT4*), reguladores do desenvolvimento (*HOXD8* e *SOX17*), controle da senescência replicativa (*CDKN2A*), fatores de transcrição relacionados ao desenvolvimento (*FOXA1*) e *ALUyB8*, uma sequência retrotransposon com metilação constitutiva e estável presente em múltiplas cópias no genoma humano (que servirá como controle da metilação do DNA).

## 1.4 O PROCESSO DE METILAÇÃO DO DNA

O processo da carcinogênese é constituído pelo acúmulo de várias alterações genéticas, como por exemplo, mutações em ponto, perda de heterozigose, deleções, inserções, aneuploidia, amplificação gênica e alterações epigenéticas, como a metilação do DNA, modificação de histonas e regulação por miRNA. As alterações epigenéticas são herdadas na divisão celular e acarretam mudanças no fenótipo sem alterar as seqüências do DNA (SMIRAGLIA et al. 2003). Além disso, diversos estudos reforçam a importância das alterações epigenéticas na tumorigênese (ESTELLER et al. 1999, 2000).

A principal alteração epigenética em humanos é a metilação do DNA, um processo biológico que consiste na adição de um radical metil ( $\text{CH}_3$ ) no carbono 5 do anel de citosinas (C) localizadas a 5' das guaninas (G). Os alvos primários desse processo são as ilhas CpG, que correspondem a regiões ricas de dinucleotídeo CpG, presentes principalmente nas regiões promotoras de determinados genes. A presença de metilação nas regiões promotoras está associada à supressão da expressão gênica, uma vez que esse processo inibe a transcrição, direta ou indiretamente (ESTELLER et al. 1999, 2000; HABUCHI et al. 2001; BRAIT 2003). A hipermetilação pode inibir a transcrição em três vias principais: (1) a interferência direta na ligação de fatores de transcrição aos seus sítios de reconhecimento na região promotora, (2) a ligação de repressores transcricionais específicos ao DNA metilado e (3) a alteração da estrutura da cromatina (EL-NAGGAR et

al. 1999; ESTELLER et al. 1999; BAYLIN et al. 2001; BRAAKHUIS et al. 2003; BRAIT 2003).

Em células normais, a metilação é um evento importante no controle da expressão gênica ocorrendo em sítios pré-determinados, como nos casos da inativação de um dos cromossomos X em mulheres e do *imprinting* genômico (mecanismo de inativação de alelos específicos de acordo com a herança parental) (FALLS et al. 1999; JONES e TAKAI 2001; BRAIT 2003). Em células tumorais, a alteração do perfil de metilação resulta em modificações no padrão de expressão gênica, podendo levar ao silenciamento ou ativação de genes reguladores do ciclo celular (ESTELLER et al. 1999, 2000). No câncer, a hipermetilação é encontrada em locais normalmente não metilados, como por exemplo, nas regiões promotoras de genes supressores tumorais, impedindo a transcrição destes genes.

A presença de altos níveis de metilação na região promotora de alguns genes tem sido considerada como marcador para vários tumores (JONES e LAIRD 1999; SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; ESTELLER et al. 2001). Alterações epigenéticas, principalmente a metilação do DNA, representam mecanismos moleculares plausíveis que podem contribuir para desvendar a diversidade fenotípica da LFS (HITCHLER e DOMANN 2007).

## 1.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM LARGA ESCALA EM CARCINOMAS ADRENOCORTICAIS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

O paciente que desenvolve carcinoma adrenocortical preenche critérios clínicos para a síndrome de Li-Fraumeni-*like* de acordo com o critério de Chompret modificado (TINAT et al. 2009). Além disso, o ADR pediátrico é mais prevalente em famílias LFS/LFL (MALKIN et al. 1990). Foi proposto que o paciente que desenvolver esse tipo de carcinoma na infância, tem uma probabilidade muito alta de apresentar mutações no gene *TP53* (WEST et al. 2007). Em 2011, SEIDINGER et al. descreveram que aproximadamente 90% dos pacientes portadores de carcinoma adrenocortical são portadores da mutação p.R337H. Recentemente, um estudo realizado em pacientes com carcinomas adrenocorticais pediátricos revelou que o diagnóstico desse tipo tumoral em crianças pode ser uma abordagem eficaz para detectar indivíduos e famílias com mutações germinativas no gene *TP53* com um alto risco de desenvolvimento de múltiplos tumores (CHOONG et al. 2012).

O carcinoma adrenocortical é uma neoplasia rara, cuja incidência anual estimada é de aproximadamente 0.3/1.000.000 para indivíduos abaixo dos 15 anos de idade (STILLER 1994). Contudo, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, essa incidência é de 10 a 15 vezes maior do que a observada em outras partes do mundo (SANDRINI et al. 1997), fato ligado à presença da mutação p.R337H. A penetrância estimada para o ADR em portadores desta

mutação é de aproximadamente de 10% até os cinco anos de idade (FIGUEIREDO et al. 2006).

O carcinoma adrenocortical é agressivo e acomete indivíduos de ambos os sexos, mas na maioria dos relatos publicados na literatura há uma proporção maior de indivíduos do sexo feminino. Existe uma distribuição bimodal, ocorrendo um pico de incidência até os cinco anos de idade e outro após a quarta década de vida (LATRONICO e CHROUSOS 1997). O excesso de produção dos hormônios adrenocorticais normalmente está relacionado com as manifestações sintomáticas do ADR, sendo que os pacientes frequentemente apresentam quadros de virilização, Síndrome de Cushing e hipertensão (LEFEVRE et al. 1984).

Os protocolos quimioterápicos para o tratamento do ADR ainda são considerados pouco eficientes, ressaltando o diagnóstico precoce e a ressecção cirúrgica como os fatores mais importantes para a cura do paciente (ZANCANELLA et al. 2006). Os pacientes diagnosticados com estadios I e II são submetidos somente à ressecção cirúrgica. Nestes casos, o prognóstico é bem melhor do que nos estadios III e IV da doença, em que os pacientes são submetidos à quimioterapia, além da cirurgia.

Há uma série de relatos em literatura em que análises de expressão gênica globais foram realizadas a fim de entender melhor essa neoplasia. FERNANDEZ-RANVIER et al. (2008) avaliaram a diferença entre os carcinomas adrenocorticais e os adenomas adrenocorticais. Neste estudo foram identificados 37 genes diferencialmente expressos nos carcinomas adrenocorticais, dentre eles cinco tiveram alta precisão diagnóstica

(*IL13RA2*, *HTR2B*, *CCNB2*, *RARRES2* e *SLC16A9*). Dentre os cinco genes considerados como melhores marcadores, o gene *IL13RA2*, foi o de maior acurácia. Altos níveis de expressão desse gene foram identificados em um conjunto de genes que intervêm na metástase do câncer de mama para os pulmões (MINN et al. 2005). O Quadro 2 apresenta os principais trabalhos publicados na literatura que avaliaram o perfil de expressão de carcinomas adrenocorticais. Nestes trabalhos, não foi verificado o perfil de mutações germinativas do gene *TP53* nos portadores de ADR, e, por este motivo, não foi possível identificar quais pertenciam efetivamente a famílias LFS/LFL.

**Quadro 2** - Estudos publicados em literatura que descreveram o perfil de expressão gênica em larga escala em tumores adrenocorticais.

Referência	Tumor (n)	Genes com expressão Diminuída	Genes com expressão Aumentada	Plataforma
de Fraipont et al. 2005	ADR (24) ACA (33)	<i>CYP11,CYP17, PP1A,RB1, TGFB3</i>	<i>IGF2,TGHB2 FGFR1,FGFR4 TGFB1</i>	cDNA microarrays
Velázquez-Fernández et al. (2005)	ADR (7) ACA (13)	<i>CXCL10,RARRES2, ALDH1A1,CYBRD1</i>	<i>USP4,UFD1L, INPPL1,H3F3B</i>	G2565BA DNA microarray scanner (Agilent Technologies)
Slater et al. 2006	ADR (10) ACA (10)	<i>PCP4,FMR1, QPCT,PALM</i>	<i>CTSH,FGFR1, TRIP,DLL3, DUOX2</i>	D-Chips 11540 sondas personalizadas
West et al. (2007)	ADR (18) ACA (5) IND (1)	<i>NURR1,CDKN1, NGF1-B,KCNQ1 HSD3B2</i>	<i>FGFR4,IGF2 SLC2AC,TOP2A UBE2S</i>	Affymetrix U133A Gene chip
Fernandez-Ranvier et al. (2008)	ADR (5) ACA (74)	<i>HSD3B2,ALDH1, LRRN3,MGST1, PRLP</i>	<i>IL13RA2,HTR2B, CCNB2, RARRES2, SLC16A9,ALDH1A1,</i>	Affymetrix HG-U133Plus 2.0 Gene chip arrays
Giordano et al. (2009)	ADR (33) ACA (22) Normal (10)	<i>CDH2, NOV, FMO2, SYTL5, KCNQ1, HTR2B</i>	<i>IGF2, CCNB2, CDC2, PTTG1, SPP1, TOP2A, CDKN3, BIRC5</i>	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0
Soon et al. (2009)	ADR (12) ACA (16) Normal (06)	<i>FMO2, NAV3 RPRM, SEPT4, EPHX2</i>	<i>IGF2, CCNB1 MAD2L1,GAS2L3</i>	Affymetrix HGU133plus2.0 genechip
Demeure et al. (2013)	ADR (44) Normal (04)	<i>NGB, GPX3, KPNA6, NR2F1, RFR</i>	<i>DDR1, TARBP2, SAP30L CIRBP, MSH5</i>	Affymetrix U133 Plus 2 expression microarrays

**Legenda:** ADR: Carcinoma adrenocortical, ACA: Adenoma adrenocortical, IND: Indeterminado

Apesar de vários genes estarem desregulados, apenas o *IGF2* apresentou altos níveis de expressão em todos esses estudos (SOON et al. 2008). É comprovado que a expressão aumentada desse gene em pacientes adrenocorticais está relacionada ao pior prognóstico e ao maior risco de recorrência tumoral (SOON et al. 2008).

Como carcinomas adrenocorticais pediátricos são frequentemente reportados na LFS/LFL, em 2007, WEST et al. avaliaram o perfil de alteração gênica em 24 amostras provenientes de tumores adrenocorticais (18 carcinomas, cinco adenomas e um indefinido) e sete amostras de adrenais normais. Nesse estudo foi utilizada uma plataforma da Affymetrix de 22kb, cobrindo aproximadamente 14.500 genes. Trinta e três por cento das sondas foram identificadas com expressão diferencial após a comparação entre amostras de carcinoma adrenocortical e tecidos normais de adrenal, com destaque para os genes *FGFR4* e o *IGF2* que apresentaram um nível de expressão aproximadamente 20 vezes maior no tecido tumoral.

Para o nosso conhecimento, não há estudos de análise de perfil de expressão gênica comparando pacientes portadores de ADR com e sem a mutação p.R337H. A realização desta análise permite identificar genes que possam estar envolvidos com a mutação na carcinogênese.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o padrão de metilação do DNA dos genes possivelmente regulados pela TDG em pacientes portadores de mutações germinativas no gene *TP53* e avaliar o perfil de expressão gênica global em tumores adrenocorticais de portadores e não portadores da mutação p.R337H no gene *TP53*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o padrão de metilação do DNA da região promotora dos genes possivelmente regulados pela TDG (*CDKN2A*, *FOXA1*, *HOXD8*, *JUN*, *NKX2-2*, *OCT4*, *SOX2* e *SOX17*) em portadores da mutação p.R337H com e sem câncer, portadores de outras mutações germinativas no gene *TP53*, indivíduos da família que não eram portadores de mutações e indivíduos saudáveis da população
- Avaliar os níveis de expressão gênica da TDG em amostras de carcinomas adrenocorticais com e sem mutação a mutação p.R337H no gene *TP53*.

- Avaliar o perfil global de expressão gênica em pacientes com carcinoma adrenocortical com e sem a mutação germinativa p.R337H.
- Avaliar o perfil global de expressão gênica em pacientes com carcinoma adrenocortical e comparar a amostras de glândula adrenal.
- Realizar uma meta-análise com trabalhos que avaliaram carcinomas adrenocorticais e que tinham dados disponíveis em banco de dados públicos.

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Após a aprovação do Comitê de Ética (Projeto de Pesquisa nº 1669/12), foi realizado o levantamento dos pacientes utilizando os registros do setor de Oncogenética do A.C. Camargo Cancer Center para a seleção dos pacientes de acordo com os grupos descritos nos critérios de inclusão.

#### 3.1 CASUÍSTICA

Foram selecionados para este estudo pacientes portadores de mutações germinativas no gene *TP53*, com diagnóstico clínico da LFS/LFL previamente identificadas e registradas no banco de dados do Departamento de Oncogenética do A.C. Camargo Cancer Center, localizado no estado de São Paulo, Brasil. Para o estudo de análise de metilação e expressão de transcritos foi utilizado amostras de sangue periférico que estavam armazenados no biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. Foram também selecionados carcinomas adrenocorticais provenientes de pacientes com e sem a mutação germinativa p.R337H no gene *TP53* e um grupo de indivíduos saudáveis sem história familiar de câncer.

### **3.1.1 Comparação do padrão de metilação do DNA da região promotora dos genes relacionados a via da TDG**

Foram obtidas amostras de sangue periférico de 50 indivíduos, selecionados em cinco grupos diferentes, nos quais: (1) 10 pacientes são portadores da mutação p.R337H no gene *TP53* e desenvolveram câncer; (2) 10 indivíduos são portadores da mutação p.R337H no gene *TP53* e não desenvolveram câncer; (3) 10 indivíduos são portadores de outras mutações germinativas no gene *TP53* (exceto p.R337H) e desenvolveram câncer; (4) 10 indivíduos não portadores, familiares de pacientes com mutação germinativa no gene *TP53* e que não tiveram a mutação detectada e (5) 10 indivíduos saudáveis sem história pessoal de câncer (Quadro 3).

**Quadro 3** - Características clínicas e biológicas dos pacientes portadores de LFS/LFL.

Paciente	Gênero	Idade ao diagnóstico (anos)	Tumor primário	Classificação	Critério	Mutação no gene <i>TP53</i>
<b>GRUPO 1</b>						
1	F	28	Tireoide	LFL	Clássico	p.R337H
2	F	58	Sarcoma	LFS	Clássico	p.R337H
3	F	32	Mama	LFL	Chompret	p.R337H
4	F	7	Linfoma	LFS	Clássico	p.R337H
5	M	3	Adrenal	LFL	Chompret	p.R337H
6	F	32	Sarcoma	LFS	Classico	p.R337H
7	F	48	Mama	LFL	Chompret	p.R337H
8	F	46	Mama	LFL	Eeles 1	p.R337H
9	M	56	Sarcoma	LFL	Eeles 2	p.R337H
10	F	50	Mama	LFL	Birch	p.R337H
<b>GRUPO 2</b>						
11	M	32	ausente	LFS	Clássico	p.R337H
12	F	57	ausente	LFL	Chompret	p.R337H
13	F	32	ausente	LFL	Clássico	p.R337H
14	F	33	ausente	LFL	Chompret	p.R337H
15	F	28	ausente	LFL	Chompret	p.R337H
16	M	31	ausente	LFL	Chompret	p.R337H
17	M	24	ausente	LFL	Chompret	p.R337H
18	M	56	ausente	LFL	Chompret	p.R337H
19	F	36	ausente	LFL	Chompret	p.R337H
20	M	69	ausente	LFL	Chompret	p.R337H
<b>GRUPO 3</b>						
21	M	13	Linfoma	LFL	Chompret	c.?(del exón4)
22	F	-	Mama	LFL	Chompret	p.T125T
23	M	30	Pele	LFL	Chompret	p.V197M
24	F	13	Ossos	LFS	Clássico	p.M237I
25	F	44	Mama	LFL	Chompret	-
26	F	1	Adrenal	LFL	Chompret	p.T125T
27	F	14	Tumor de Ewing	LFL	Eeles 1	p.H193R
28	F	1	Adrenal	LFL	Chompret	p.T125T
29	F	45	CRC	LFL	Chompret	p.V197M
30	F	14	Sarcoma	LFL	Eeles 1	p.H193R
<b>GRUPO 4</b>						
31	M	30	Rim	LFL	Chompret	Ausente
32	M	19	SNC	LFS	Clássico	Ausente
33	M	24	Mama	LFL	Chompret	Ausente
34	F	45	Tireoide	LFL	Chompret	Ausente
35	M	47	Rim	LFL	Birch	Ausente
36	F	50	Pelve	LFL	Birch	Ausente
37	F	28	Melanoma	LFL	Eeles 2	Ausente
38	F	50	Melanoma	LFL	Chompret	Ausente
39	F	69	Mama	LFL	Chompret	Ausente
40	F	39	Mama	LFL	Birch	Ausente

### Cont/ Quadro 3

GRUPO 5						
41	M	26	ausente	ausente	ausente	ausente
42	F	31	ausente	ausente	ausente	ausente
43	F	32	ausente	ausente	ausente	ausente
44	M	29	ausente	ausente	ausente	ausente
45	M	30	ausente	ausente	ausente	ausente
46	F	28	ausente	ausente	ausente	ausente
47	F	34	ausente	ausente	ausente	ausente
48	F	24	ausente	ausente	ausente	ausente
49	M	26	ausente	ausente	ausente	ausente
50	F	29	ausente	ausente	ausente	ausente

### 3.1.2 Avaliação do perfil global de expressão gênica em pacientes com carcinoma adrenocortical

Foram incluídas neste estudo 11 amostras de tumores adrenocorticais (quatro com a mutação p.R337H e sete sem esta mutação) provenientes do Banco de Macromoléculas do A.C. Camargo Cancer Center (Quadro 4).

### Quadro 4 - Características dos 11 pacientes com carcinomas adrenocorticais

ID	Sexo	Idade (anos)	Mutação p.R337H
GSR4T	M	24	Negativo
GSR31T <sup>#</sup>	F	30	Negativo
GSR34T <sup>#</sup>	F	46	Negativo
GSR 6T-A <sup>#</sup>	M	43	Negativo
GSR 27T <sup>*</sup>	F	0,5	Negativo
GSR 30T <sup>#</sup>	M	65	Negativo
LFS 219B	F	20	Negativo
GSR1T	F	4	Positivo
LFS 396T-B	F	10	Positivo
MT 24T-A	M	50	Positivo
GSR 32T	F	63	Positivo

Legenda: \*: Paciente portadora da mutação c.919+1G>A; #: Pacientes não rastreados para os outros exons codificantes do gene *TP53*.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Extração de ácidos nucleicos (DNA e RNA)

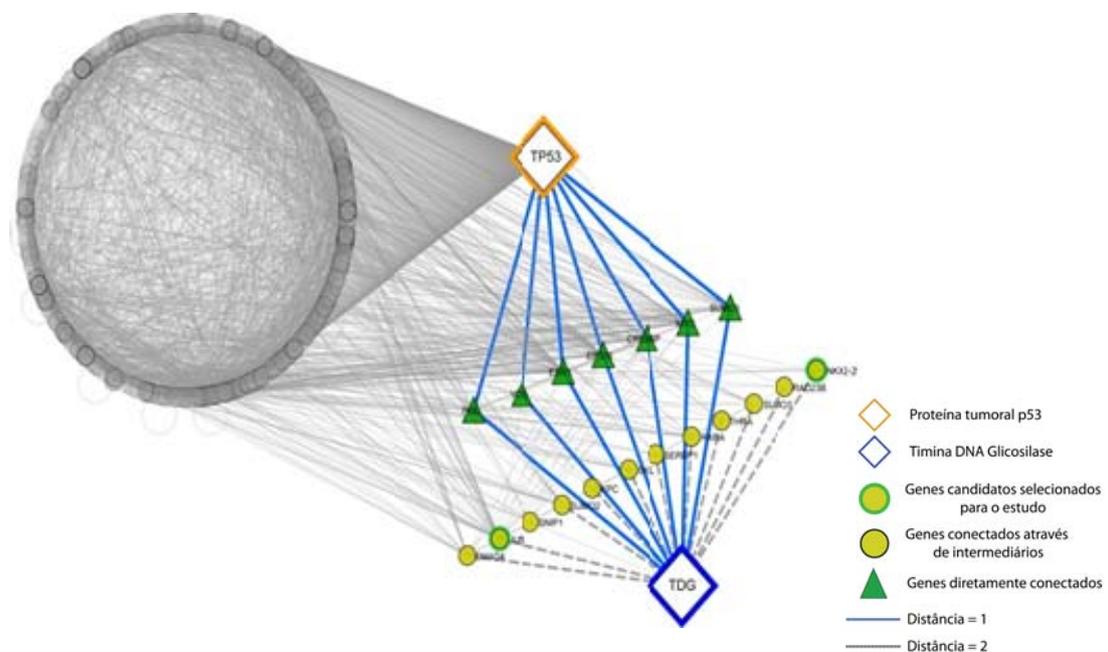
O DNA de sangue periférico foi previamente extraído com a utilização do *Puregene Blood kit (Qiagen)* seguindo as instruções do fabricante e estocado a -20°C. As amostras de DNA extraídas foram quantificadas por espectrofotometria em NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade) e estocadas a -20°C. Para verificar a integridade do DNA genômico extraído, 300ng de cada amostra foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%.

O RNA total das amostras de carcinomas adrenocorticais referentes aos pacientes portadores e não portadores da mutação p.R337H (Tabela 5), foi obtido utilizando o *Kit RNAeasy (Qiagen)*, de acordo com especificações do fabricante. A quantificação e a qualidade do RNA foram avaliadas utilizando-se o NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade) e o Bioanalyzer (RNA 6000 NanoLabChip kit 2100 Agilent), respectivamente.

### 3.2.2 Seleção dos genes candidatos para avaliação dos níveis de metilação do DNA

Redes de interação proteína-proteína (PPI) associando a *TDG* e o *TP53* foram construídas *in silico* e auxiliaram na escolha dos genes para a realização deste estudo. Foi identificada uma forte associação entre os genes *SMADA4*, *SNIP1*, *SUMO2*, *SKIL*, *SERBP1*, *RXRA*, *THRA*, *SUMO3*, *RAD23B*, *NKX2-2*, *JUN* e *XPC* e genes que participam das vias da *TDG* e

*TP53* (Figura 3). Para caracterizar essas interações e associações entre genes foi implementado um algoritmo que realiza uma busca por interações proteína-proteína nos seguintes bancos de dados: DIP (disponível em <http://dip.doe-mbi.ucla.edu>), intAct (disponível em [www.ebi.ac.uk/intact/](http://www.ebi.ac.uk/intact/)), HPRD (disponível em [www.hprd.org/](http://www.hprd.org/)), MINT (disponível em <http://mint.bio.uniroma2.it/mint/>) e STRING (disponível em <http://string-db.org/>). Estes genes foram selecionados para complementar a seleção dos genes propostos no presente estudo.

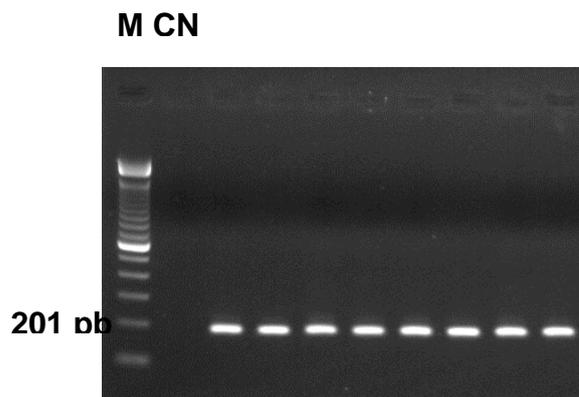


**Figura 3** - Rede gênica indicando as interações entre os genes da via TDG/*TP53* (imagem gerada usando o software NAViGaTOR, disponível em <http://ophid.utoronto.ca/navigator/>). O triângulo representa os genes diretamente conectados entre a TDG e o *TP53*. Círculos destacados indicam os genes selecionados para validação (*JUN* e *NKX2.2*).

### 3.2.3 Tratamento das amostras com bissulfito de sódio

Após sua extração, 500ng de DNA de cada amostra foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio pela utilização do Kit *EZ DNA Methylation Gold- Kit* (Zymo Research, Irvine, CA, USA). O tratamento com o sal bissulfito de sódio promove a desaminação de citosinas não metiladas, convertendo-as em uracilas, enquanto as citosinas metiladas são protegidas da ação do sal e permanecem inalteradas.

Foi realizado um teste para verificar se as amostras foram apropriadamente convertidas. As amostras convertidas foram amplificadas utilizando um par de iniciadores rico em regiões T e A que amplificam especificamente o DNA convertido (*STAT6*: F: 5´AAGTTTGGTTTTAAGGTTTGG3´ e R: 5´GGTTTGGATTTTAGTT3´). Após a PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foi corrido um gel de agarose a 1% para analisar o produto da mesma (Figura 4). O tamanho do *amplicon* gerado foi de 201 pares de bases e as amostras que não amplificaram foram convertidas novamente.



**Figura 4** - Produto da PCR após eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando que o DNA foi convertido completamente após tratamento com bissulfito de sódio . M: Marcador de peso molecular *Ladder* 100pb. CN: Controle negativo. pb: pares de bases

### 3.2.4 Pirosequenciamento para investigação de ilhas CpG metiladas

Os iniciadores dos genes *CDKN2A*, *FOXA1*, *HOXD8*, *JUN*, *NKX2-2*, *OCT4*, *SOX2* e *SOX17* foram delineados usando os parâmetros recomendados: tamanho dos iniciadores entre 18 e 24 pares de bases, composição formada por mais de 50% de G+C, quando possível a posição 3' terminando em G, C, GC ou CG (pois aumenta a estabilidade do emparelhamento), porém não mais que 3 Cs ou Gs juntos, temperatura de *melting* entre 55-62°C, não haver complementaridade evitando a formação de *hairpin* e evitando que 3' seja complementar ao 5' para não formar *loop*. O Quadro 5 apresenta a sequência dos iniciadores utilizados para o pirosequenciamento. Para os genes *CDKN2A*, *HOXD8* e *SOX2*, foram utilizados ensaios padronizados, produzidos pela empresa (*Qiagen*). (Quadro 6). O Anexo 1 apresenta as figuras representativas dos genes candidatos avaliados e suas respectivas ilhas CpGs.

**Quadro 5** - Sequência dos iniciadores e as propriedades dos genes avaliados por pirosequenciamento.

Gene	Sequência dos Iniciadores	Amplicon	Ilhas CpG*	Temperatura de Anelamento
<i>FOXA1</i>	F- 5' TTTAGTTGTGGGGAGGATGG R- 5'[B] CACCCTACAATCCTCACTAC Seq- 5'TGTTTGTGTTAAGA Py - 5' <b>CGGGTTTGC</b> GATAGTTTGGGG <b>CGG</b> TTTAGGT <b>CGCG</b>	191pb	•••••	55°C
<i>JUN</i>	F- 5'AGGATTTTGGGGTTATTGT3' R - 5'[B] CTTTCCCTATCAAAAACCTC3' Seq-5'GTTAGTTTGGGTTG3' Py-5' <b>CGCG</b> TATAAGTTT <b>CGGGT</b> CGT3'	220pb	••••	50°C
<i>NKX2.2</i>	F- 5'GGGTATATGTTAGGATTTTGATA 3' R-5'[B]CCTAAAAAACCCAAATCTC3' Seq- 5'GTAAATTGAATA 3' Py- 5' <b>CGA</b> ATTGTGGTTT <b>CGGGTACG</b> 3'	430pb	•••	49°C
<i>OCT4</i>	F 5' TAGGAGGGTTTTGGAAGTTTAG 3' R 5'[B]AAACCCTCATTTACCAAAC 3' Seq 5' TTATTATTTGGAGGGGG 3' Py 5' <b>CGCG</b> ATTT <b>CGG</b> TTTAT <b>CGT</b> AATTTATATTTTTTAGGTTTAAG <b>CGA</b> 3'	174pb	•••••	55°C
<i>SOX17</i>	F 5'GTTGTTTTATTTGGGAGGTG3' R 5'[B] ACCCCTAAATAACCAAACAAA3' Seq 5'GATTTGTTTTTTAG3' Py 5' <b>CGT</b> TAAATT <b>CGG</b> TATTGTTTAGGTGTTT <b>ACG</b> 3'	369pb	•••	55°C

F: *primer forward*; R: *primer reverse*; Seq: região de sequenciamento; Py: sequência de referência (os CG em negrito são os sítios CpG que foram analisados pelo pirosequenciamento); pb: pares de bases; ● número de CpG analisados por gene. \* número de ilhas CpGs

**Quadro 6** - Sequência dos ensaios e as propriedades dos genes avaliados por pirosequenciamento.

Gene	Ensaio	Sequência dos iniciadores	Amplicon	Ilhas CpG*	Temperatura de Anelamento
SOX2	Hs_SOX2_01_PM PyroMark CpG Assay (200) (PM00016856)	5'CCCC <b>GGCGCCG</b> AGGT <b>GCCGGACCG</b> CCGCCCC <b>CAGC</b> 3'	205pb	●●●●● ●●●●	56°C
HOXD8	Hs_HOXD8_02_PM PyroMark CpG Assay (200) (PM00012026)	5' <b>CGTTCCCTGGGCTGCACCCGCGT</b> GTCCAGAG <b>CTGC</b> 3'	155pb	●●●● ●●●	56°C
CDKN2A	Hs_CDKN2A_02_PM PyroMark CpG Assay (200) (PM00039907)	5' <b>CGCCGTGAGCGAGTGCTCGGAGGA</b> GGT <b>GCTATTA</b> A 3'	249pb	●●●●●●	56°C

Py: sequência de referência (os CG em negrito são os sítios CpG que foram analisados pelo pirosequenciamento); pb: pares de bases; ● número de CpG analisados por gene.\* Número de ilhas CpGs.

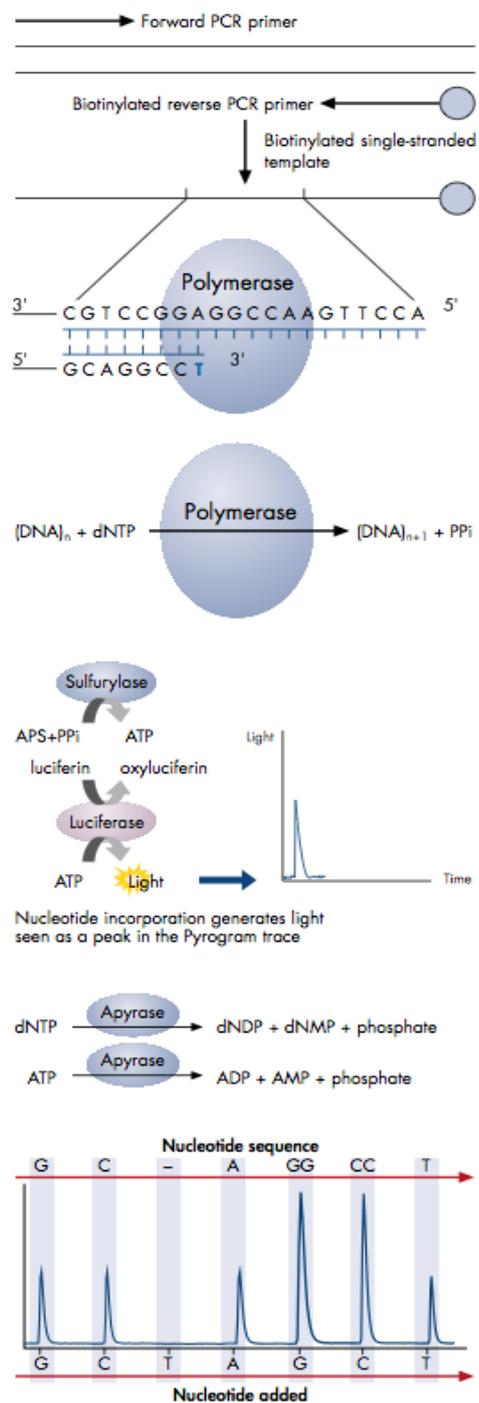
Após o tratamento com bissulfito de sódio e delineamento dos iniciadores, 25ng de cada amostra foram submetidas a uma amplificação pela técnica de PCR com um dos iniciadores marcados com fluoróforo biotina na extremidade 5'. A amplificação pela PCR para posterior pirosequenciamento foi realizada num volume de 50µl contendo: 1µl do DNA convertido (25ng), tampão 10x, 15mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 µM de cada dinucleotídeo, 10 µM de cada iniciador (sendo um deles marcado com biotina na extremidade 5') e 1U de *HotStartTaq DNA polimerase (Qiagen)*. As condições de ciclagem foram 15 minutos a 95°C, seguidos de 50 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos (temperatura de anelamento de cada iniciador- Tabela 3 e 4) e 30-70 segundos a 72°C com um tempo de extensão final de 10 minutos a 72°C. Cinco µl do produto da PCR foram submetidos a uma análise de dispersão dos fragmentos de DNA utilizando gel de agarose 1% corado com SYBR safe (10.000x) (*Invitrogen life Science Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Na presença de bandas intensas, com altura em pares de bases correta e sem bandas inespecíficas, os produtos da PCR foram submetidos à reação de pirosequenciamento.

O restante do produto da PCR (45µl) foi transferido para uma placa de 96 poços e imobilizado em 40µl de um tampão contendo *beads* de sefarose (3µl de *beads streptavidin-coated Sepharose* (Streptavidin Sepharose High Performace, GE Healthcare) + 37µl de tampão de ligação). A placa foi agitada por 15 minutos a 1.350 rpm e, em seguida, foi levada a bomba de vácuo (Vaccuun Presp Toll), onde o produto da PCR ligado as *beads* foi lavado com álcool 70%, desnaturado em solução de NaOH 0,2M e

submetido a um tampão de lavagem contendo 10mM de Tris. Em seguida, os produtos purificados foram incubados com 0,4µl de iniciadores de sequenciamento, previamente diluídos em 40µl de tampão de anelamento, a 80°C por 2 minutos, em placa especial para o pirosequenciamento (*PSQ 96 low plate*) (*Qiagen, Valencia, CA*). Para o anelamento do iniciador a placa foi resfriada a temperatura ambiente por 10 minutos. Os produtos purificados e ligados ao iniciador foram transferidos à base do *PSQ HS 96 A Pyrosequencer* (*Qiagen, Valencia, CA*), onde acontece o pirosequenciamento em tempo real das regiões a serem validadas, usando os reagentes Pyromark Gold q96 (*Qiagen, Valencia, CA*).

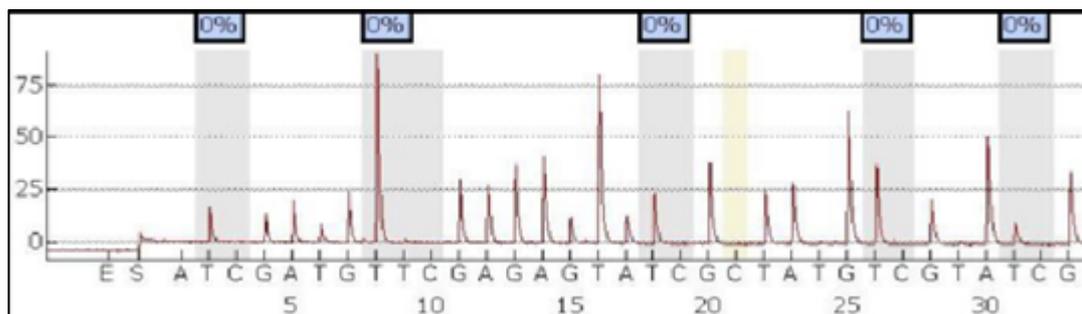
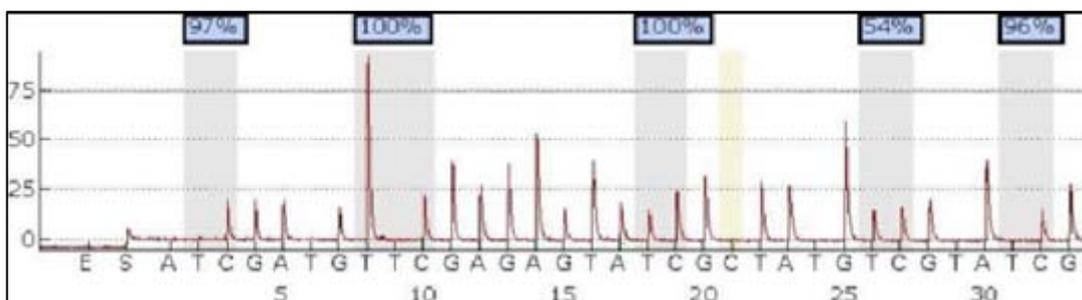
O pirosequenciamento é a técnica mais utilizada na análise do padrão de metilação do DNA (DUPONT et al. 2009). A síntese de DNA ocorre por um complexo de reações que inclui enzimas (ATP sulfúrilase, luciferase e apirase) e substratos (adenosina 5' fosfossulfato e luciferina). Na reação de pirosequenciamento as enzimas, os substratos e os nucleotídeos A,T,C, e G, são carregados em um cartucho e dispensados um de cada vez em cada poço, na ordem determinada pelo aparelho. Após serem dispensados os nucleotídeos, a enzima DNA polimerase promove a incorporação de nucleotídeos a fita simples de DNA e libera um PPI (pirofosfato), que se liga ao ADP formando ATP, que é degradado pela luciferina liberando um pico de luz detectável (emissão de fótons) que é capturado por uma câmera de CCD e convertido em pico no pirograma (Figura 5). À medida que os componentes da reação diminuem, os nucleotídeos não incorporados são degradados pela enzima apirase e é introduzido um novo ciclo de reagentes.

Quando um novo nucleotídeo é incorporado em uma cadeia crescente de DNA pela DNA polimerase, o pirofosfato é gerado de maneira estequiométrica, resultando na produção de ATP, ou seja, o sinal fluorescente é gerado proporcionalmente à quantidade de nucleotídeos incorporados, de modo que os picos presentes no pirograma indicam o número e tipo de nucleotídeos presentes.



**Figura 5** - Demonstração do processo enzimático da reação de pirosequenciamento. Ilustração proveniente do Manual Pyromark Gold q96 (Qiagen).

O uso do pirosequenciamento no estudo de metilação tem algumas vantagens em relação às outras técnicas, sendo este um procedimento tanto qualitativo quanto quantitativo. É possível identificar a quantidade exata de metilação de dinucleotídeos CpGs específicos de maneira rápida e eficaz. Outra vantagem é a possibilidade de verificar a qualidade da conversão por bissulfato de sódio, já que podem ser inseridos na ordem de dispensação nucleotídeos controles que podem indicar a ocorrência de conversão parcial do DNA (AHMADIAN et al. 2006; DUPONT et al. 2009). A Figura 6 apresenta a ordem de dinucleotídeos avaliados para o gene *HOXD8*. Os gráficos do pirograma mostram o controle de DNA 100% metilado e 0% metilado. Foram avaliados cinco dinucleotídeos CpG (lista transversal cinza) e um controle de conversão de bissulfato (lista transversal amarela). O controle de conversão por bissulfato consiste na dispensação de uma base citosina, no local da sequência de DNA não convertida onde haveria de fato uma citosina não precedida por uma guanina. Como não é esperado que essa citosina esteja metilada (pois somente citosinas precedentes de guaninas são passíveis de metilação em mamíferos), ela deveria ser totalmente convertida em timina. Se houvesse um sinal nessa região, isso indicaria uma conversão parcial de bissulfato. Em todas as reações de pirosequenciamento, foram utilizados DNA 100% metilados e 0% metilados como controles positivos e negativos, respectivamente (Figura 6).

**Controle 0%****Controle 100%**

**Figura 6-** Pirograma do controle 100% metilado e 0% metilado. A ordem de dispensação é referente ao gene *HOXD8*

### 3.2.5 Síntese de cDNA e análise da expressão de transcritos (RT-qPCR)

Outra abordagem utilizada neste estudo foi a avaliação de carcinomas adrenocorticais com e sem a mutação p.R337H no gene *TP53* quanto aos níveis de expressão da TDG. Foram selecionados os carcinomas adrenocorticais por serem característicos da LFS/LFL e por terem material disponível no banco. Para tanto, foi avaliada a síntese de cDNA e análise da expressão de transcritos (RT-qPCR) nos 11 carcinomas adrenocorticais (quatro positivos para a mutação p.R337H e sete negativos).

Para a avaliação de alterações na expressão da TDG, as amostras de RNA foram digeridas com 1U de *Dnase I Amplification Grade* (Life

Technologies) em 10X *Dnase I Reaction Buffer* e 25mM de EDTA pH 8.0. As amostras foram incubadas por 15min em temperatura ambiente e a enzima foi inativada por aquecimento a 70°C por 10min em um termociclador PTC-100 (Peltier - EffectCycling - MJ Research). A síntese de cDNA foi realizada em um volume final de 20µl contendo 5x *First-Strand Buffer* (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 10mM de cada dNTP, 0,5µg/µl de Oligo(dT), 0,1M ditioneitol e 200U da transcriptase reversa *SuperScript™ III* (Invitrogen). As condições de incubação foram: 42°C por 60min e 70°C por 15min.

As reações foram realizadas utilizando o corante fluorescente *Power SYBR Green* (AppliedBiosystems), que contém todos os reagentes necessários para a reação. Foi utilizado o termociclador automático (ABI *Prism 7500 Sequence Detection System*) para a amplificação de RT-qPCR. As condições de reação para a análise dos transcritos foram: 40 ciclos, com a temperatura de desnaturação a 95°C por 15 segundos e a de anelamento de 60°C por 1 minuto. Os valores obtidos para todas as amostras foram normalizados pela razão entre valores obtidos para o gene de interesse e gene de referência. Para a análise de expressão da TDG, foram usados os genes de referência *GAPDH*, *HPRT* e *ACTB* selecionados a partir de testes realizados com controles endógenos testados no nosso laboratório. Os iniciadores para a amplificação dos transcritos foram desenhados utilizando o programa *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

A quantificação do gene alvo nas amostras foi obtida pelos valores de Ct aplicados na fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN 2001). Para cada

amostra, o valor de  $\Delta Ct$  foi determinado subtraindo a média das duplicatas dos valores de Ct do gene de interesse, da média das duplicatas dos valores de Ct do gene referência. Posteriormente, para determinar o  $\Delta\Delta Ct$ , o valor de  $\Delta Ct$  de cada amostra foi subtraído do valor da média de  $\Delta Ct$  da amostra normal. Este último valor foi adicionado à fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e para cada amostra a quantidade de transcrito (N vezes > ou < que o normal) foi determinada pela comparação com amostra de controle constituída de RNA comercial de adrenal (Clontech). O Quadro 7 apresenta a lista dos iniciadores utilizados para a confirmação dos achados (genes alvo e endógenos).

**Quadro 7** - Lista de iniciadores utilizados para os genes alvos e endógenos.

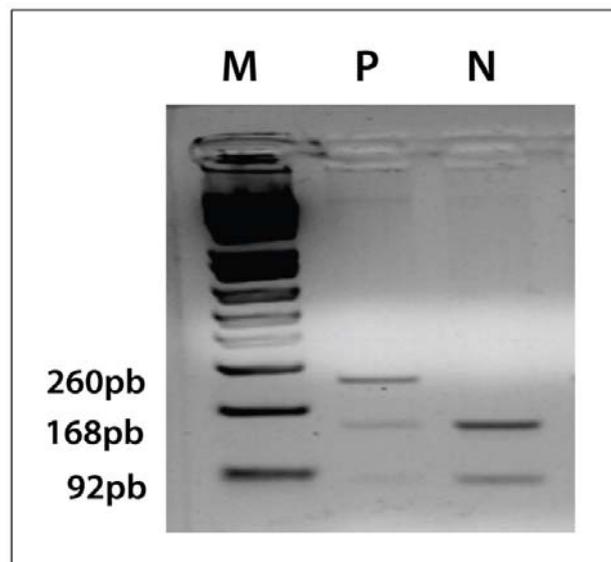
Gene	Número de Acesso	Sequência dos Iniciadores	Tamanho do Amplicon
<b>GAPDH</b>	NM_002046 NM_001256799.1	F - 5'TGCACCACCAACTGCTTAG3' R - 5'GAGGCAGGGATGATGTTTC3'	176bp
<b>HPRT1</b>	NM_000194.2	F - 5'TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG3' R - 5'GGCCTCCCATCTCCTTCATC3'	101bp
<b>TDG</b>	NM_003211.4	F - 5'TTGCCCAAGAGGATGCAAAGA3' R - 5'GAAGCCACAAGGTTCACTGC3'	119pb
<b>ACTB</b>	NM_001101.3	F - 5'TTCCTGGGCATGGAGTC3' R - 5'CAGGTCTTTGCGGATGTC3'	84bp

### 3.2.6 Investigação da mutação germinativa *TP53* p.R337H em pacientes portadores de carcinomas adrenocorticais

A análise da mutação p.R337H foram selecionadas 11 amostras de carcinomas adrenocorticais provenientes do Biobanco do A.C. Camargo

Cancer Center previamente revisados pelo Departamento de Patologia da mesma instituição.

Após a obtenção do DNA, foram utilizados os iniciadores 5'–CAA TTG TAA CTT GAA CCA TC–3' e 5'–GGA TGA GAA TGG AAT CCT AT–3' (IARC, 2010) para amplificação do éxon 10 do gene *TP53*, onde se mapeia a mutação p.R337H. A amplificação deste éxon consistiu de 35 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 57°C e extensão a 68°C, utilizando-se 1µ da enzima *Tth* DNA polimerase (Biotools). O produto da PCR foi digerido com 5µ da enzima *HhaI* (Fermentas) durante 16 horas a 37°C. A presença da mutação resultou na perda do sítio de restrição da enzima *HhaI* dentro do amplicon. Portanto, após a eletroforese do produto da digestão em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X (SAMBROOK e RUSSELL 2001), os padrões de bandas observados foram: fragmentos de 168 pb e 92 pb em células homozigotas normais, fragmentos de 260 pb, 168 pb e 92pb em células heterozigotas para a p.R337H e uma banda de 260 pb em células homozigotas para a p.R337H. Como marcador de peso molecular no gel foi utilizado o Ladder 1 Kb Plus (Invitrogen). O gel foi corado com o intercalante de DNA dupla fita, GelRed e fotografado sob luz UV. A Figura 7 demonstra os resultados esperados para a análise da presença da mutação germinativa p.R337H em heterozigose.



**Figura 7** - Resultados esperados para a análise da presença da p.R337H (GenBank NM\_000546.4 - c.1010 G→A). M= Marcador de peso molecular *Ladder* 1kb plus, PB= pares de bases. N= Negativo (Homozigoto para o alelo G, não mutado), P= Positivo (Heterozigoto). Não foi encontrado o genótipo homozigoto para o alelo A.

### 3.2.7 Sequenciamento de Sanger

Depois de identificada a presença de mutação no códon 337 do gene *TP53* através da análise por restrição com a enzima *HhaI*, as amostras foram sequenciadas utilizando a metodologia tradicional de SANGER e COULSON (1975). O método consiste na adição de didesoxiribonucleotídeos (nucleotídeos modificados que não possuem um grupamento hidroxila OH no carbono 3' da pentose) marcados com fluoróforos que atuam inviabilizando a elongação da cadeia de nucleotídeos pela DNA polimerase após serem inseridos na cadeia recém-sintetizada. Para este estudo o método de sequenciamento foi bi-direcional. Para a remoção dos iniciadores e dNTPs remanescentes da PCR, 5  $\mu$ L da solução contendo o fragmento dos genes de interesse amplificado foi purificado com

2 µL da mistura de enzimas *Éxonuclease I (Exo I)* e *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (USB)* em placa de 96 poços compatível para com o sequenciador automático utilizado no final do processo através de incubação a 37°C por 30 minutos seguido de inativação por aquecimento a 80°C por 15 minutos. Após a purificação seguiu-se a reação de sequenciamento dos fragmentos dos genes de interesse bidirecionalmente, ou seja, nos sentidos *foward* e *reverse*, em reações independentes. Foi adicionado a 3,5 uL de solução de PCR purificada o volume de 0,3 uL de iniciador *foward* ou *reverse*, 1 uL de *BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)*, 1,5 uL de tampão *Save Money 5X (Applied Biosystems)* e 3,7 uL de água livre de nuclease (*Sigma*). A solução foi inicialmente desnaturada a 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 18 segundos, anelamento a 55°C por 18 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. O termociclador utilizado para a reação de amplificação do sequenciamento foi o *96-Well GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. Após a extensão das fitas de DNA, este foi precipitado e lavado. A placa contendo as reações foi centrifugada para sedimentar gotículas aderidas nas paredes dos poços. Foi adicionado 1 uL de EDTA 125mM pH 8,0 e 1 uL de acetato de sódio 3M pH 8,0 foi adicionado a cada poço, seguido pela adição de 25 uL de etanol absoluto (*Merck*), agitação leve e incubação por 15 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Decorrido o tempo, a placa foi centrifugada a 4000rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. A placa foi então centrifugada invertida por 10 segundos a 650rpm, aceleração e desaceleração de 2. A etapa de precipitação foi finalizada a partir da adição de 35 uL de etanol 70% gelado

(Merck) seguido por centrifugação a 4000rpm por 20 minutos a 4°C, descarta do sobrenadante e centrifugação invertida 10 segundos a 650rpm com aceleração e desaceleração de 2. Os precipitados do sequenciamento foram secos a 95°C por 20 minutos e ressuspensos em 13 µl de *formamida Hi-Di (Applied Biosystems)* seguido por desnaturação a 95°C por 3 minutos. A solução obtida foi então utilizada para eletroforese no analisador automático de DNA, o sequenciador automático *ABI Prism modelo 3130XL (Applied Biosystems)*.

As sequências obtidas foram analisadas através do *software* de análise de sequenciamento, CLC Main Workbench 5.0.2. (CLC bio). O programa alinha as sequências obtidas com as sequências referências de cada fragmento gênico de maneira a permitir uma análise comparativa que aponta conflitos entre as leituras. Estas sequências referências foram obtidas da base de dados NCBI Reference Sequence (RefSeq), mantido pelo NCBI/NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>). Para o estudo foi utilizada a sequência referência NM\_000546.4.. Para cada sequência obtida foram avaliados os éxons e junção éxon-íntron.

### **3.2.8 Perfil de expressão gênica global**

O perfil de expressão gênica foi avaliado em quatro carcinomas adrenocorticais positivos para a mutação p.R337H e sete carcinomas adrenocorticais negativos para a mutação p.R337H. Foi utilizada a plataforma *Whole Human Genome 4x44K (Agilent Technologies)*, composta por 43.376 sequências biológicas e 32 sondas para controles positivos *Spike in* (disponível em <http://www.genomics.agilent.com>). Os procedimentos de

marcação das amostras, hibridação e detecção seguiram o protocolo *Two-color microarray-based gene expression analysis* (Agilent Technologies). Como controle foi utilizado RNA de tecido normal de adrenal (*pool* de 62 amostras de tecido adrenal normal, ambos os gêneros e idades entre 15 a 61 anos) (*Human Total RNA Master Panel II*, Clontech). Durante a pré-síntese de cDNA, na reação de marcação, as amostras apresentavam uma concentração de 200ng de RNA total diluídos em um volume de 1,5µL. Foram adicionados 1,8µL de T7 *Primer* em cada tubo contendo o RNA total, 2µL de Spike A da diluição para o Cy3 (RNA dos tumores ADR) e de Spike B para o Cy5 (Tecido normal de ADR), totalizando um volume final de 5,3µL. Os iniciadores foram desnaturados a 65°C em um termociclador por 10 minutos, e em seguida, incubados a gelo por 5 minutos. Para a síntese de cDNA foram adicionados 2µL de 5x *First Strand Buffer*, 1µL de 0,1M *DTT*, 0,5µL de 10mM *dNTP Mix* e 1,2µL do *Affinity Script RNaseBlock Mix*, em um volume final de 10µL. As reações foram incubadas em um termociclador por 2 horas à 40°C e 15 minutos à 70°C e então transferidas para o gelo por 5 minutos. A transcrição de cDNA para cRNA ocorreu pela adição de 0,75µL de *Nuclease-free water*, 3,2µL de 5x *Transcription Buffer*, 0,6µL de 0,1M *DTT*, 1µL de *NTP Mix*, 0,21 µL de *T7 RNA Polymerase Blend* e 0,24µL de Cy3-CTP ou Cy5-CTP, totalizando um volume final de 16µL. As amostras foram mantidas por 2 horas em um termociclador a 40°C. A purificação das sondas foi realizada com a utilização do *RNeasy Mini Kit*, seguindo as especificações do fabricante. A intensidade de marcação e o rendimento da reação foram avaliados para todas as amostras utilizando-se NanoDrop 1000 (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade) e 825ng de cada

amostra foram combinadas à mesma massa da referência. Foram adicionados 55µL 2x *Hi-RPM Hybridization Buffer*. As lâminas foram confeccionadas e a hibridização foi realizada a 65°C por 17 horas. A lavagem das mesmas ocorreu em banhos consecutivos em soluções de *Wash Buffer 1* e *Wash Buffer 2* por 1 minuto cada, acetonitrila por 10 segundos e *Stabilization e drying solution* por 30 segundos. As lâminas foram escaneadas no *Microarray Scanner System (Agilent Technologies)* utilizando o *software ScanControl 8.1 (Agilent Technologies)* e os dados foram extraídos utilizando programa *Feature Extraction 10.1.1.1 (Agilent Technologies)*.

O programa R (versão 2.10.1) foi utilizado para remoção de controles e sondas com baixa reprodutibilidade, nomeados como NA (do inglês, *not available*). Foi calculada a razão entre a cianina 3 e cianina 5 (Cy3/Cy5) em log na base 2 para todas as sequências e realizada a média entre as sondas, quando mais de uma cobria um gene, resultando em um valor único. O programa TMeV versão 4.5 (disponível em <http://www.tm4.org>), considerando o teste t *two-class* (FDR 5% e 1.000 permutações), foi utilizado para a análise de dois estudos: (1) separação entre amostras positivas (P) e negativas (N) para a mutação germinativa p.R337H e (2) separação entre amostras tumorais (T) e normais (N), independente da mutação. Nesse segundo estudo foram selecionadas as sondas com valores >1 e <-1, onde o intervalo de confiança (IC) de 95% foi utilizado para selecionar os genes diferencialmente expressos.

### 3.2.9 Análise estatística (pirosequenciamento de RT-qPCR)

Os dados de pirosequenciamento (% de metilação de cada gene) e de RT-qPCR foram analisados estatisticamente utilizando os *softwares* SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL) e GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Software* Inc., La Jolla, CA). Testes não paramétricos para comparação múltipla (teste de *Kruskal- Wallis* com teste de *Post Hoc* de *Dunn*) foram realizados para avaliar diferenças entre grupos positivos e negativos para a mutação p.R337H. A significância foi definida como  $p < 0,05$ .

### 3.2.10 Meta-análise

Foi realizada uma meta-análise para comparar o perfil de expressão dos genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre amostras tumorais e normais e entre amostras positivas e negativas para a mutação p.R337H com estudos publicados em literatura e disponíveis no banco de dados NCBI-GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). Como palavras-chave “adrenocortical carcinoma”, “adrenocortical tumor” e “adrenocortical”. Foram utilizados dados disponíveis por SOON et al. (2009), GIORDANO et al. (2009), DURAND et al. (2011), HEATON et al. (2012) e DEMEURE et al. (2013), resultando em 250 amostras que foram processadas para remoção de possíveis *outliers* e de sondas com baixa reprodutibilidade. A comparação entre os grupos foi feita pelo teste t, considerando  $p < 0,05$ , 1.000 permutações e FDR (False Discovery Ratio)  $< 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

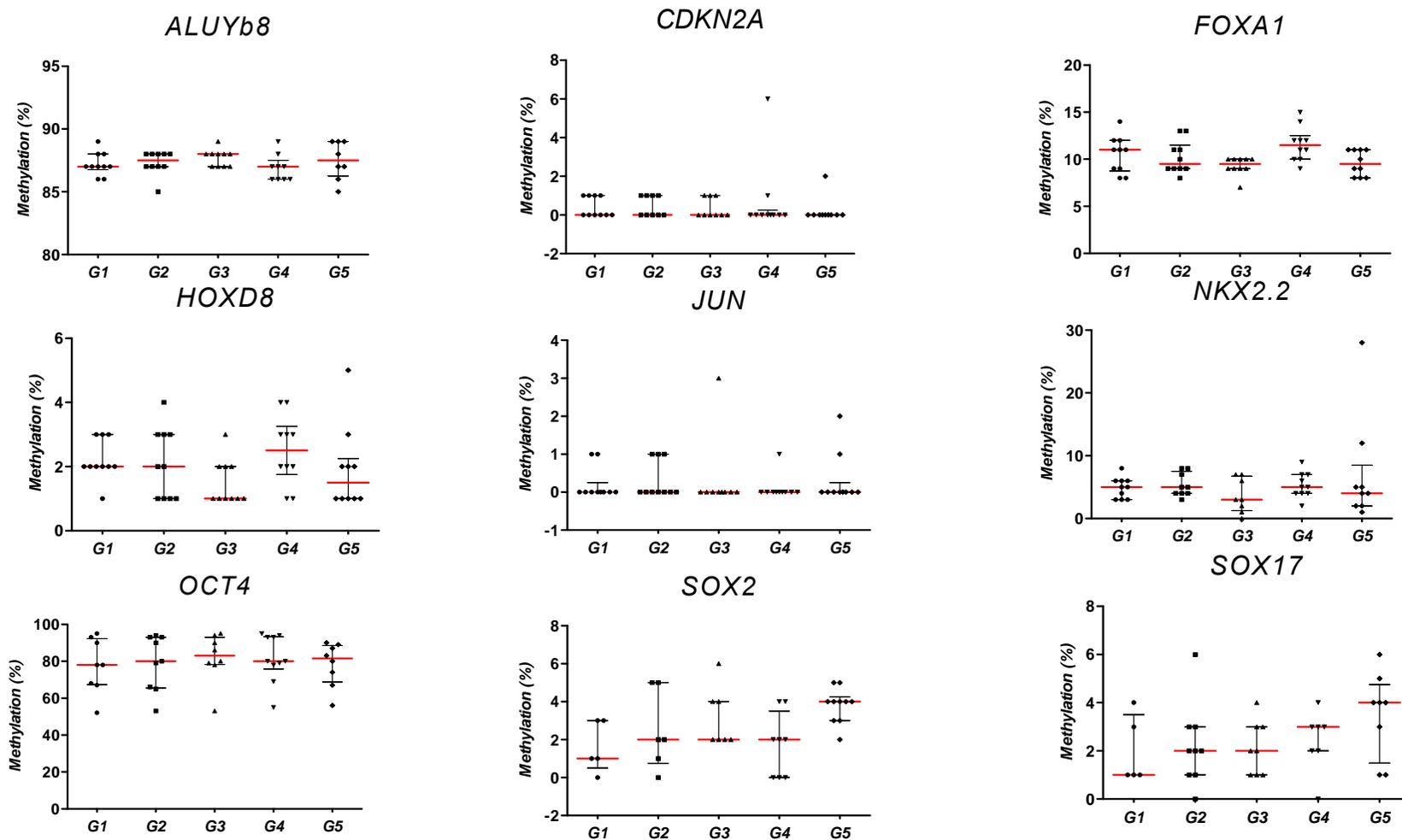
Os resultados obtidos neste estudo foram realizados em três etapas. Na primeira etapa, foi realizada a avaliação do padrão de metilação de ilhas CpG dos genes candidatos possivelmente regulados pela TDG. O objetivo desta etapa foi investigar se variações nos padrões de metilação nestes genes poderiam estar relacionados à carcinogênese e a mutação no gene *TP53*. Na segunda etapa foram avaliados os níveis de expressão da TDG em carcinomas adrenocorticais com e sem a mutação p.R337H. Na terceira etapa foi realizada a expressão gênica global em carcinomas adrenocorticais obtidos de pacientes portadores e não portadores da mutação p.R337H e realização de uma meta-análise para corroborar nossos achados.

### 4.1 ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA DE GENES CANDIDATOS EM SANGUE PERIFÉRICO POR PIROSEQUENCIAMENTO

Após o delineamento dos grupos de estudo (Grupos de 1 a 5), foram desenhados os iniciadores utilizando o programa *Primer Blast* (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para cada um dos genes selecionados, que são potencialmente relacionados a via da TDG: *CDKN2A*, *FOXA1*, *HOXD8*, *JUN*, *NKX2-2*, *OCT4*, *SOX2* e *SOX17*. O resultado das

padronizações e foto dos géis de agarose 1% estão representados no Anexo 2.

O padrão de metilação dos genes candidatos, *CDKN2A*, *FOXA1*, *HOXD8*, *JUN*, *NKX2-2*, *OCT4*, *SOX2* e *SOX17*, foram avaliados por pirosequenciamento. Como observado na Figura 8, dentre os genes avaliados não foi observada diferença significativa entre os grupos G1, G2, G3, G4 e G5 na comparação do padrão de metilação dos genes candidatos no sangue periférico de pacientes com e sem a mutação p.R337H. Mais detalhadamente, foi possível observar que os genes *CDKN2A*, *JUN*, *SOX2* e *SOX17* e *HOXD8* apresentam nível de metilação inferior a 5% para todos os grupos avaliados. Os genes *FOXA1* e *NKX2-2* apresentaram níveis de metilação abaixo de 15% para os grupos estudados e os níveis de metilação foram próximos a 80% para o gene *OCT4* e para a sequência ALUyb8.

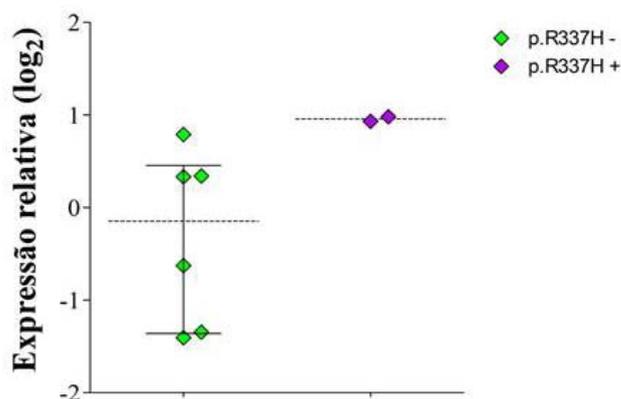


**Figura 8** - Dot Plots representando os níveis de metilação dos genes candidatos *CDKN2A*, *FOXA1*, *HOXD8*, *JUN*, *NKX2-2*, *OCT4*, *SOX2* e *SOX17* e região controle *ALUYb8* nos grupos G1 a G5 (Teste de Kruskal- Wallis).

## 4.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA TDG POR RT-qPCR EM CARCINOMAS ADRENOCORTICAIS

Não foi possível verificar alteração no padrão de metilação dos genes genes selecionados da via TDG. Como a TDG não foi diretamente avaliada, foram realizados ensaios de RT-qPCR para avaliar os níveis de expressão da TDG em amostras de carcinomas adrenocorticais de pacientes com e sem a mutação p.R337H no gene *TP53*.

Três das onze amostras de tumores adrenocorticais foram excluídas da análise de expressão dos transcritos por RT-qPCR; duas das amostras eram positivas para a mutação p.R337H. Os níveis de expressão da TDG nos casos positivos para a mutação p.R337H foram elevados em relação as amostras negativas para a mutação. No entanto, este dado não pode ser estatisticamente confirmado devido ao baixo número amostral (Figura 9).



**Figura 9** - Níveis de expressão da TDG em carcinomas adrenocorticais positivos e negativos para a mutação p.R337H (RT-qPCR).

### 4.3 EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL PELA TÉCNICA DE MICROARRAY EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS ADRENOCORTICAIS

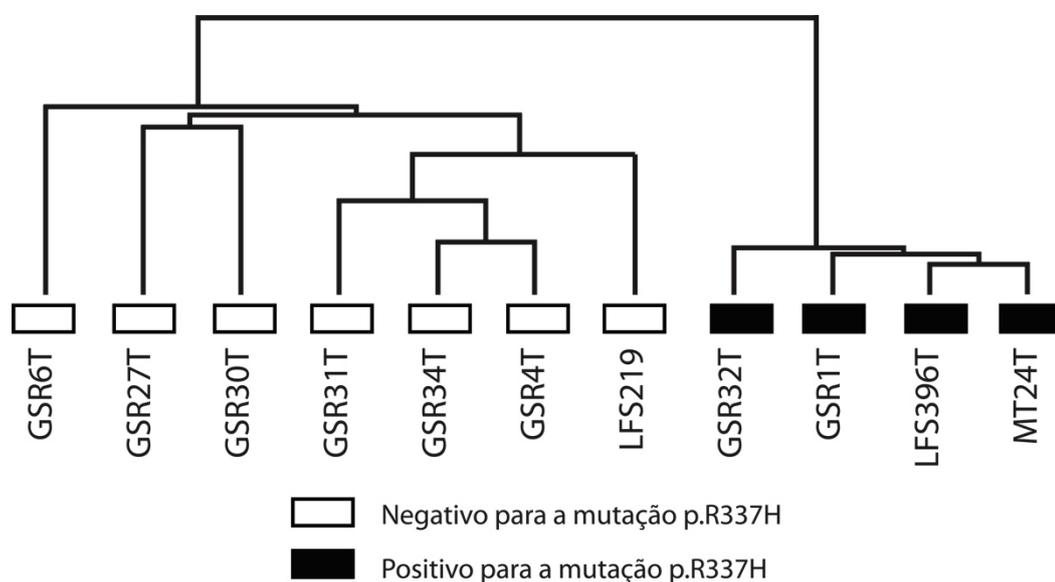
Considerando que tanto os resultados de metilação do DNA dos genes candidatos quanto os resultados referentes aos níveis de expressão da TDG foram inconclusivos, optou-se por acrescentar ao presente estudo uma análise global de expressão gênica em pacientes com e sem a mutação p.R337H. Foram utilizadas as mesmas amostras de carcinomas adrenocorticais avaliadas nos ensaios de RT-qPCR. A mutação hereditária p.R337H foi avaliada para uma coorte de 11 pacientes com carcinoma adrenocortical, dos quais quatro eram positivos para essa mutação (Tabela 7). Por ser um tumor raro, a casuística apesar de pequena é significativa. Todas as amostras apresentaram qualidade satisfatória quando considerados os critérios de *background*, uniformidade de hibridação, intensidade dos sinais verde e vermelho e variação das replicatas após análises pelo programa Feature Extraction v. 10.1.1.1 (Agilent Technologies).

A análise do perfil global de expressão foi realizada utilizando-se duas abordagens: (1) comparação entre amostras de pacientes positivos e negativos para a mutação p.R337H e (2) comparação entre grupos de amostras tumorais e normais. No primeiro estudo foram identificados 135 genes diferencialmente expressos, sendo 41 genes com expressão aumentada e 94 genes com expressão diminuída. Já na análise avaliando amostras tumorais *versus* o *pool* de adrenal normal, 1.262 genes

diferencialmente expressos foram identificados, sendo 569 com expressão aumentada e 693 com expressão diminuída.

#### 4.3.1 Análise comparativa entre pacientes positivos e negativos para a mutação p.R337H

Quando avaliados os genes diferencialmente expressos obtidos pela análise supervisionada considerando dois grupos (positivos e negativos), foi possível observar o agrupamento de todos os pacientes portadores de carcinomas adrenocorticais com a mutação p.R337H em relação aos não portadores da p.R337H (Figura 10). O anexo 3 mostra um *heatmap* com os 135 genes alterados.



**Figura 10** - Agrupamento hierárquico supervisionado dos 11 casos de carcinomas adrenocorticais. Foram observadas duas classes distintas baseadas no perfil de expressão gênica.

Os 135 genes diferencialmente expressos foram identificados (valor de  $p < 0,05$ ), sendo 41 genes com expressão aumentada e 94 com expressão diminuída. Desta análise foram selecionados os 20 genes com os maiores *fold-change* conforme apresentado na Tabela 1. Dentre os principais transcritos alterados encontram-se os genes *AMIGO2*, *LAMA2*, *MAP4K3* e *MAP3K7CL* com expressão diminuída e *RYR1*, *EYA2* e *ONECUT2* com expressão aumentada.

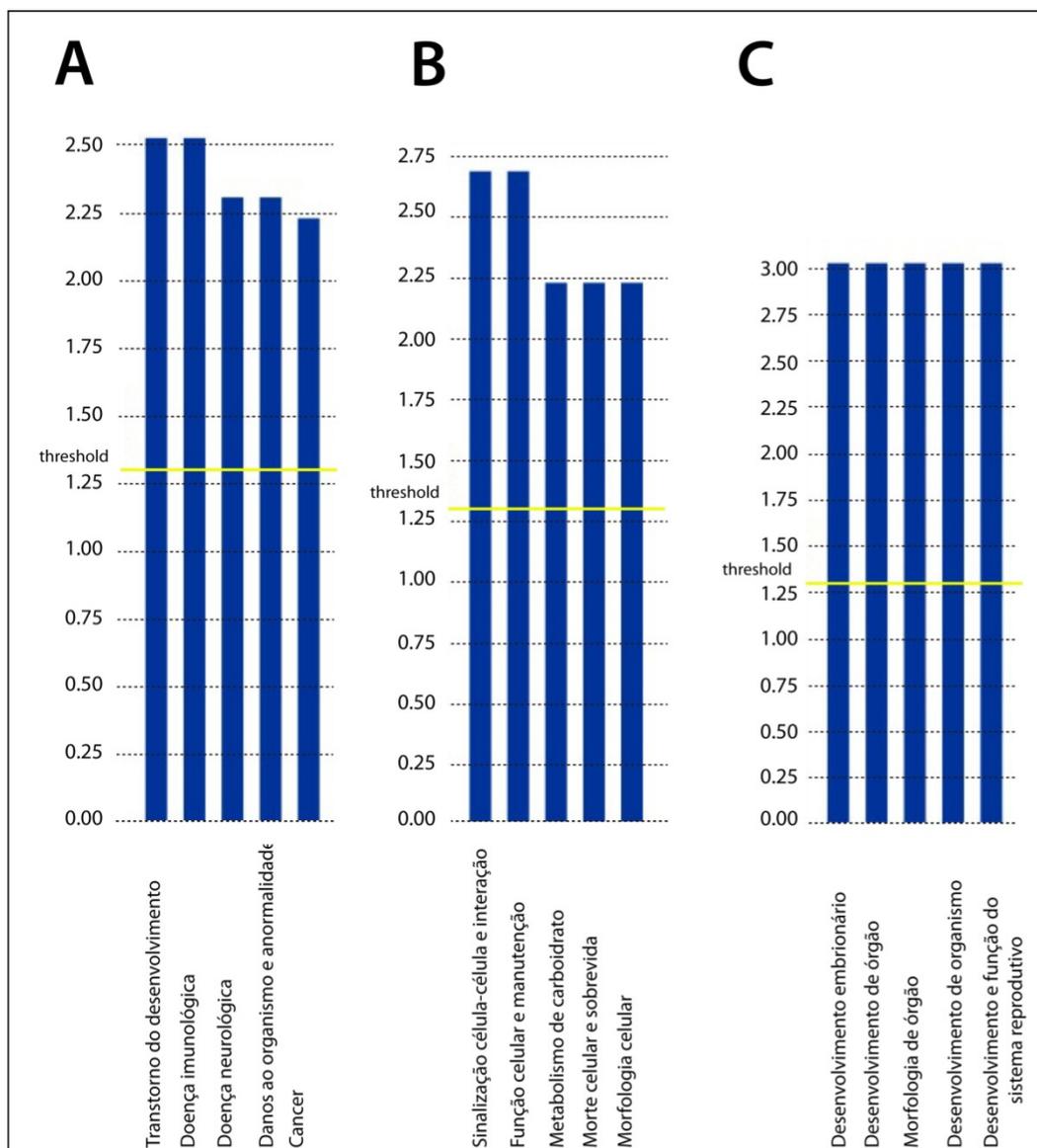
O gene *AMIGO2*, que codifica uma molécula de adesão que participa da regulação da apoptose, foi identificado com expressão diferencial 12 vezes menor em pacientes mutados quando comparados aos pacientes que não possuem a mutação germinativa p.R337H. Já o gene *RYR1*, mapeado na região 19q13.1, foi identificado com uma expressão 5 vezes maior em pacientes portadores da mutação. Nota-se que três dos dez genes (*ONECUT2*, *GSC*, *EYA2*) com maior *fold-change* para expressão aumentada em pacientes com a mutação são fatores de transcrição. Dentre os genes com a expressão diminuída encontra-se o *IL2RG*, que está relacionado com a diferenciação celular. Todos os genes alterados nesta análise estão apresentados no Anexo 4.

**Tabela 1** - Vinte genes diferencialmente expressos e que apresentaram os maiores *fold-change* obtidos da análise supervisionada de pacientes com carcinoma adrenocortical portadores e não portadores da mutação p.R337H.

Gene	Região	Descrição do gene	<i>Fold-Change</i>
<i>Expressão diminuída</i>			
<i>AMIGO2</i>	12q13.11	Molécula de adesão com domínio Ig-like 2	-12,14
<i>LAMA2</i>	6q22-q23	Laminina alfa 2	-4,29
<i>KCTD14</i>	11q14.1	Domínio tetramerização do canal de potássio, contendo 14	-4,07
<i>PTGS2</i>	1q25.2-q25.3	Prostaglandina-endoperóxido sintase 2	-3,52
<i>MAP3K7CL</i>	21q22.3	MAP3K7 C-terminal como	-3,43
<i>RXFP1</i>	4q32.1	Receptor do peptídeo relaxina / família semelhante à insulina 1	-3,06
<i>ACTN3</i>	11q13.1	Alfa actina 3	-2,68
<i>IL2RG</i>	Xq13.1	Interleucina 2 do receptor, gama	-2,63
<i>MAP4K3</i>	2p22.1	Mitogeno proteína quinase ativada quinase quinase 3	-2,57
<i>CASD1</i>	7q21.3	Domínio CAS1 contendo 1	-2,56
<i>Expressão aumentada</i>			
<i>RYR1</i>	19q13.1	Receptor rianodina 1	5,90
<i>EYA2</i>	20q13.1	Olhos homólogo ausente 2	4,84
<i>RRBP1</i>	20p12	Proteína de ligação do ribossomo 1	4,56
<i>ANKRD18A</i>	9p13.1	Domínio Ankyrin repetição 18 °	4,11
<i>MDGA1</i>	6p21	Domínio MAM contendo glicosilfosfatidilinositol âncora 1	3,67
<i>MYO5C</i>	15q21	Myosin VC	3,65
<i>SPATA2</i>	20q13.13	Espermatogênese associada 25	3,48
<i>FAM46C</i>	1p12	Família com seqüência similaridade 46, membro C	3,46
<i>ONECUT2</i>	18q21.31	<i>Onecut homeobox 2</i>	3,09
<i>GSC</i>	14q32.1	<i>Homeobox Goosecoid</i>	3,07

Os 135 genes selecionados como diferencialmente expressos pela análise comparativa entre amostras positivas e negativas para a mutação p.R337H foram enriquecidos utilizando o programa *Ingenuity Pathway Analysis* (Figura 11). Nesta análise foram identificadas as doenças (A), funções moleculares e celulares (B) e processos fisiológicos (C)

significativamente relacionados ( $p < 0,05$ ) com a mutação e foram selecionadas as cinco biofunções com maior *score* para cada enriquecimento. Em (A) observa-se que os maiores *scores* (2,50) estão relacionados ao transtorno de desenvolvimento e doenças imunológicas, seguidos por doença neurológica, câncer, danos ao organismo e anormalidade. Já em (B) pode-se observar que os maiores *scores* (2,70) estavam relacionados com sinalização célula-célula e interação, função celular e manutenção, seguidos por metabolismo de carboidrato, morfologia celular, morte celular e sobrevivência. Em (C) nota-se um mesmo *score* para os cinco primeiros processos fisiológicos (3,00): desenvolvimento embrionário, desenvolvimento de órgão, morfologia de órgão, desenvolvimento e função do sistema reprodutivo e desenvolvimento de organismo.

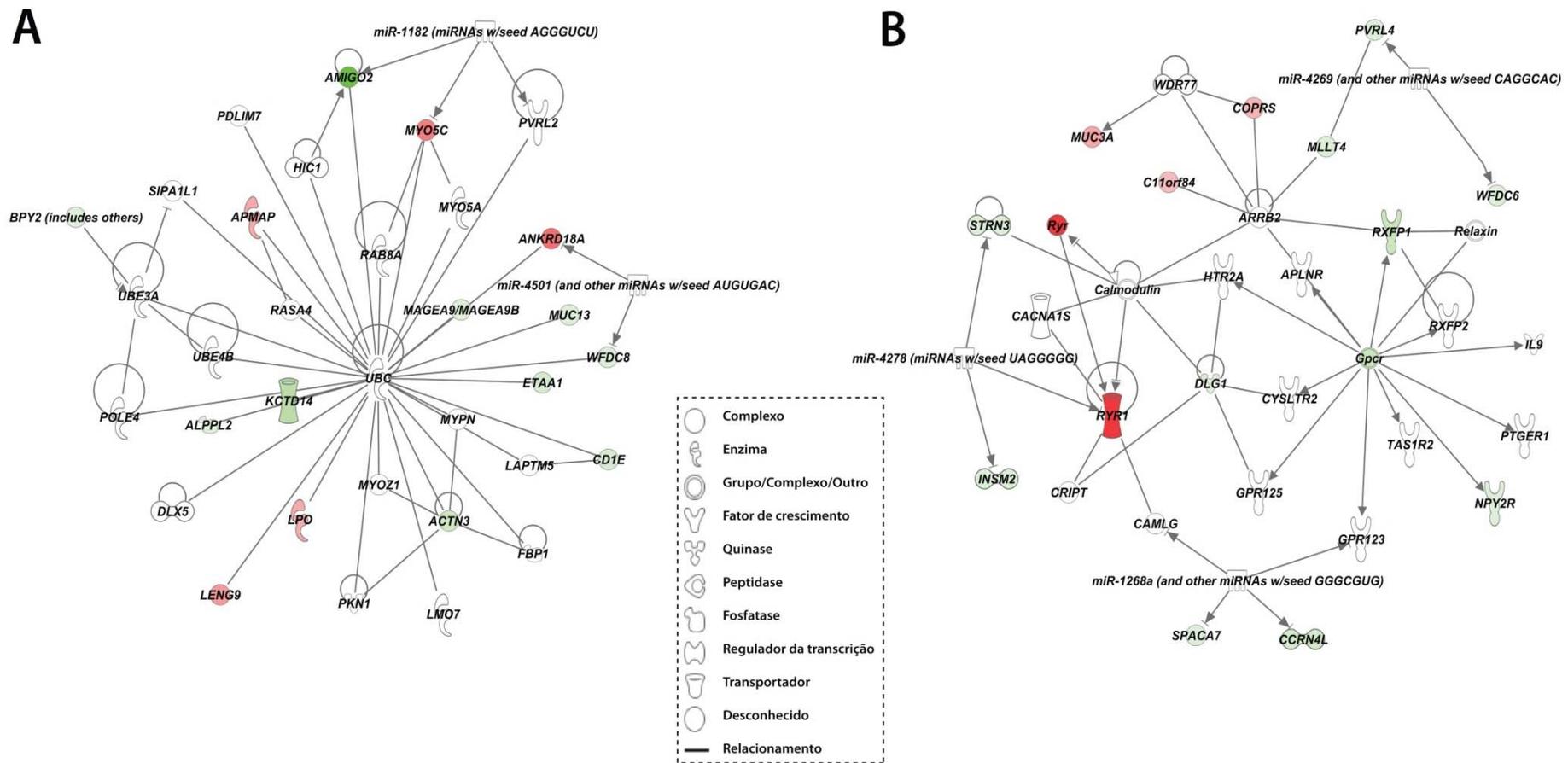


**Figura 11** - Biofunções correlacionando com os genes diferencialmente expressos com média dos valores das sondas para cada gene. Os scores para cada via são calculados pelo teste exato de *Fischer* e são iguais a  $-\log(\text{valor de } P)$ . Imagens geradas pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

Com relação a análise de redes gênicas foram identificadas nove redes com scores significativos para os 135 genes avaliados. A Figura 12 ilustra as duas principais redes envolvendo os genes diferencialmente expressos (score: 26 e 24 respectivamente). Na rede 1 encontra-se um dos

principais genes alterados, o *AMIGO2*, com expressão diminuída (*fold-change* -12,14), além dos genes *MYO5C*, *APMAP*, *ANKRD18A*, *LPO* e *LENG9*. Também foram identificados na rede os genes *KCTD14*, *ALPPI2*, *BPY2*, *MUC13*, *WFDC8*, *CD1E*, *ACTN3* e *ALPPL2*, apresentando expressão aumentada. É possível observar que todos os genes diferencialmente expressos identificados na rede apresentaram interação com a ubiquitina C (*UBC*), relacionada com degradação de proteínas, embora este gene não esteja alterado nesta análise. Na rede, o gene *ANKRD18A* aparece interagindo com o *hsa-miR-4501*, sugerindo que esse miRNA possa atuar como regulador da expressão diminuída desse gene. Com relação a rede 2, é possível observar o gene *RYR1* com expressão aumentada (*fold-change* 5,90), além dos genes *MLLT4*, e *GPCr* apresentando expressão diminuída. É possível verificar nessa rede a presença de vários miRNAs, como o *hsa-miR-1268a*, *hsa-miR-4278* e *hsa-miR-4269*, sendo que o *miR-4278* aparece como um possível regulador da expressão do gene *RYR1*. Os genes com alterações na expressão em cada uma das vias são apresentados na Figura 13.

A relação destes genes com a via da TDG foi verificada em bancos de interação proteína-proteína. Nenhuma interação física foi identificada entre os genes possivelmente regulados pela TDG e os genes com maiores *fold-change* encontrados na comparação entre os grupos com e sem a mutação germinativa p.R337H.

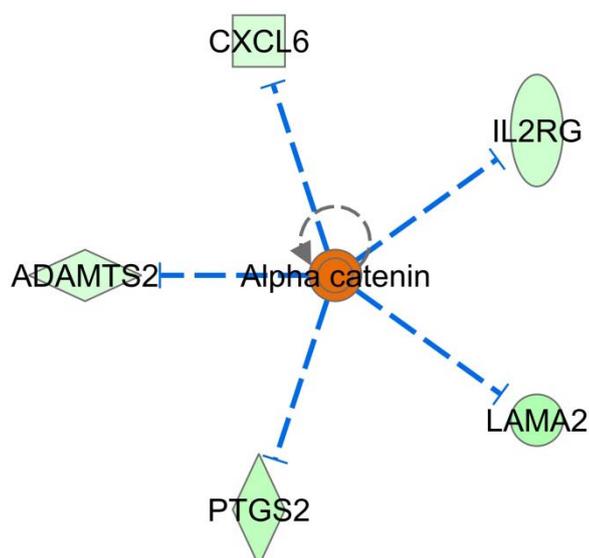


**Figura 12** - Redes gênicas (1 e 4) representando as interações entre os principais genes alterados na comparação entre tumores com e sem a mutação p.R337H. (Vermelho: aumento de expressão; Verde: diminuição de expressão)

Rede	Genes alterados	Score
1	<p> <span style="color: green;">↓</span>ACTN3, <span style="color: green;">↓</span>ALPPL2, <span style="color: green;">↓</span>AMIGO2, <span style="color: red;">↑</span>ANKRD18A, <span style="color: red;">↑</span>APMAP, <span style="color: green;">↓</span>BPY2 (includes others), <span style="color: green;">↓</span>CD1E, DLX5, <span style="color: green;">↓</span>ETAA1, FBP1, HIC1, <span style="color: green;">↓</span>KCTD14, LAPTM5, <span style="color: red;">↑</span>LENG9, LMO7, <span style="color: red;">↑</span>LPO, <span style="color: green;">↓</span>MAGEA9/MAGEA9B, miR-1182 (miRNAs w/seed AGGGUCU), miR-4501 (and other miRNAs w/seed AUGUGAC), <span style="color: green;">↓</span>MUC13, MYO5A, <span style="color: red;">↑</span>MYO5C, MYOZ1, MYPN, PDLIM7, PKN1, POLE4, PVRL2, RAB8A, RASA4, SIPA1L1, UBC, UBE3A, UBE4B, <span style="color: green;">↓</span>WFDC8 </p>	26
2	<p> BCAP29, BRCA1, <span style="color: green;">↓</span>CASD1, <span style="color: red;">↑</span>CSH1/CSH2, ELAVL1, <span style="color: green;">↓</span>FAM117B, Fgf, <span style="color: green;">↓</span>FGF5, FGF8, <span style="color: green;">↓</span>FGF21, <span style="color: red;">↑</span>FGF22, Fgfr, FKBP1A, FOXH1, <span style="color: green;">↓</span>GOLGA5, <span style="color: red;">↑</span>GSC, <span style="color: green;">↓</span>HSD17B11, <span style="color: green;">↓</span>KLHL33, miR-15, miR-16-5p (and other miRNAs w/seed AGCAGCA), miR-4290 (miRNAs w/seed GCCCUCC), MIXL1, MYO5B, OCRL, <span style="color: green;">↓</span>PKD1L3, <span style="color: green;">↓</span>POU4F2, <span style="color: green;">↓</span>RASGEF1B, RNF138, SMAD3, Tgf beta, <span style="color: green;">↓</span>TMEM119, TSPAN5, Vegf, VHL, <span style="color: green;">↓</span>ZNF556 </p>	26
3	<p> <span style="color: green;">↓</span>ACOT12, BCAS2, <span style="color: green;">↓</span>BPIFB4, <span style="color: red;">↑</span>C12orf44, <span style="color: red;">↑</span>CAPN5, CHIC2, CRIP1, <span style="color: red;">↑</span>DNAJB3, GNAZ, HLA-DMA, <span style="color: green;">↓</span>IL2RG, <span style="color: green;">↓</span>KCNH5, KIAA0907, <span style="color: red;">↑</span>KMT2D, <span style="color: green;">↓</span>LAMA2, LAMB1, LAMB2, LAMB3, LAMC3, miR-217-5p (and other miRNAs w/seed ACUGCAU), miR-330-5p (and other miRNAs w/seed CUCUGGG), MYL3, <span style="color: green;">↓</span>NUMB, RAB3C, <span style="color: green;">↓</span>RIMS1, <span style="color: green;">↓</span>SF3B4, SPATA5, <span style="color: red;">↑</span>SPRYD3, STK19, SUGP1, TBC1D32, TFAP2D, <span style="color: red;">↑</span>U2AF2, UBC, WDR41 </p>	24
4	<p> APLNR, ARRB2, <span style="color: red;">↑</span>C11orf84, CACNA1S, Calmodulin, CAMLG, <span style="color: green;">↓</span>CCRN4L, <span style="color: red;">↑</span>COPRS, CRIPT, CYSLTR2, <span style="color: green;">↓</span>DLG1, Gpcr, GPR123, GPR125, HTR2A, IL9, <span style="color: green;">↓</span>INSM2, miR-1268a (and other miRNAs w/seed GGGCGUG), miR-4269 (and other miRNAs w/seed CAGGCAC), miR-4278 (miRNAs w/seed UAGGGGG), <span style="color: green;">↓</span>MLLT4, <span style="color: red;">↑</span>MUC3A, <span style="color: green;">↓</span>NPY2R, PTGER1, <span style="color: green;">↓</span>PVRL4, Relaxin, <span style="color: green;">↓</span>RXFP1, RXFP2, Ryr, <span style="color: red;">↑</span>RYR1, <span style="color: green;">↓</span>SPACA7, <span style="color: green;">↓</span>STRN3, TAS1R2, WDR77, <span style="color: green;">↓</span>WFDC6 </p>	24
5	<p> <span style="color: red;">↑</span>ACTL7B, APP, <span style="color: red;">↑</span>ASCL3, <span style="color: green;">↓</span>BTNL8, <span style="color: green;">↓</span>C15orf43, <span style="color: green;">↓</span>C17orf47, CELF4, CFPD1, CSNK1E, CYB5B, <span style="color: green;">↓</span>DYDC1, <span style="color: red;">↑</span>FAM46C, <span style="color: green;">↓</span>FAM83B, FGD4, <span style="color: green;">↓</span>GAGE1 (includes others), HMBOX1, HSP90AA1, MID2, miR-136-5p (miRNAs w/seed CUCCAUU), miR-17-5p (and other miRNAs w/seed AAAGUGC), NLRC4, NLRP3, <span style="color: red;">↑</span>NLRP4, <span style="color: red;">↑</span>NOVA1, <span style="color: red;">↑</span>NR2C2, PLCD1, PRKD2, <span style="color: red;">↑</span>RGMB, SGIP1, SPATA5, SYNJ2BP, TFF1, TSPAN5, UQCC1, ZDHHC1 </p>	21
6	<p> ASPH, <span style="color: red;">↑</span>BAHD1, CAPN7, CHIC2, <span style="color: green;">↓</span>COL6A6, <span style="color: green;">↓</span>DCDC1, DTX4, FGD4, JAZF1, <span style="color: green;">↓</span>MAP4K3, <span style="color: red;">↑</span>MDGA1, miR-27a-3p (and other miRNAs w/seed UCACAGU), miR-29b-3p (and other miRNAs w/seed AGCACCA), miR-4314 (and other miRNAs w/seed UCUGGGA), miR-4716-3p (and other miRNAs w/seed AGGGGGA), miR-875-5p (and other miRNAs w/seed AUACCUC), MT1H, NR3C1, <span style="color: green;">↓</span>NRP2, <span style="color: green;">↓</span>OMD, <span style="color: red;">↑</span>ONECUT2, PLEKHA6, PLXND1, <span style="color: red;">↑</span>RNF207, SEMA3C, SERINC3, SH3RF1, <span style="color: red;">↑</span>SPINK7, SRGAP2, <span style="color: green;">↓</span>ST18, <span style="color: green;">↓</span>TOX, <span style="color: green;">↓</span>TTC30B, UNC13B, UQCC1, VEGFC </p>	21
7	<p> ATF7IP, CNOT11, CRHR1, DACH1, <span style="color: red;">↑</span>DDX10, <span style="color: green;">↓</span>DMRTC2, DSTN, <span style="color: red;">↑</span>EYA2, GNAI1, GNAI2, GNAI3, <span style="color: red;">↑</span>GNAT1, GNAZ, GPS2, <span style="color: green;">↓</span>GPX6, H2AFZ, HIC1, HNF4A, KIAA0101, <span style="color: green;">↓</span>MAGEB18, <span style="color: green;">↓</span>MAP3K7CL, miR-1207-5p (and other miRNAs w/seed GGCAGGG), NDC80, NUCB1, <span style="color: green;">↓</span>PRODH2, RAP1GAP, <span style="color: green;">↓</span>RGS13, <span style="color: green;">↓</span>RNF133, <span style="color: red;">↑</span>RRBP1, <span style="color: green;">↓</span>S100G, SEMA3C, SREBF2, TP53, UBE2I, <span style="color: green;">↓</span>UGT2B11 </p>	21
8	<p> ADAM11, ADAM12, <span style="color: green;">↓</span>ADAMTS2, AKAP6, Atf, Cbp/p300, CEBPD, <span style="color: green;">↓</span>CXCL6, CXXC1, <span style="color: green;">↓</span>ECT2L, ELAVL4, EP300, ETV4, <span style="color: red;">↑</span>FOXE3, HBP1, IL9, IL15RA, IRF2, <span style="color: green;">↓</span>KCNA1, KLF4, LAMC1, miR-181a-5p (and other miRNAs w/seed ACAUUCA), <span style="color: green;">↓</span>NUTM1, <span style="color: green;">↓</span>NYAP2, PDGFRA, PIK3R1, PIK3R5, PROX1, <span style="color: green;">↓</span>PTGS2, RELA, <span style="color: green;">↓</span>RPTN, <span style="color: green;">↓</span>SCN9A, SHB, <span style="color: red;">↑</span>SLC26A4, VEGFC </p>	17
9	<p> <span style="color: red;">↑</span>C2orf70, miR-484 (and other miRNAs w/seed CAGGCUC) </p>	2

**Figura 13** - Genes com alterações na expressão em cada uma das vias obtidas pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis*. A primeira coluna enumera as diferentes redes, a segunda coluna indica os genes alterados (vermelho: aumento de expressão; verde: diminuição de expressão) e a terceira coluna indica o score de cada rede gênica.

Análises de predição gênica foram realizadas pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* e a via da alfa-catenina apresentou-se alterada nos casos positivos para a mutação p.R337H. Embora o gene da alfa-catenina não tenha sido encontrado alterado quanto ao nível de expressão, diversos genes regulados por ele apresentaram-se desregulados (expressão diminuída) (Figura 14), indicando a importância dessa via e sua relação com a mutação.



**Figura 14** - Genes com baixa expressão (em verde) nas amostras positivas para a mutação p.R337H e preditos de serem regulados pela alfa catenina. Figura gerada pelo programa IPA. Linhas azuis indicam regulação direta e predita na literatura. Em laranja, gene da alfa catenina, possivelmente apresentando expressão aumentada.

### 4.3.2 Análise comparativa entre carcinomas adrenocorticais e *pool* de amostras normais da glândula adrenal

A análise comparativa entre as amostras tumorais e o *pool* de amostras da glândula adrenal identificou 1.262 genes diferencialmente expressos, sendo 569 genes com expressão aumentada e 693 genes com expressão diminuída. Os principais genes alterados com maior *fold-change* estão representados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Vinte genes diferencialmente expressos e que apresentaram os maiores *fold-change* obtidos da análise supervisionada de pacientes com carcinoma adrenocortical e *pool* de amostras normais de glândula de adrenal.

<b>Genes expressão diminuída</b>	<b><i>fold-change</i></b>	<b>Genes expressão aumentada</b>	<b><i>fold-change</i></b>
<i>RPS4Y2</i>	-6,94155	<i>MND1</i>	6,127488
<i>DAPL1</i>	-6,64262	<i>CENPK</i>	5,609154
<i>RPS4Y1</i>	-6,43845	<i>PMAIP1</i>	5,369513
<i>NPY</i>	-6,12089	<i>HMMR</i>	5,124664
<i>TTR</i>	-5,78298	<i>C15orf48</i>	5,084435
<i>PNMT</i>	-5,65355	<i>BUB1</i>	4,955434
<i>PHOX2B</i>	-5,6352	<i>DEPDC1B</i>	4,880333
<i>ALB</i>	-5,51946	<i>SKA3</i>	4,711333
<i>CHRNA3</i>	-5,49989	<i>NCAPG</i>	4,687913
<i>DBH</i>	-5,48255	<i>PBK</i>	4,579659
<i>MYOC</i>	-5,01445	<i>TTK</i>	4,307721
<i>AVPR1A</i>	-5,00646	<i>ORC6</i>	4,23096
<i>DEFA3</i>	-4,88693	<i>ASPM</i>	4,165642
<i>TH</i>	-4,8827	<i>CDK1</i>	4,109759
<i>CELF3</i>	-4,81614	<i>DTL</i>	3,984648
<i>ADH1A</i>	-4,76964	<i>ZNF404</i>	3,897793
<i>LRRC38</i>	-4,63859	<i>CEP55</i>	3,851176
<i>LUZP2</i>	-4,57262	<i>BIRC5</i>	3,818644
<i>IGFBP6</i>	-4,52282	<i>CDKN3</i>	3,758733
<i>SPON1</i>	-4,48121	<i>TOP2A</i>	3,56888

Foi verificado em bancos de interação proteína-proteína que o *JUN*, selecionado como um dos possíveis genes possivelmente regulados pela TDG, interage fisicamente com o gene *TOP2A*, um dos genes identificados com aumento de expressão nos tumores. Tal interação pode resultar em uma proximidade entre os genes identificados como diferencialmente expressos e aqueles que possivelmente tem uma relação com a TDG.

Foi realizada correlação entre os dados obtidos no estudo e os dados clínicos dos pacientes portadores dos tumores estudados (Quadro 8). Foram avaliados 11 tumores provenientes de pacientes com ADR. Destes, cinco tinham mutação germinativa, sendo quatro p.R337H e um com a mutação NM\_000546.4: c.919+1G>A. Dois pacientes não tinham mutação germinativa no gene *TP53* e quatro não foram testados para todos os éxons codificantes do gene *TP53*. Dentre os portadores de mutações conhecidas, um dos pacientes foi a óbito pouco tempo após o diagnóstico, já em estadió avançado. Os outros quatro portadores não desenvolveram metástases da doença e estão vivos, com média de seguimento de 6,2 anos livres de doença.

**Quadro 8** - Características clínicas e biológicas dos pacientes com carcinoma adrenocortical.

ID	Sexo	p.R337H tumor	Mutação germinativa TP53	Status	Metástase do ADR	Idade ao diagnóstico	Seguimento (Anos)	Outros tumores primários (idade em anos)	Tumores em familiares (parentesco, idade em anos)
GSR4T	M	(-)	(-)	Vivo	Não	24	10	Não	Não
LFS219B	F	(-)	(-)	Vivo	Não	20	8	Não	Não
GSR31T	F	(-)	n/d	Vivo	Não	30	2	Não	n/d
GSR34T	F	(-)	n/d	(P/S)	(P/S)	46	(P/S)	Endometriário (42)	n/d
GSR6TA	M	(-)	n/d	Óbito	Óbito	43	Óbito	Não	n/d
GSR30T	M	(-)	n/d	Vivo	Não	65	1	Não	Próstata (tio materno, 70)
GSR27T	F	(-)	c.919+1G>A	Vivo	Não	6 meses	3	Não	Sarcoma (pai, 1, 27 e 36), leucemia (avô paterno, 75), mama (tia paterna, 27)
LFS396T	F	(+)	c.1010 G>A p.R337H	Vivo	Não	10	8	Linfoma H(7), SPM (10, 12, 14, 16), Renal (17)	SNC (irmão, 19), Renal (pai, 40), SNC (avô paterno, 5)
MT24TA	M	(+)	c.1010 G>A p.R337H	Vivo	Não	50	8	Prostata (50)	Renal (irmã, 61)
GSR32T	F	(+)	n/d	Vivo	Não	63	1	Leucemia (53)	Estômago (pai, 50), mama (irmã, 55), osso (tia paterna, n/d)
GSR1T	F	(+)	n/d	Óbito	Óbito	4	Óbito	Não	Não disponível

Legenda: (F) feminino; (M) masculino; (SPM) sarcoma de partes moles; (SNC) sistema nervoso central; (Linfoma H) linfoma de Hodgkin; (ADR) carcinoma adrenocortical; (n/d) não disponível; (-) Negativo; (+) Positivo; (P/S) perda de seguimento.

### 4.3.3 Meta-análise

Para comparar se a expressão de transcritos obtidos da análise comparativa entre as amostras tumorais e o *pool* de amostras da glândula adrenal corroboram com os estudos de carcinomas adrenocorticais da literatura, foi realizada uma meta-análise considerando seis estudos publicados. A Tabela 10 mostra as informações de cada um dos relatos da literatura utilizados e que apresentavam dados disponíveis no GEO (*Gene Expression Omnibus*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). A comparação entre os genes diferencialmente expressos entre amostras tumorais vs. normais identificou 569 genes com expressão aumentada e 693 genes com expressão diminuída, e revelou concordância entre 253 genes em no mínimo três estudos, sendo 126 genes com expressão diminuída e 127 genes com expressão aumentada. No presente estudo foram considerados os 15 genes que apareceram em pelo menos cinco dos seis relatos da literatura. Os dados estão apresentados na Tabela 3.

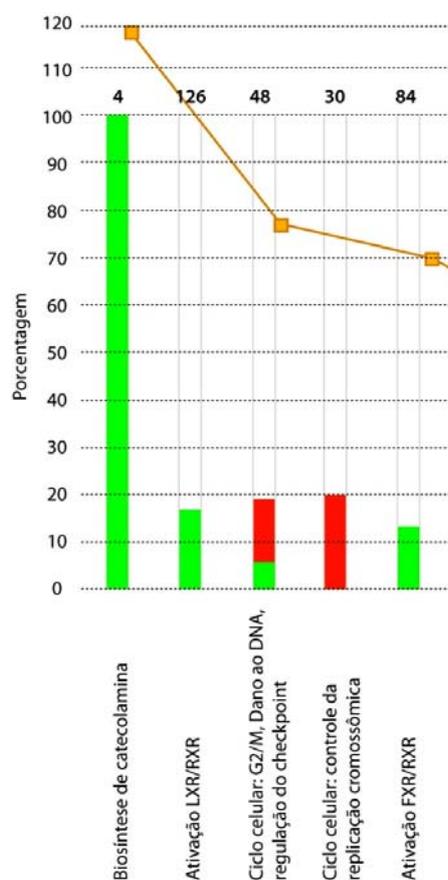
**Tabela 3** - Genes identificados em cinco ou mais estudos da meta-análise.

Gene	Estudo	<sup>1</sup> GSE10927	<sup>2</sup> GSE12368	<sup>3</sup> GSE19775	<sup>4</sup> GSE19776	<sup>5</sup> GSE28476	<sup>6</sup> GSE33371
<i>CDKN3</i>	3.40	1.45	5.45	1.21	2.26		1.46
<i>ZNF600</i>	1.81	1.10		0.67	2.67	0.32	1.10
<i>DENND2A</i>	-1.52	-1.10		-1.06	-1.26	-0.34	-1.10
<i>TLE2</i>	-1.93	-1.20	-0.54	-0.80	-2.76		-1.20
<i>LRRC32</i>	-2.22	-1.30		-0.62	-2.40	-0.32	-1.31
<i>SETBP1</i>	-2.23	-1.30	-0.39		-1.82	-0.33	-1.30
<i>FAM65C</i>	-2.25	-1.23	-0.33		-2.85	-0.34	-1.24
<i>EHD3</i>	-2.31	-1.15		-0.65	-2.63	-0.33	-1.16
<i>NR2F1</i>	-2.42	-1.40	-0.34	-1.53	-2.03		-1.40
<i>ADH1B</i>	-2.78	-1.58	-0.26	-2.00	-1.61		-1.59
<i>FMO2</i>	-3.00	-1.81	-0.34	-1.93	-2.85		-1.82
<i>WFDC1</i>	-3.37	-1.93		-1.41	-1.92	-0.33	-1.94
<i>PTH1R</i>	-3.55	-1.55	-0.43		-2.88	-0.35	-1.56
<i>IGFBP6</i>	-3.85	-1.66		-1.28	-2.58	-0.32	-1.66
<i>C14orf132</i>	-2.98	-1.27	-0.16	-2.27	-3.10	-0.35	-1.27

<sup>1</sup> Giordano et al. (2009); <sup>2</sup> Soon et al. (2009); <sup>3-4</sup> Demeure et al. (2013); <sup>5</sup> Durand et al. (2011); <sup>6</sup> Heaton et al. (2012).

#### 4.3.4 Comparação dos dados deste estudo e da meta-análise

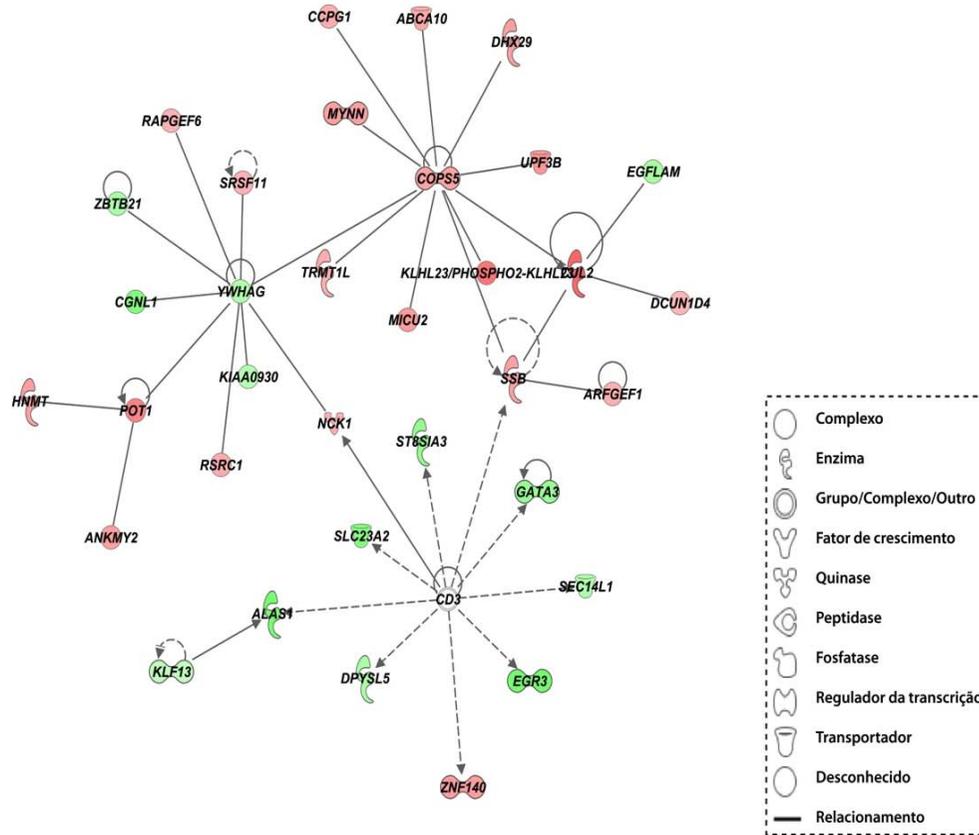
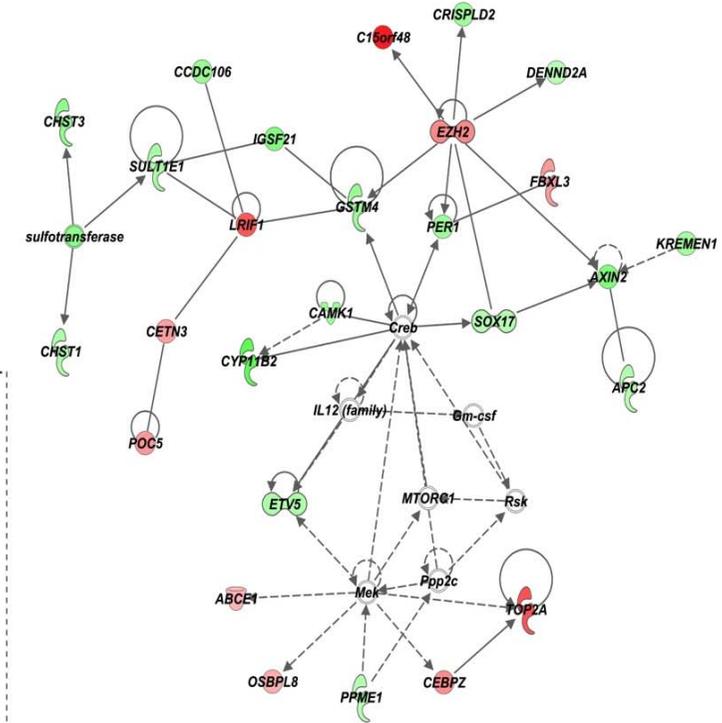
Análises de vias canônicas realizadas pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* indicaram cinco principais vias (Figura 15). A principal via canônica desregulada é a via da catecolamina, seguida das vias da ativação LXR/RXR; ciclo celular: G2/M, dano ao DNA, regulação do *checkpoint*; ciclo celular: controle da replicação cromossômica; e ativação FXR/RXR.



**Figura 15** - Vias canônicas correlacionando os genes diferencialmente expressos com média dos valores das sondas para cada gene. Os scores para cada via são calculados pelo teste exato de *Fischer* e são iguais a  $-\log$  (valor de *P*). A linha laranja representa o limiar definido pelo IPA. Imagens geradas pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

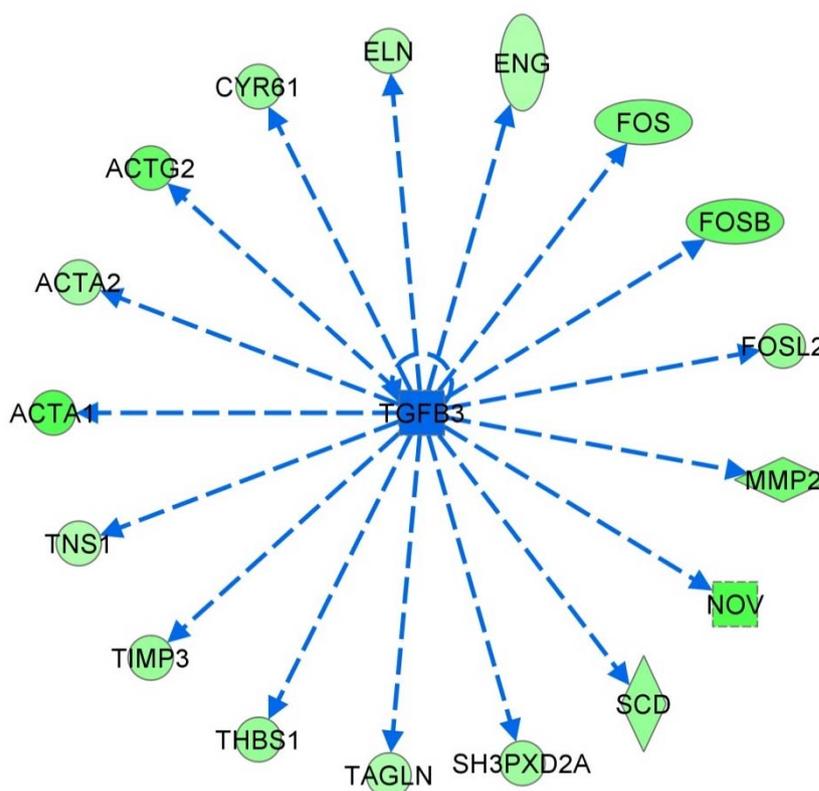
A análise de redes gênicas identificou 25 redes com scores significativos (score médio 26,6) para os 1.262 genes avaliados. A Figura 16 ilustra as duas principais redes envolvendo os genes diferencialmente expressos (score: 42 e 27 respectivamente). A rede A apresenta diversos genes importantes como o *COPS5* que está com a sua expressão aumentada e que interage com os genes *CCPG1*, *ABCA10*, *DXH29*, *MYNN*, *UPF3B*, *TRMT1L*, *KLHL23* e *MICU2*.

É interessante notar que o gene *SSB*, envolvido com a modificação de tRNA e identificado no presente estudo com expressão aumentada apresentou baixo número de interações, porém faz a ligação entre dois genes com alto número de conexões, *COPS5* e *CD3*. O mesmo foi identificado para o gene *NCK1*, que interage com dois genes altamente conectados, *YWHAG* e *CD3*. Com relação a rede B, é possível observar que o gene *DENND2A* também encontrado na meta-análise apresenta expressão diminuída. Essa mesma rede possui diversos genes alterados que são importantes na carcinogênese, dentre eles a *TOP2A* com a sua expressão aumentada e o *SOX17* com a sua expressão diminuída.

**A****B**

**Figura 16** - Redes gênicas A e B (2 e 12) representando as interações entre os principais genes alterados na comparação entre carcinomas adrenocorticais e adrenal normal. (Vermelho: aumento de expressão; Verde: diminuição de expressão)

Análises de predição gênica foram realizadas pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis*, e o gene *TGFB3* foi predito como inibidor de uma série de genes diferencialmente expressos (*ELN*, *ENG*, *FOS*, *FOSB*, *FOSL2*, *MMP2*, *NOV*, *SCD*, *SH3PXD2A*, *TAGLN*, *THBS1*, *TIMP3*, *TNS1*, *ACTA1*, *ACTA2*, *ACTG2* e *CYR61*) obtidos da comparação entre amostras tumorais e normais do estudo (Figura 17). Interessantemente, o gene *TGFB3*, que apresentou expressão diminuída nas amostras tumorais deste estudo, também foi encontrado em três dos seis trabalhos utilizados na meta-análise.



**Figura 17** - Genes com baixa expressão (em verde) nas amostras tumorais e preditos de serem regulados pelo gene *TGFB3*. Figura gerada pelo programa IPA. Linhas azuis indicam regulação direta e predita na literatura.

## 5 DISCUSSÃO

A Síndrome de Li-Fraumeni e sua variante, Li-Fraumeni *Like*, estão associadas com a predisposição hereditária ao câncer na qual portadores têm 90% de risco para o desenvolvimento de algum tipo de câncer ao longo de suas vidas (NAGY et al. 2004). As mutações germinativas no gene *TP53* estão presentes em 70% dos casos de LFS clássica (VARLEY et al. 1997) e em 29% das famílias LFL, de acordo com o critério de Chompret (BOUGEARD et al. 2008). No Brasil é frequente a ocorrência de uma mutação fundadora no gene *TP53*, a p.R337H, no domínio de oligomerização (DI GIMMARINO et al. 2002). No sul e sudeste do Brasil, a frequência estimada da mutação p.R337H alcança 0,3% da população, e a incidência do carcinoma adrenocortical chega a ser 10 a 15 vezes maior do que a descrita em outros países (SANDRINI et al. 1997, CUSTODIO et al. 2013). Em 2006, ACHATZ et al. identificaram a presença desta mutação em famílias brasileiras com LFL, abrindo a discussão sobre o espectro de tumores que esta mutação predispõe. No presente estudo, também foi observada uma alta taxa da mutação p.R337H. Em 11 casos de carcinomas adrenocorticais avaliados, quatro (36,6 %) apresentaram a mutação.

A proteína p53 é responsável pela regulação da transcrição da TDG. A TDG é uma glicosilase especializada que remove a uracila e a timina do pareamento incorreto entre G-U ou G-T, atuando como a primeira enzima da via de reparo por excisão de bases. Além do papel da TDG no reparo à

danos do DNA, foi demonstrado que a mesma está envolvida na regulação de eventos epigenéticos e que pode interagir com fatores de transcrição, DNA metiltransferases e histonas acetiltransferases para proteger as ilhas CpG de hipermetilação. Além disso, por sua atividade glicosilase, a TDG desempenha um papel ativo na remoção de 5mC e, assim, leva a ativação de genes por desmetilação (GALLAIS et al. 2007; LI et al. 2007; COSTA et al. 2012). A TDG ainda possui uma grande atividade durante a fase de desenvolvimento (CORTÁZAR, et al. 2011). Além disso, tem sido demonstrado que a TDG regula epigeneticamente vários genes que são importantes durante o desenvolvimento e determinação celular, como por exemplo, os genes das famílias *homeobox* e outros fatores de transcrição (CORTÁZAR, et al. 2011). Neste estudo, diversos genes candidatos foram selecionados para avaliação do padrão de metilação baseado neste princípio.

Os genes escolhidos neste estudo são genes relacionados ao desenvolvimento e embriogênese e foram selecionados pela sua provável interação com a proteína TDG, sendo oito genes avaliados: (1) os genes *SOX2* e (2) *OCT4* são genes relacionados à pluripotência; (3) o gene *HOXD8*, que além de ser um membro da família *homeobox*, é um fator de transcrição que desempenha um papel importante na morfogênese; (4) o gene *SOX17* que é um importante regulador do desenvolvimento; (5) o gene *CDKN2A* relacionado ao controle da senescência replicativa; (6) o gene *FOXA1*, que é um fator de transcrição relacionado ao desenvolvimento embrionário, (7) o gene *JUN* que é um importante proto-oncogene e (8) o

*NKX2-2* cujo produto tem um domínio *homeobox* e que também pode estar envolvido com a morfogênese.

O padrão de metilação dos genes candidatos (*CDKN2A*, *FOXA1*, *HOXD8*, *JUN*, *NKX2-2*, *OCT4*, *SOX2* e *SOX17*) possivelmente regulados pela TDG foram avaliados em amostras de sangue periférico de pacientes portadores de mutações germinativas no gene *TP53* e em um grupo controle. Sabe-se que pacientes portadores de LFS podem apresentar diversos tipos tumorais em um amplo espectro de idade.

Como pacientes LFS/LFL em grande parte apresentam mutações germinativas no gene *TP53*, e que portadores da mesma mutação nem sempre desenvolvem o mesmo fenótipo, avaliar o padrão de metilação dos genes candidatos em sangue periférico seria uma alternativa eficaz e não invasiva para o entendimento da variabilidade no espectro tumoral e/ou da idade de acometimento por tumores em portadores da síndrome. Alterações no padrão de metilação de genes possivelmente regulados pela TDG poderiam agir como modificadores de risco.

Uma das hipóteses era que a presença de alterações no padrão de metilação em pacientes que são portadores da mesma mutação poderia ser um dos fatores que explicariam a diferença dos tumores desenvolvidos e a idade de aparecimento dos mesmos. No entanto, alterações nos níveis de metilação dos genes candidatos não foram confirmadas nas amostras avaliadas (Figura 8). Apesar de tratar-se de uma das maiores coortes de pacientes LFS/LFL portadores de mutações germinativas, o número de

pacientes que preenchem os critérios de inclusão para o estudo pode ter sido restrito.

Nenhum dos genes avaliados em pacientes LFS/LFL demonstrou hipermetilação em relação aos controles, sugerindo que a TDG não exerce papel na regulação da metilação dos genes candidatos avaliados ou que os genes candidatos não foram adequados, pois nem todos os genes possivelmente regulados pela TDG foram avaliados neste estudo, o que representa uma limitação na definição da sua real participação na variabilidade do fenótipo. Portanto, a utilização de uma plataforma que avaliasse o perfil de metilação global seria mais eficaz para este tipo de análise. Vale ressaltar também que a metilação é labil, e fatores como hábitos e idade dos pacientes podem interferir. A condução de um estudo que analisasse pacientes pareados com um grupo de referência para as mesmas características seria ideal para esse tipo de avaliação, contudo por tratar-se de uma síndrome rara, tal trabalho torna-se difícil.

Foi demonstrado em literatura que em células-tronco embrionárias, a TDG se associa ao promotor do gene *OCT4* (relacionado à característica de pluripotência) regulando a sua expressão via metilação do DNA. Porém o mesmo não foi observado em células em processo de diferenciação (CORTAZAR et al. 2011). Concordante com estes dados, o resultado observado no presente estudo (com células já diferenciadas) não mostra diferença na metilação do promotor de *OCT4*.

Estudo recente realizado por DA COSTA et al. (2012) demonstrou que a expressão de TDG é diretamente regulada pela proteína p53 selvagem, o

que sugere que a perda da função de p53 pode afetar os processos mediados por TDG. Sabe-se que a perda de função de p53 pode levar a um impacto negativo sobre a estabilidade genética e epigenética da célula, via desregulação de diversos genes.

Dentre os diversos mecanismos que podem alterar as funções do gene *TP53*, pouco se conhece sobre o impacto da mutação p.R337H, altamente frequente na população brasileira. Um dos objetivos deste estudo foi avaliar o possível efeito da mutação p.R337H nos níveis de expressão da *TDG*. Buscamos avaliar se a expressão da *TDG* em amostras de carcinomas adrenocorticais de quatro pacientes portadores da mutação germinativa p.R337H no gene *TP53* e de sete pacientes sem a mutação, no entanto, apenas duas amostras positivas puderam ser avaliadas e desta forma, não foi possível realizar uma análise estatística adequada com estes dados, embora tenha sido possível verificar um aumento de expressão da *TDG* nas duas amostras positivas para p.R337H. NETTERSHEIM et al. (2013) avaliaram os níveis de expressão das enzimas desmetilantes TET e *TDG* em tumores derivados de células germinativas e encontraram altos níveis de *TDG* e *TET* nesses tipos de câncer. Embora o número de amostras seja limitado, os dados do estudo mostram que a *TDG* teve aumento de expressão em casos de carcinomas adrenocorticais provenientes de pacientes portadores da mutação p.R337H.

Há poucos estudos em literatura sobre os níveis de *TDG* em tumores. PENG et al. (2006) relataram que a hipermetilação de *TDG* e consequente diminuição de sua expressão leva a deficiência de reparo em linhagens de

mieloma múltiplo. De modo similar, YATSUOKA et al. (1997) avaliaram os níveis de expressão de mRNA em 21 linhagens de câncer de pâncreas e encontraram diminuição de expressão de *TDG*. Interessantemente, os próprios níveis de expressão de *TDG* parecem ser epigeneticamente regulados por DNA metil-transferases, principalmente a *DNMT3L* (KIM et al. 2010) e pela família de miRNA-29 (MORITA et al. 2013). Uma das principais limitações nesta análise é que dentre amostras de ADR, apenas sete das onze amostras estudadas foram avaliadas para todo o gene *TP53*. Análises das quatro outras amostras ainda estão em andamento. É importante ressaltar que esta é uma limitação de nossos resultados, pois é possível que dentre os outros quatro pacientes, haja mutações no gene *TP53* em outros éxons.

O segundo objetivo do estudo foi analisar a expressão gênica global em carcinomas adrenocorticais de pacientes com e sem a mutação p.R337H, a fim de verificar quais genes estavam alterados quando esta condição estava presente. Além disso, foi realizada a análise para avaliar se os genes possivelmente regulados pela TDG estariam alterados.

Na análise supervisionada foi realizada a comparação entre os grupos com e sem a mutação. Foram identificados 135 genes alterados, 94 com expressão diminuída e 41 com expressão aumentada. Dentre os principais genes alterados, foi identificado o gene *AMIGO2*, mapeado em 12q13.11. O produto codificado por este gene é uma molécula de adesão com domínio de imunoglobulina que participa da regulação negativa da apoptose e adesão celular. Em uma meta-análise com 220 amostras (126 tumores

primários e 84 metastáticos), relatada por TSOI et al. (2011) e envolvendo tumores gástricos, rim, próstata, cólon, células escamosas orais e cervicais, o gene *AMIGO2* foi identificado com um potencial marcador para o desenvolvimento de metástases. Segundo RABENAU et al. (2004) o produto deste gene pode contribuir para a sinalização por meio do seu domínio intracelular. Os autores relataram que este gene se encontra diferencialmente expresso em 45% dos tumores gástricos em comparação com o tecido normal. No presente estudo, o gene *AMIGO2* foi identificado com expressão diminuída em carcinomas adrenocorticais positivos para a mutação p.R337H em comparação com o grupo de amostras negativas. Dentre os pacientes positivos para a mutação germinativa p.R337H avaliados nesse estudo, 75% não desenvolveram metástase, então é possível que os baixos níveis de transcritos codificadores em amostras positivas para a mutação estejam relacionados ao menor potencial de invasão e metástase em carcinomas adrenocorticais.

No presente estudo o gene *LAMA2* foi identificado com expressão 4,2 vezes menor em amostras de pacientes positivos para a mutação p.R337H. O produto do gene *LAMA2* apresenta funções relacionadas a adesão celular, a organização da matriz extracelular e a regulação da migração celular. O produto deste gene (mapeado em 6q22-q23) atua em diversas vias importantes como a via PI3K-AKT, via das integrinas e via da Rho GTPase. Segundo NI et al. (2012), a expressão diminuída de *LAMA2* foi identificada em amostras tumorais de laringe quando comparadas à amostras normais. Em um estudo com 134 amostras de carcinoma

colorretal, LEE et al. (2012) identificaram o gene *LAMA2* com altos níveis de metilação (80,6%) em comparação com tecido normal adjacente, sugerindo que a hipermetilação desse gene possa desempenhar papel importante na tumorigênese e ser utilizada como um biomarcador para esse tipo de carcinoma.

O produto codificado pelo gene *PTGS2*, mapeado na região 1q25.2-q25, catalisa a conversão do ácido araquidônico livre em prostaglandina H<sub>2</sub> (precursor de outras prostaglandinas e de tromboxanos). Estes compostos são essenciais na regulação da proliferação celular, angiogênese, resposta imune e inflamação, podendo contribuir para o desenvolvimento e progressão de neoplasias (CHANDRASEKHARAN et al. 2004). Além disso, esse gene participa de diversas vias importantes como a via do NF-kappa $\beta$ , ácido araquidônico, cálcio e lipídios. Estudos recentes descrevem que o gene *PTGS2* tem sua expressão aumentada em pacientes com carcinomas colorretais (LIN et al.2013; ROELOFS et al. 2014). Sua expressão aumentada também foi relacionada à progressão do câncer de mama, além de estar relacionada ao pior prognóstico (BOCCA et al. 2013). Neste estudo, pacientes portadores da mutação p.R337H foram identificados com níveis de expressão desse gene 3,5 vezes menor quando comparados a pacientes que não possuem a mutação, podendo ser um importante marcador em tumores adrenocorticais de pacientes com a mutação p.R337H.

Outro gene com baixa expressão nos portadores da mutação p.R337H (2,5 vezes menos expresso) é o gene *IL2RG* (receptor gama da interleucina 2). O produto deste gene é conhecido como a cadeia gama

comum a receptores de interleucina (BRANDT et al. 2007). A IL2 afeta o crescimento e a diferenciação das células T, células B, células *natural killers* (NK), células de glioma e células da linhagem dos monócitos após interação específica com seus receptores. A *IL2RG* foi descrita com a sua expressão diminuída em pacientes com carcinoma de pulmão de células não pequenas quando comparados a um grupo de indivíduos saudáveis (CHEN et al. 2013). Segundo estudos de ZHANG et al. (2011), a expressão de *IL2RG* aparece inibida em células T de linfoma e é regulada por metilação e pela ação de miRNAs. No presente estudo esse gene foi aproximadamente 2,5 vezes menos expresso em amostras de pacientes portadores da mutação p.R337H, indicando que diferentes mecanismos podem ser responsáveis pelo controle da expressão do *IL2RG* durante o desenvolvimento do ADR, o qual é um dos principais tumores relatados na LFS/LFL.

No presente estudo, o gene *ADAMTS2* estava com expressão 2,6 vezes diminuída em pacientes portadores da mutação p.R337H em comparação com pacientes sem a mutação. Este gene aparece envolvido em vários processos biológicos, incluindo a formação da estrutura do tecido conjuntivo e a migração celular. Em 2004, PORTER et al. descreveram que os níveis de expressão desse gene não demonstraram diferenças significativas na comparação entre carcinoma de mama e tecido mamário não neoplásico. Mutação em *ADAMTS2* foi relacionada à Síndrome de Ehlers–Danlos tipo VII C (doença hereditária do tecido conjuntivo) devido ao defeito no processamento do procolágeno tipo I para colágeno (LE GOFF et al. 2011). As semelhanças de domínio e de sequência entre *ADAMTS2* e

outros membros da família anti-angiogênica, como *ADAMTS1* e *ADAMTS8*, também sugerem um possível papel na angiogênese. Baseado nessa hipótese, DUBAIL et al. (2010) demonstraram que o gene *ADAMTS2* inibia a proliferação de células endoteliais via VEGF, incluindo as células endoteliais microvasculares humanas (HMVEC) e células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVEC). Este efeito mostrou ser específico para células endoteliais, uma vez que a proliferação de células de músculo liso e fibroblastos não foi afetada. Além disso, também foi mostrado que *ADAMTS2* era responsável pela indução da apoptose e prevenção da formação de estruturas tubulares em HUVEC e impedia a montagem de células-tronco embrionárias em estruturas vasculares dentro de corpos embrióides, estimuladas por VEGF. É possível que níveis reduzidos do transcrito *ADAMTS2* inibam a proliferação de células endoteliais via VEGF, novamente indicando que os tumores com a mutação em *TP53* devem apresentar um prognóstico mais favorável do que aqueles negativos para mutação.

Um gene membro da família das quimiocinas CXC, o *CXCL6*, apresentou expressão duas vezes diminuída no grupo de portadores da mutação p.R337H. Esse gene foi identificado com a sua expressão aumentada em pacientes com osteossarcoma na infância comparado a tecido normal (LI et al. 2011). Vale ressaltar que este é um tumor característico da síndrome de Li-Fraumeni na infância (HISADA et al. 1998). Alta expressão do gene *CXCL6* também foi relacionada com crescimento tumoral e angiogênese (RUBIE et al. 2008), porém neste estudo este gene

apresentava-se com expressão diminuída na presença da mutação, indicando outra vez o efeito protetor desta alteração.

Dentre os genes com expressão aumentada na presença da mutação p.R337H encontra-se o gene *EYA2*, mapeado em 20q13.1, o qual codifica uma proteína expressa durante o desenvolvimento muscular em associação com os fatores de transcrição PAX3 e SIX1 (HEANUE et al. 1999) e também está envolvido na apoptose (CLARK et al. 2002). A elevada expressão desse gene parece ser capaz de promover o crescimento de tumores de ovário (ZHANG et al. 2005). No presente estudo, os pacientes portadores da mutação apresentaram os níveis de expressão desse gene cinco vezes maior do que os pacientes que não tinham a mutação, demonstrando que este gene pode contribuir para o crescimento de tumores adrenocorticais.

O gene *RRBP1* apresentou níveis de expressão 4,5 vezes maior em pacientes portadores da mutação p.R377H. Em tumores de mama, este gene apresentou expressão diminuída (TELIKICHERLA et al. 2007). O mesmo foi observado em relação ao gene *ANKRD18A* (localizado na região 9p13.1), que apresentou nível de expressão quatro vezes maior em pacientes portadores da mutação p.R377H, mas que apresentou expressão diminuída em câncer de pulmão (LIU et al. 2012).

O gene *MDGA1* apresentou 3,5 vezes mais expresso em pacientes que eram portadores da mutação p.R337H. Em relação a este gene, foi realizado um estudo avaliando os níveis de sua expressão em vários tipos tumorais, dentre eles útero, pulmão e mama, comparados com os seus respectivos tecidos normais. Em todos os casos, os tecidos tumorais

apresentavam expressão aumentada, o que sugeria que o gene poderia estar envolvido com o processo tumoral (DE JUAN et al. 2002). Este gene pode ter papel na proliferação celular anormal, assim como pode ter o mesmo perfil em diferentes tipos tumorais.

Neste trabalho, o gene *MLL2* apresentou uma expressão 1,5 vezes aumentada em pacientes que eram portadores da mutação p.R337H. Em 2013, o gene *MLL2* foi identificado com a expressão diminuída em pacientes com câncer de mama quando comparados a tecido normal (RABELLO et al. 2013).

Logo, de acordo com os resultados obtidos na análise de expressão gênica em larga escala, diversos genes que apresentavam expressão aumentada em carcinomas adrenocorticais de pior prognóstico, tiveram sua expressão diminuída em portadores da mutação p.R337H, enquanto que genes que habitualmente estavam com a expressão diminuída em diferentes tipos tumorais com prognóstico desfavorável descritos em literatura, apresentavam expressão aumentada em portadores desta mutação. Este fato pode estar relacionado a um melhor prognóstico nos pacientes LFS/LFL portadores desta mutação. Assim, a presença da mutação direciona vias moleculares distintas daquelas descritas em tumores esporádicos. Portanto, apesar do alto risco para o desenvolvimento do tumor, o paciente LFS/LFL possivelmente tem melhor prognóstico e, conseqüentemente, melhor sobrevida que os portadores de tumores esporádicos.

Em resumo, os achados indicam que os tumores de pacientes com mutações em *TP53* tem assinaturas genéticas distintas quando comparados

aos tumores esporádicos. Como consequência, estes tumores devem ter estratégias de tratamento diferenciadas em relação aos tumores esporádicos.

Foi realizada uma análise para confirmar se havia alguma interação entre os genes candidatos avaliados nas análises de metilação deste estudo e os genes identificados com maior *fold-change* na análise de expressão global onde foi feita a comparação entre positivos e negativos para a mutação p.R337H. A relação destes genes com a via da TDG foi verificada em bancos de interação proteína-proteína. Nenhuma interação física foi identificada entre os genes potencialmente relacionados com a via TDG e os genes com maiores *fold-change* encontrados na comparação entre os grupos com e sem a mutação germinativa p.R337H.

Posteriormente, foi realizada uma análise de predição de genes pelo software *Ingenuity Pathways Analysis* e foi verificado que diversos genes regulados pela alfa-catenina apresentavam baixa expressão em tumores p.R337H positivos. Dentre as moléculas relacionadas à adesão celular, encontra-se a alfa-catenina, uma proteína de ligação entre as caderinas e os filamentos contendo actina do citoesqueleto (ABERLE et al. 1996). Sabe-se que a dissociação e aquisição de motilidade celular afetam os passos iniciais da invasão e metástase. Embora não tenha sido encontradas alterações na expressão do gene que codifica a alfa catenina, a análise de predição indicou um possível aumento de expressão desta proteína nos casos positivos para p.R337H. A validação destes genes por imunohistoquímica

nos tumores será fundamental em estudos futuros e poderá confirmar estes achados.

Os relatos da literatura indicam a baixa expressão da alfa-catenina em casos de pacientes com pior prognóstico para diversos tipos tumorais. A expressão reduzida de alfa-catenina foi relacionada à agressividade e progressão tumoral em carcinomas de mama (MORROGH et al. 2012) e cabeça e pescoço (TANAKA et al. 2003). De acordo com MORGAN et al. (2013), a baixa expressão de  $\alpha$ - e  $\beta$ -catenina são marcadores putativos para distinguir o câncer de próstata localizado da doença metastática agressiva. Os resultados de expressão gênica da comparação entre tumores ocorridos em portadores e não portadores da mutação p.R337H, assim como os resultados obtidos da análise de predição apontam para o possível efeito protetor da mutação p.R337H, hipótese ainda não levantada em literatura.

Foi observado que não há uma interação direta entre os genes relacionados com a alfa-catenina e *TDG*. Entretanto há uma interação entre o gene *PTGS2* (que faz interação com a alfa-catenina) e o gene *TP53*. Com a ausência de resultados significativos nos estudos conduzidos nos genes candidatos deste estudo, será de grande importância em estudos futuros avaliar o gene *PTGS2*, que demonstrou estar envolvido com a via do *TP53* e conseqüentemente com a TDG, podendo ser um candidato potencial para ser um modificador do fenótipo.

Foi realizada neste estudo uma análise para identificação dos genes diferencialmente expressos nos ADR em relação ao tecido normal da glândula adrenal (*pool* de 62 amostras). Esta análise identificou 1.262 genes

diferencialmente expressos, sendo 569 genes com expressão aumentada e 693 genes com expressão diminuída. Dentre os genes com maiores *fold-change* identificados nesta análise (Tabela 2), muitos já tinham sido previamente descritos em carcinomas adrenocorticais (GIORDANO et al. 2003; VELAZQUEZ-FERNÁNDEZ et al. 2005; WEST et al. 2007; DE REYNIES et al. 2009).

Dentre os principais genes com aumento de expressão nos tumores encontra-se o *TOP2A*, que codifica a topoisomerase II $\alpha$ , alvo molecular direto das antraciclinas. Esse gene está frequentemente co-amplificado com o *HER-2* no câncer de mama e há vários estudos que concordam que o gene *TOP2A* tem um valor preditivo para a eficácia das antraciclinas para o tratamento do câncer de mama primário e metastático (ARRIOLA et al. 2007). Em 2007, WEST et al. fizeram uma análise do perfil de expressão gênica em pacientes com tumores adrenocorticais (adenomas e carcinomas) na infância comparados ao tecido de adrenal normal. Nesta análise, o gene *TOP2A* foi identificado com expressão aumentada. Foi realizado também um estudo onde foi comparado o perfil de expressão gênica entre os carcinomas e adenomas adrenocorticais, e nesse caso o gene *TOP2A* foi identificado com expressão aumentada em pacientes com carcinomas (FERNANDEZ-RANVIER et al. 2008). Recentemente JAIN et al. (2013) confirmaram a expressão aumentada do gene *TOP2A* em carcinomas adrenocorticais quando comparados à adenomas e tecidos normais. Os autores sugerem que esse gene é um potencial alvo terapêutico para o carcinoma adrenocortical (JAIN et al. 2013). Nossos dados corroboram com os dados

da literatura, onde o gene *TOP2A* foi identificado com expressão aumentada nas amostras tumorais.

Outro gene encontrado com expressão aumentada neste estudo é o *BIRC5*, um membro da família IAP (*inhibitor of apoptosis*) que desempenha um papel fundamental na regulação da apoptose e divisão celular (TAMM et al. 1998, LI et al. 1998). Os achados deste estudo são concordantes com outros relatos da literatura. GIORDANO et al. (2009) analisaram o perfil de expressão gênica comparando pacientes com carcinomas adrenocorticais com adenomas e tecido normal de adrenal. O gene *BIRC5* foi identificado com expressão aumentada nos pacientes com o tumor. Em outro estudo que realizou análise de expressão em pacientes com carcinomas adrenocorticais comparados a adenomas, o gene *BIRC3*, pertencente à família dos IAPs, também foi identificado com expressão aumentada nos tumores (VELAZQUEZ-FERNANDEZ et al.2005).

O produto do gene *BUB1B*, também envolvido na regulação do ciclo celular, controla o *checkpoint* mitótico e a segregação cromossômica (CHAN et al. 1999; WANG et al. 2004). Quando associado ao gene *PINK1*, *BUB1B* é um sinal de melhor sobrevida global em portadores de carcinomas adrenocorticais (REYNIÈS et al. 2009). Um estudo que avaliou os níveis de expressão gênica comparando carcinomas adrenocorticais a adenomas e tecidos normais de adrenal, identificou um padrão de expressão aumentado do gene *BUB1B* nos indivíduos portadores de tumor (GIORDANO et al. 2003). Este dado é concordante com os achados do presente estudo onde a

expressão do gene *BUB1B* estava aumentada nos casos de carcinoma adrenocorticais em relação ao caso de adrenal normal.

Neste estudo ambos os genes *RPS4Y1* e *RPS4Y2* foram identificados com uma expressão diminuída em indivíduos com carcinomas adrenocorticais. O gene *RPS4Y1* codifica a proteína ribossômica S4. A proteína ribossomal S4 é a única proteína ribossomal conhecida que é codificada por mais de um gene. O gene *RPS4Y2* codifica uma proteína ribossômica que é altamente semelhante à *RPS4Y1* (LOPES et al. 2010) Ambos os genes estão mapeados no cromossomo Y e, para o nosso conhecimento, não foram avaliados em tumores adrenocorticais.

O gene *NPY*, também apresentou expressão diminuída nos tumores. Este é um neuropeptídeo de 36 aminoácidos altamente conservado que coexiste com noradrenalina em nervos simpáticos. O *NPY* foi originalmente isolado a partir de cérebro de porco, o homólogo humano foi deduzido a partir da estrutura de RNA isolado de clones de feocromocitoma humano (O'HARE et al.1989). O peptídeo não é encontrado apenas na glândula adrenal, mas também é vastamente observado no sistema nervoso simpático (VARNDELL et al. 1984; O'HARE et al.1989). KÖRNER et al. (2004), relataram um aumento na expressão do receptor de *NPY* funcional na glândula adrenal e nos tumores relacionados à glândula, bem como em tumor extra-glandular. No entanto, quando avaliada a expressão proteica do neuropeptídeo por imunistoquímica, foi observada expressão fraca a moderada em tumores originados da medula da adrenal. Foi também observada perda da expressão em tumores do córtex da adrenal quando

comparado às fibras nervosas no córtex adrenal normal. A perda de expressão do neuropeptídeo no córtex da adrenal do estudo de KÖRNER et al. (2004), corrobora com a identificação da perda de expressão do transcrito *NPY* identificado no presente estudo.

Frente a estes resultados, foi conduzida a análise para confirmar se havia alguma interação entre os genes candidatos avaliados nas análises de metilação deste estudo e os genes identificados com maior *fold-change* na análise de expressão global onde foi feita a comparação entre carcinoma adrenocortical e tecido de glândula adrenal normal. Foi verificado em bancos de interação proteína-proteína, que o *JUN*, selecionado como um dos possíveis genes relacionados à TDG, interage fisicamente com o gene *TOP2A*, um dos genes identificados com aumento de expressão nos tumores. Tal interação pode resultar em uma proximidade entre os genes identificados como diferencialmente expressos e aqueles que possivelmente têm uma relação com a TDG.

Com o objetivo de identificar candidatos potenciais para a confirmação dos nossos achados, e que também tenham sido investigados em outros trabalhos, foi realizada uma meta-análise com dados de expressão gênica global de carcinoma adrenocortical. Foram utilizados seis relatos da literatura que apresentaram dados de *microarrays* disponíveis no banco de dados GEO (Tabela 3).

Dentre os 15 genes que estavam presentes em cinco ou mais trabalhos, o gene *IGFBP6* (também encontrado entre os 20 principais genes da Tabela 2) foi identificado com expressão diminuída em carcinomas

adrenocorticais. É descrito em literatura que quando a expressão deste gene está diminuída, ocorre a inibição da proliferação celular, aumento da apoptose e senescência celular prematura. De modo oposto, quando *IGFBP6* apresenta-se com altos níveis de expressão, há um aumento da proliferação celular e sobrevivência (MICUTKOVA et al. 2011). Vários estudos anteriores mostraram que a *IGFBP6* é acompanhada principalmente de fenótipo antiproliferativo devido à sua ligação com *IGF2* e o bloqueio da via de sinalização de IGF1 (BACH et al. 2005). Em carcinoma da nasofaringe, *IGFBP6* foi sugerido como um supressor tumoral (KUO et al. 2010).

O *IGF2*, (*Insulin-like growth factor II*), é um mitógeno e desempenha um papel importante na regulação da proliferação celular, na diferenciação e no desenvolvimento embrionário (TORESTSKY e HELMAN 1996). O gene *IGF2* está mapeado em 11p15.5 e evidências sugerem que esteja envolvido no processo neoplásico e na progressão de tumores malignos como mama, próstata, bexiga, cólon, gástrico e ovário (LI et al. 1998; SHIRAISHI et al. 1998; FREIER et al. 1999). Além disso, o aumento dos níveis de expressão do fator de crescimento *IGF2* atua na patogênese dos carcinomas adrenocorticais. Estudos de larga escala tem demonstrado que pelo menos 80% dos ADR esporádicos foram identificados com a expressão aumentada quando comparados a adenomas e a tecidos normais (HEATON et al. 2012). Altos níveis de expressão do transcrito e da proteína foram identificados em quase todos os ADR infantis (GIORDANO et al. 2003; WEST et al. 2007). Um estudo realizado em adultos com ADR identificou um aumento na

expressão do *IGF2* e outras anormalidades em 11p15 as quais são frequentes nos carcinomas adrenocorticais, mas raros nos adenomas (GICQUEL et al. 1997). Em outro estudo realizado em quatro pacientes com ADR infantis, foi relatado o aumento da expressão do *IGF2* e a perda de heterozigose (LOH) em 11p15 (WILKIN et al. 2000). Além disso, o aumento da expressão do *IGF2* em carcinomas adrenocorticais foi associado ao pior prognóstico e ao maior risco de recorrência (SOON et al. 2008). Corroborando com a literatura, neste estudo o gene *IGF2* foi identificado com um aumento de expressão em 63% das amostras de ADR quando comparado ao tecido normal. Frente aos parametros estabelecidos para inclusão, o gene *IGF2* não estava entre os 1262 genes alterados, porém por ser um gene relevante na literatura sobre carcinoma de adrenocortical, este gene foi avaliado e apresentou um aumento de expressão considerável, mas sem significância estatística.

O gene inibidor de quinase ciclina-dependente 3 (*CDKN3*) foi identificado com a sua expressão aumentada em pacientes com carcinomas adrenocorticais, corroborando com dados da literatura para este tipo tumoral (GIORDANO et al. 2009; SOON et al. 2009; HEATON et al. 2012; DEMEURE et al. 2013). O *CDKN3* pertence à família de proteínas fosfatases e a função deste gene tem sido estudada em vários tipos de câncer (XING et al. 2012). Estudos realizados em pacientes com carcinoma hepatocelular demonstraram que a expressão desse gene também estava aumentada (XING et al. 2012). Dados similares foram encontrados em carcinoma

cervical, nos quais a expressão aumentada deste gene foi associada a uma menor sobrevida (ESPINOSA et al. 2013).

Corroborando com diversos relatos na literatura (GIORDANO et al. 2009; DURAND et al. 2011; HEATON et al. 2012; DEMEURE et al. 2013), os achados deste estudo identificaram expressão diminuída do gene *WFDC1* em pacientes com carcinomas adrenocorticais. O gene *WFDC1* está mapeado em 16q24, uma região frequente de perda de heterozigose em diferentes tipos de câncer. Devido à LOH, a expressão diminuída de *WFDC1* foi identificada em muitos tipos de tumores (próstata, mama, bexiga, pulmão e cérebro) e pode estar envolvida na inibição da proliferação celular (MADAR et al. 2009).

Nesta análise, foi utilizado o programa *Ingenuity Pathways Analysis* para a identificação de vias canônicas envolvidas nos carcinomas adrenocorticais. Cinco principais vias estão representadas na Figura 15 e a principal delas é a via das catecolaminas, na qual quatro genes (*DBH*, *CCD*, *PNMT* e *TH*) estavam com expressão diminuída. As catecolaminas são uma importante classe de neurotransmissores sintetizados a partir do aminoácido tirosina nos tecidos nervosos e na glândula adrenal. As principais catecolaminas são dopamina, noradrenalina e adrenalina (GOLDSTEIN et al. 2003), e acredita-se que tais moléculas tenham um importante papel na carcinogênese, principalmente no processo de angiogênese (CHAKROBORTY et al. 2009).

Ainda utilizando o programa *Ingenuity Pathways Analysis* foi realizada uma análise de predição de genes e foi verificado que muitos genes

regulados pelo *TGFB3* apresentavam baixa expressão. Nestes achados o gene *TGFB3* também foi identificado com expressão diminuída, sendo que este resultado corrobora com diversos estudos, como o de DE FRAIPONT et al. (2005) que compararam 24 carcinomas adrenocorticais e 33 adenomas, e verificaram que a expressão do *TGFB3* estava significativamente diminuída em carcinomas adrenocorticais. Além disso, estudos recentes continuam reforçando que a expressão desse gene está diminuída em carcinomas adrenocorticais (GIORDANO et al. 2009; HEATON et al. 2012; DEMEURE et al. 2013). O *TGFB3* atua na embriogênese e na diferenciação celular. Além disso, ele tem um papel duplo na tumorigênese, atuando tanto na indução quanto na supressão do fenótipo tumoral (SHEEN et al. 2013).

Em resumo, frente aos resultados obtidos, não foi possível confirmar que alterações em *TP53* são capazes de modular a TDG, porém estudos com um maior grupo amostral, outros delineamentos metodológicos, como a análise de metilação global, serão necessários para esclarecimento dessa hipótese. Os resultados de expressão gênica global deram evidências de que a mutação p.R337H pode ter uma função protetora nos portadores, pois genes que habitualmente apresentam expressão aumentada, e que são relacionados a um pior prognóstico em carcinomas adrenocorticais ou outros tumores, foram identificados com expressão diminuída nos portadores da mutação. O mesmo foi verificado de forma inversa em genes que apresentam expressão diminuída em tumores e que neste estudo estavam com expressão aumentada.

Além disso, ainda que o ADR seja considerado um tumor agressivo (DE FRANCIA et al. 2012), nesta casuística os pacientes que desenvolveram o tumor e que tinham mutação germinativa no gene *TP53*, apresentaram, surpreendentemente, um prognóstico favorável da doença. Dos cinco tumores que tinham mutação germinativa, sendo quatro p.R337H e um com a mutação NM\_000546.4 - c.919+1G>A, um foi a óbito devido ao diagnóstico em estadió avançado e os outros quatro estão vivos e livres da doença, com média de seguimento de 6,2 anos livres de doença.

Este perfil de expressão gênica diferenciado pode explicar outras características verificadas em pacientes LFS/LFL portadores desta mutação, nos quais é observado um prognóstico diferente em relação aos tumores ocorridos na população geral. Para confirmação desta hipótese, há a necessidade de validação dos resultados em uma coorte maior de pacientes com e sem a mutação p.R337H.

## 6 CONCLUSÕES

- Não foram identificadas alterações nos padrões de metilação dos genes candidatos possivelmente regulados pela TDG (*CDKN2A*, *FOXA1*, *HOXD8*, *JUN*, *NKX2-2*, *OCT4*, *SOX2* e *SOX17*) em pacientes portadores de mutações germinativas no gene *TP53* e controles saudáveis.
- Níveis aumentados do transcrito TDG foram identificados em dois casos de carcinomas adrenocorticais provenientes de pacientes portadores da mutação p.R337H *TP53*, sugerindo uma possível relação entre a mutação e a TDG.
- Foi observado diferença entre o perfil de expressão gênica global na comparação entre pacientes portadores da mutação p.R337H e não portadores. Vários genes relatados como associados com pior prognóstico em carcinomas adrenocorticais ou outros tumores esporádicos apresentaram o mesmo sentido da expressão nos ADR sem a mutação e o inverso nos casos com a mutação. Esses resultados sugerem pacientes com a mutação germinativa no gene *TP53* possivelmente apresentam um prognóstico favorável da doença, ainda que o ADR esporádico seja considerado um tumor agressivo.

- A meta-análise comparando os achados de tumores adrenocorticais com a glândula adrenal revelou concordância em 253 genes presentes em, no mínimo, três estudos da literatura. Vários candidatos a marcadores moleculares foram identificados incluindo o *TOP2A* e *TGFβ3*, já descritos como associados com o ADR.
- Tumores de pacientes com mutações germinativas em *TP53* têm assinaturas genéticas distintas quando comparados aos tumores esporádicos. Isto pode ser indicativo que estes tumores devam ter estratégias de tratamento diferenciadas em relação aos tumores esporádicos. São necessários estudos futuros incluindo estratégias de validação para confirmar estes achados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberle H, Schwartz H, Hoschuetzky H, Kemler R. Single amino acid substitutions in proteins of the armadillo gene family abolish their binding to alpha-catenin. **J Biol Chem** 1996; 271:1520-6.

Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett** 2007; 245:96-102.

Achatz MI, Hainaut P, Ashton-Prolla P. Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? **Lancet Oncol** 2009; 10:920-5.

Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. **Clin Chim Acta** 2006; 363:83-94.

Aparicio S, Eaves CJ. p53: a new kingpin in the stem cell arena. **Cell** 2009; 138:1060-2.

Arriola E, Rodriguez-Pinilla SM, Lambros MB, et al. Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2007; 106:181-9.

Bach LA. IGFBP-6 five years on; not so 'forgotten'? **Growth Horm IGF Res** 2005; 15:185-92.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in câncer. **Hum Mol Genet** 2001; 10:687-92.

Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer Res** 1994; 54:1298-304.

Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. Relative frequency and morphology of câncers in carriers of germline TP53 mutations. **Oncogene** 2001; 20:4621-8.

Bocca C, Ievolella M, Autelli R, et al. Expression of Cox-2 in human breast cancer cells as a critical determinant of epithelial-to- esenchymal transition and invasiveness. **Expert Opin Ther Targets** 2014; 18:121-35.

Bougeard G, Sesboüé R, Baert-Desurmont S, et al, Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. **J Med Genet** 2008; 45:535-8.

Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. **Cancer Res** 2003; 63:1727-30.

Brait MRO. **Avaliação da detecção de hipermetilação de promotores gênicos como marcador molecular para o câncer de bexiga**. São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Brandt K, Singh PB, Bulfone-Paus S, Rückert R. Interleukin-21: a new modulator of immunity, infection, and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev** 2007; 18:223-32.

Chan GK, Jablonski SA, Sudakin V, Hittle JC, Yen TJ. Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. **J Cell Biol** 1999; 146:941-54.

Chakroborty D, Sarkar C, Basu B, Dasgupta PS, Basu S. Catecholamines regulate tumor angiogenesis. **Cancer Res** 2009; 69:3727-30.

Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. **Genome Biol** 2004; 5:241.

Chen YC, Hsiao CC, Chen KD, et al. Peripheral immune cell gene expression changes in advanced non-small cell lung cancer patients treated with first line combination chemotherapy. **PLoS One** 2013; 8:e57053.

Choong SS, Latiff ZA, Mohamed M, et al. Childhood adrenocortical carcinoma as a sentinel cancer for detecting families with germline TP53 mutations. **Clin Genet** 2012; 82:564-8.

Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, et al. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. **Cell** 2009; 138:1083-95.

Clark SW, Fee BE, Cleveland JL. Misexpression of the eyes absent family triggers the apoptotic program. **J Biol Chem** 2002; 277:3560-7.

Cortázar D, Kunz C, Selfridge J, et al. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. **Nature** 2011; 470:419-23.

Cortellino S, Xu J, Sannai M, et al. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. **Cell** 2011; 146:67-79.

Custódio G, Parise GA, Kiesel Filho N, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. **J Clin Oncol** 2013; 31:2619-26.

Da Costa NM, Hautefeuille A, Cros MP, et al. Transcriptional regulation of thymine DNA glycosylase (TDG) by the tumor suppressor protein p53. **Cell Cycle** 2012; 11:4570-8.

De Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, et al. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. **J Clin Endocrinol Metab** 2005; 90:1819-29.

De Francia S, Ardito A, Daffara F, Zaggia B, Germano A, Berruti A, Di Carlo F. Mitotane treatment for adrenocortical carcinoma: an overview. **Minerva Endocrinol** 2012; 37:9-23.

De Juan C, Iniesta P, González-Quevedo R, et al. Genomic organization of a novel glycosylphosphatidylinositol MAM gene expressed in human tissues and tumors. **Oncogene** 2002; 21:3089-94.

Demeure MJ, Coan KE, Grant CS, et al. PTTG1 overexpression in adrenocortical cancer is associated with poor survival and represents a potential therapeutic target. **Surgery** 2013; 154:1405-16.

De Reyniès A, Assié G, Rickman DS, et al. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. **J Clin Oncol** 2009; 27:1108-15.

Dey A, Lane DP, Verma CS. Modulating the p53 pathway. **Semin Cancer Biol** 2010; 20:3-9.

Di Giammarino EL, Lee AS, Cadwell C, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol** 2002; 9:12-6.

Dubail J, Kesteloot F, Deroanne C, et al. ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity. **Cell Mol Life Sci** 2010; 67:4213-32.

Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. **Semin Reprod Med** 2009; 27:351-7.

Durand J, Lampron A, Mazzuco TL, Chapman A, Bourdeau I. Characterization of differential gene expression in adrenocortical tumors harboring beta-catenin (CTNNB1) mutations. **J Clin Endocrinol Metab** 2011; 96:E1206-11.

Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. **Cancer Surv** 1995; 25:101-24.

El-Naggar AK, Lai S, Clayman GL, Zhou JH, et al. Expression of p16, Rb, and cyclin D1 gene products in oral and laryngeal squamous carcinoma: biological and clinical implications. **Hum Pathol** 1999; 30:1013-8.

Espinosa AM, Alfaro A, Roman-Basaure E, et al. Mitosis is a source of potential markers for screening and survival and therapeutic targets in cervical cancer. **PLoS One** 2013; 8:e55975.

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. **Cancer Res** 1999; 59:67-70.

Esteller M, Tortola S, Toyota M, et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a)methylation and p53 mutational status. **Cancer Res** 2000; 60:129-33.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Res** 2001; 61:3225-9.

Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, Jirtle RL. Genomic imprinting: implications for human disease. **Am J Pathol** 1999; 154:635-47.

Feng Z, Lin M, Wu R. The Regulation of Aging and Longevity: a new and complex role of p53. **Genes Cancer** 2011; 2:443-52.

Fernandez-Ranvier GG, Weng J, Yeh RF, et al. Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression profiling. **Arch Surg** 2008; 143:841-6; discussion 846.

Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. **J Med Genet** 2006; 43:91-6.

Frebourg T, Malkin D, Friend S. Cancer risks from germ line tumor suppressor gene mutations. **Princess Takamatsu Symp** 1991; 22:61-70.

Freier S, Weiss O, Eran M, et al. Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in adenocarcinoma of the colon. **Gut** 1999; 44:704-8.

Gallais R, Demay F, Barath P, et al. Deoxyribonucleic acid methyl transferases 3a and 3b associate with the nuclear orphan receptor COUP-TFI during gene activation. **Mol Endocrinol** 2007; 21:2085-98.

Gambino V, De Michele G, Venezia O, et al. Oxidative stress activates a specific p53 transcriptional response that regulates cellular senescence and aging. **Aging Cell** 2013; 12:435-45.

Garritano S, Gemignani F, Voegelé C, et al. Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. **BMC Genet** 2009; 10:5.

Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Hum Mutat** 2010; 31:143-50.

Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, et al. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82:2559-65.

Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, et al. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. **Am J Pathol** 2003; 162:521-31.

Giordano TJ, Kuick R, Else T, et al. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. **Clin Cancer Res** 2009; 15:668-76.

Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. **J Pharmacol Exp Ther** 2003; 305:800-11.

Habuchi T, Takahashi T, Kakinuma H, et al. Hypermethylation at 9q32-33 tumour suppressor region is age-related in normal urothelium and an early and frequent alteration in bladder cancer. **Oncogene** 2001; 20:531-7.

Hainaut P. Tumor-specific mutations in p53: the acid test. **Nat Med** 2002; 8:21-3.

Heaton JH, Wood MA, Kim AC, et al. Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and  $\beta$ -catenin. **Am J Pathol** 2012; 181:1017-33.

Heanue TA, Reshef R, Davis RJ, et al. Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation. **Genes Dev** 1999; 13:3231-43.

Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF Jr, Li FP. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:606-11.

Hitchler MJ, Domann FE. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. **Free Radic Biol Med** 2007; 43:1023-36.

Jain M, Zhang L, He M, Zhang YQ, Shen M, Kebebew E. TOP2A is overexpressed and is a therapeutic target for adrenocortical carcinoma. **Endocr Relat Cancer** 2013; 20:361-70.

Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. **Nat Genet** 1999; 21:163-7.

Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science** 2001; 293:1068-70.

Kato S, Han SY, Liu W, 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 U S A** 2003; 100:8424-9.

Kim H, Park J, Jung Y, et al. DNA methyltransferase 3-like affects promoter methylation of thymine DNA glycosylase independently of DNMT1 and DNMT3B in cancer cells. **Int J Oncol** 2010; 36:1563-72.

Körner M, Waser B, Reubi JC. High expression of neuropeptide y receptors in tumors of the human adrenal gland and extra-adrenal paraganglia. **Clin Cancer Res** 2004; 10:8426-33.

Kuo YS, Tang YB, Lu TY, Wu HC, Lin CT. IGFBP-6 plays a role as an oncosuppressor gene in NPC pathogenesis through regulating EGR-1 expression. **J Pathol** 2010; 222:299-309.

Lane DP. Cancer: p53, guardian of the genome. **Nature** 1992; 358:15-6.

Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:4970-3.

Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82:1317-24.

Le Goff C, Somerville RP, Kesteloot F, et al. Regulation of procollagen amino-propeptide processing during mouse embryogenesis by specialization of homologous ADAMTS proteases: insights on collagen biosynthesis and dermatosparaxis. **Development** 2006; 133:1587-96.

Lee S, Oh T, Chung H, et al. Identification of GABRA1 and LAMA2 as new DNA methylation markers in colorectal cancer. **Int J Oncol** 2012; 40:889-98.

Lefevre M, Gerard-Marchant R, Gubler JP, Chaussain JL, Lemerle J. Adrenal cortical carcinoma in 42 patients treated from 1958 to 1980 at Villejuif. In:

Humphrey GB, Grindey GB, Dehner LB, et al. editors. **Adrenal and endocrine tumors in children**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers; 1984. p.256-76.

Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? **Ann Intern Med** 1969; 71:747-52.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. **Nature** 1998; 396:580-4.

Li Y, Flores R, Yu A, et al. Elevated expression of CXC chemokines in pediatric osteosarcoma patients. **Cancer** 2011; 117:207-17.

Li YQ, Zhou PZ, Zheng XD, Walsh CP, Xu GL. Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair. **Nucleic Acids Res** 2007; 35:390-400.

Lin PC, Lin YJ, Lee CT, Liu HS, Lee JC. Cyclooxygenase-2 expression in the tumor environment is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. **Oncol Lett** 2013; 6:733-9.

Liu WB, Han F, Jiang X, et al. ANKRD18A as a novel epigenetic regulation gene in lung cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2012; 429:180-5.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ . **Methods** 2001; 25:402-8.

Lopes AM, Miguel RN, Sargent CA, Ellis PJ, Amorim A, Affara NA. The human RPS4 paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved

ribosomal protein and is preferentially expressed during spermatogenesis. **BMC Mol Biol** 2010; 11:33.

Madar S, Brosh R, Buganim Y, et al. Modulated expression of WFDC1 during carcinogenesis and cellular senescence. **Carcinogenesis** 2009; 30:20-7.

Maiti A, Drohat AC. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. **J Biol Chem** 2011; 286:35334-8.

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 1990; 250:1233-8.

Marcel V, Dichtel-Danjoy ML, Sagne C, et al. Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. **Cell Death Differ** 2011; 18:1815-24.

Micutkova L, Diener T, Li C, et al. Insulin-like growth factor binding protein-6 delays replicative senescence of human fibroblasts. **Mech Ageing Dev** 2011; 132:468-79.

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. **Nature** 2005; 436:518-24.

Morgan C, Jenkins SA, Kynaston HG, Doak SH. The role of adhesion molecules as biomarkers for the aggressive prostate cancer phenotype. **PLoS One** 2013; 8:e81666.

Morita S, Horii T, Kimura M, et al. miR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases. **Int J Mol Sci** 2013; 14:14647-58.

Morrogh M, Andrade VP, Giri D, et al. Cadherin-catenin complex dissociation in lobular neoplasia of the breast. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 132: 641-52.

Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. **Oncogene** 2004; 23:6445-70.

Nettersheim D, Heukamp LC, Fronhoffs F, et al. Analysis of TET expression/activity and 5mc oxidation during normal and malignant germ cell development. **PLoS One** 2013; 8:e82881.

Ni RS, Shen X, Qian X, et al. Detection of differentially expressed genes and association with clinicopathological features in laryngeal squamous cell carcinoma. **Oncol Lett** 2012; 4:1354-60

O'Hare MM, Schwartz TW. Expression and precursor processing of neuropeptide  $\gamma$  in human pheochromocytoma and neuroblastoma tumors. **Cancer Res** 1989; 49:7010-4.

Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. **Cancer Res** 2003; 63:6643-50.

Palmero EI, Achatz MI, Ashton-Prolla P, Olivier M, Hainaut P. Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome. **Curr Opin Oncol** 2010; 22:64-9.

Parikh N, Hilsenbeck S, Creighton CJ, et al. Effects of TP53 mutational status on gene expression patterns across ten human cancer types. **J Pathol** 2013; Dec 28. [Epub ahead of print]

Peng B, Hurt EM, Hodge DR, Thomas SB, Farrar WL. DNA hypermethylation and partial gene silencing of human thymine- DNA glycosylase in multiple myeloma cell lines. **Epigenetics** 2006; 1:138-45.

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene** 2007; 26:2157-65.

Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, et al. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 2004; 48:647-50.

Porter S, Scott SD, Sassoon EM, et al. Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. **Clin Cancer Res** 2004; 10:2429-40.

Rabello Ddo A, de Moura CA, de Andrade RV, Motoyama AB, Silva FP. Altered expression of MLL methyltransferase family genes in breast cancer. **Int J Oncol** 2013; 43:653-60.

Rabenau KE, O'Toole JM, Bassi R, et al. DEGA/AMIGO-2, a leucine-rich repeat family member, differentially expressed in human gastric adenocarcinoma: effects on ploidy, chromosomal stability, cell adhesion/migration and tumorigenicity. **Oncogene** 2004; 23:5056-67.

Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:9330-5.

Roelofs HM, Te Morsche RH, van Heumen BW, Nagengast FM, Peters WH. Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. **BMC Gastroenterol** 2014; 14:1.

Rubie C, Frick VO, Wagner M, et al. ELR+ CXC chemokine expression in benign and malignant colorectal conditions. **BMC Cancer** 2008; 8:178.

Sambrook J, Russell DW. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001. v. 2. Gel eletroforese; p.5.36-9.

Sanchez-Céspedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. **Cancer Res** 2000; 60:892-5.

Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82:2027-31.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J Mol Biol** 1975; 94:441-8.

Seidinger AL, Mastellaro MJ, Paschoal Fortes F, et al. Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil. **Cancer** 2011; 117:2228-35

Sheen YY, Kim MJ, Park SA, Park SY, Nam JS. Targeting the Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Cancer Therapy. **Biomol Ther (Seoul)** 2013; 21:323-31.

Shiraishi T, Mori M, Yamagata M, Haraguchi M, Ueo H, Sugimachi K. Expression of insulin-like growth factor 2 mRNA in human gastric cancer. **Int J Oncol** 1998; 13:519-23.

Slater EP, Diehl SM, Langer P, et al. Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors. **Eur J Endocrinol** 2006; 154:587-98.

Smiraglia DJ, Smith LT, Lang JC, et al. Differential targets of CpG island hypermethylation in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **J Med Genet** 2003; 40:25-33.

Soon PS, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. **Oncologist** 2008; 13:548-61.

Soon PS, Gill AJ, Benn DE, et al. Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. **Endocr Relat Cancer** 2009; 16:573-83

Stiller CA. International variations in the incidence of childhood carcinomas. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1994; 3:305-10.

Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. **Cancer Res** 1998; 58:5315-20.

Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer** 2003; 89:557-63.

Telikicherla D, Marimuthu A, Kashyap MK, et al. Overexpression of ribosome binding protein 1 (RRBP1) in breast cancer. **Clin Proteomics** 2012; 9:7.

Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. **J Clin Oncol** 2009; 27:e108-9

Toretsky JA, Helman LJ. Involvement of IGF-II in human cancer. **J Endocrinol** 1996; 149:367-72.

Tsoi LC, Qin T, Slate EH, Zheng WJ. Consistent Differential Expression Pattern (CDEP) on microarray to identify genes related to metastatic behavior. **BMC Bioinformatics** 2011; 12:438.

Varndell IM, Polak JM, Allen JM, Terenghi G, Bloom SR. Neuropeptide tyrosine (NPY) immunoreactivity in norepinephrine-containing cells and nerves of the mammalian adrenal gland. **Endocrinology** 1984; 114:1460-2.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. **Cancer Res** 1997; 57:3245-52.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. Are there low-penetrance TP53 Alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. **Am J Hum Genet** 1999; 65:995-1006.

Velázquez-Fernández D, Laurell C, Geli J, et al. Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. **Surgery** 2005; 138:1087-94.

Wang Q, Liu T, Fang Y, Xie S, et al. BUBR1 deficiency results in abnormal megakaryopoiesis. **Blood** 2004; 103:1278-85.

West AN, Neale GA, Pounds S, et al. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. **Cancer Res** 2007; 67:600-8.

Wilkin F, Gagné N, Paquette J, Oligny LL, Deal C. Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. **J Clin Endocrinol Metab** 2000; 85:2048-56.

Xing C, Xie H, Zhou L, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes tumor cell proliferation. **Biochem Biophys Res Commun** 2012; 420:29-35.

Yatsuoka T, Furukawa T, Abe T, et al. Genomic analysis of the thymine-DNA glycosylase (TDG) gene on 12q22-q24.1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. **Int J Pancreatol** 1999; 25:97-102.

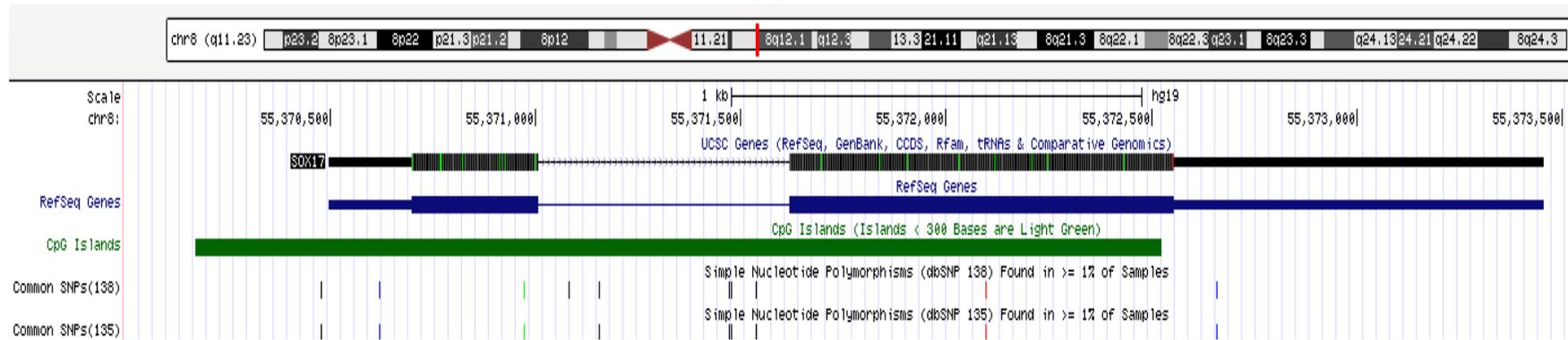
Zancanella P, Pianovski MA, Oliveira BH, et al. Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. **J Pediatr Hematol Oncol** 2006; 28:513-24.

Zhang L, Yang N, Huang J, et al. Transcriptional coactivator Drosophila eyes absent homologue 2 is up-regulated in epithelial ovarian cancer and promotes tumor growth. **Cancer Res** 2005; 65:925-32.

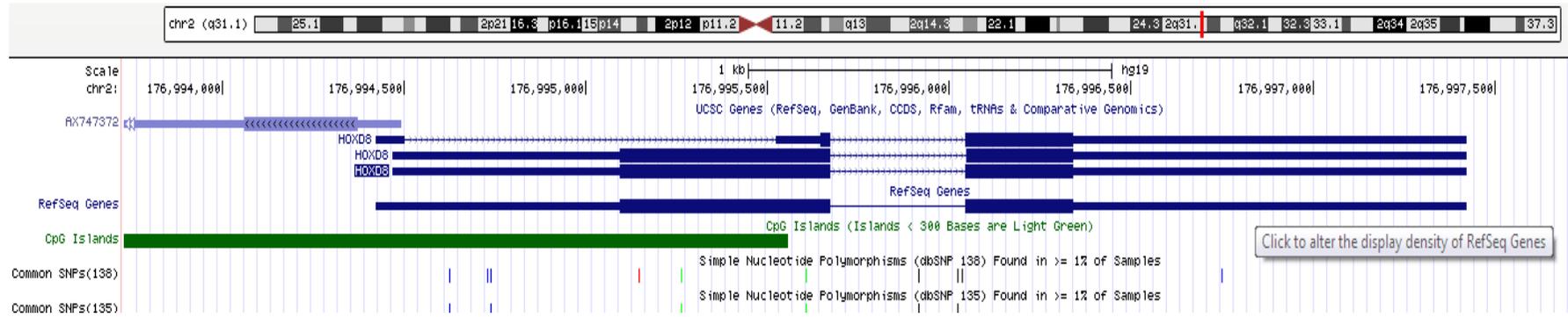
**Zhang** Q, Wang HY, Liu X, Bhutani G, Kantekure K, Wasik M. IL-2R common gamma-chain is epigenetically silenced by nucleophosphin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) and acts as a tumor suppressor by targeting NPM-ALK. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2011; 108:11977-82.

**Anexo 1** - Figuras dos genes candidatos avaliados e suas respectivas ilhas CpGs foram geradas pelo site <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks.v> e indicam: cromossomo e local da sonda alterada (barra vertical vermelha); gene contendo íntron e éxons; Ilha CpG (em verde); Polimorfismos de base única (barra vertical preta simboliza cada polimorfismo).

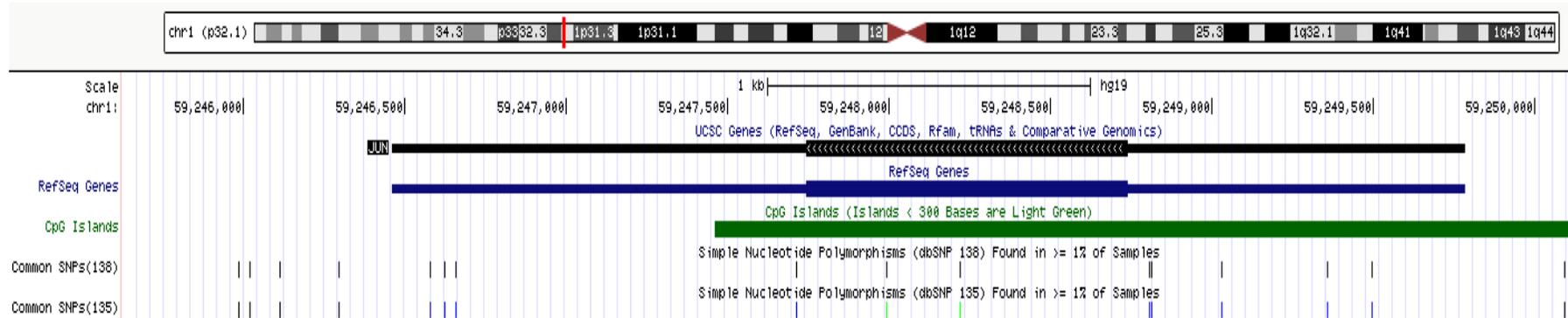
### SOX17



## HOXD8

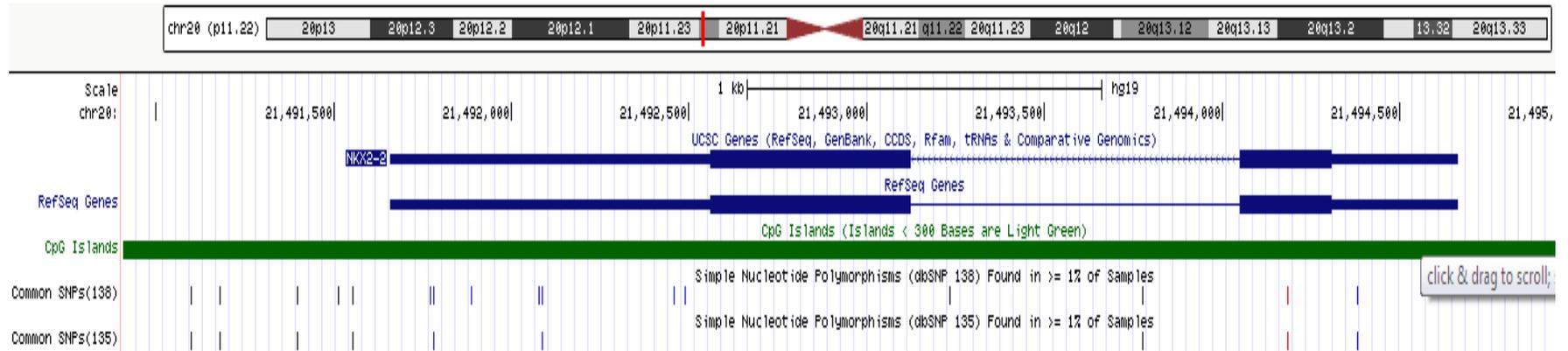


## JUN

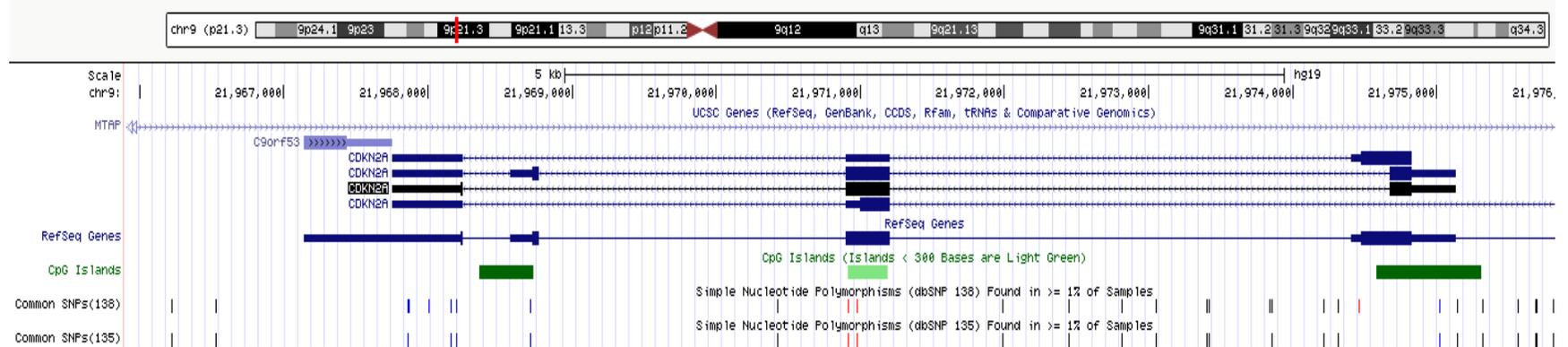




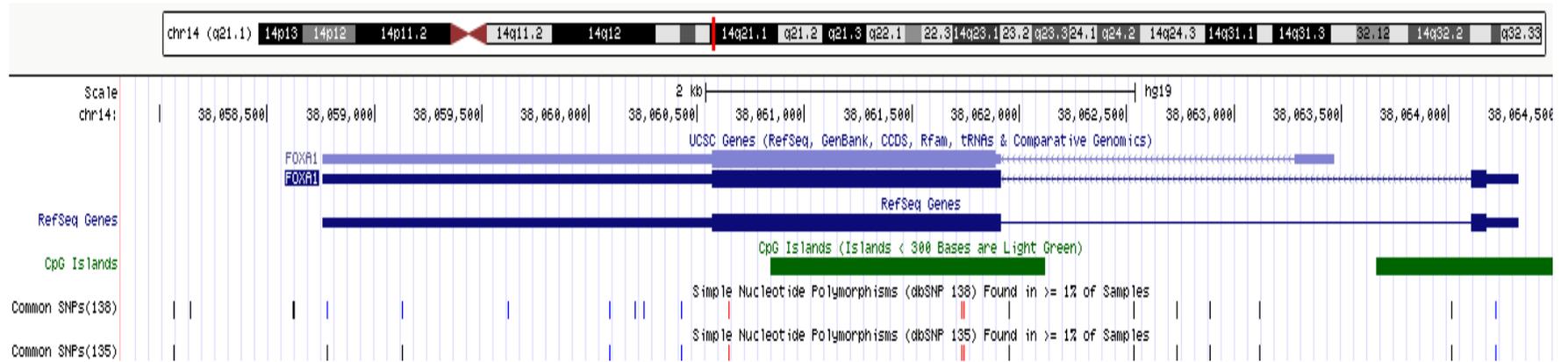
## NKX2-2



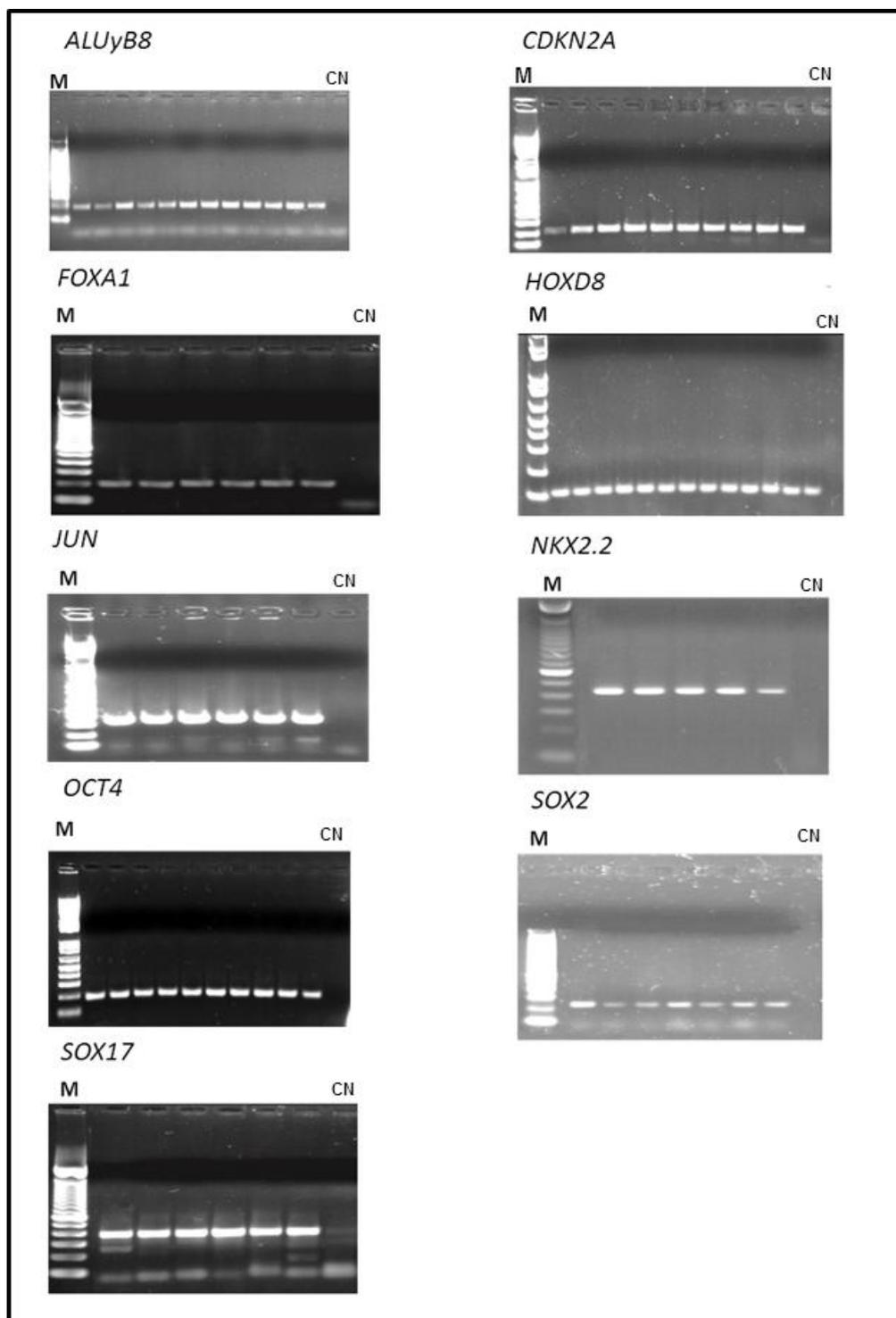
## CDKN2A



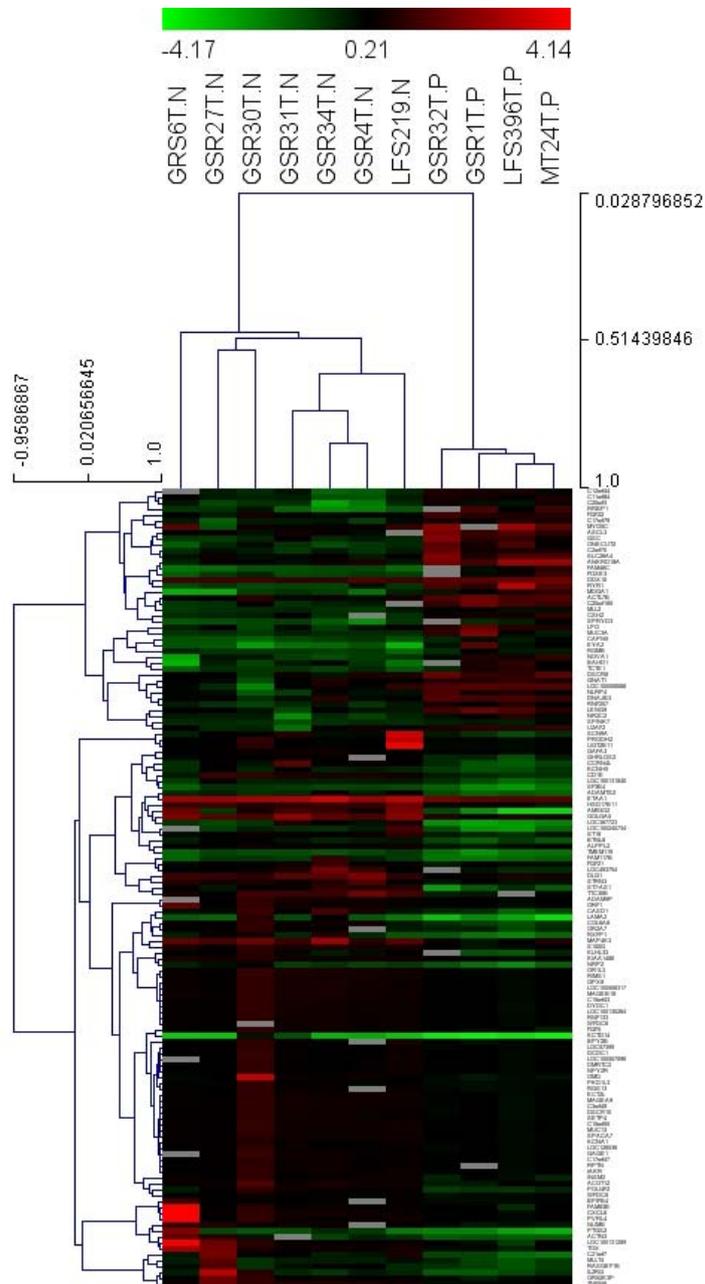
# FOXA1



**Anexo 2:** Foto dos géis de agarose 1% obtidos no produto das PCRs específicas para cada gene. M: Marcador de peso molecular *Ladder 1kb plus* ou *Ladder 100 pb*. CN: Controle negativo.



**Anexo 3 - Heatmap** mostrando as alterações nos níveis de expressão gênica de quatro carcinomas adrenocorticais positivos para a mutação p.R337H e sete carcinomas negativos para a mutação. Horizontalmente estão representados os 135 genes alterados.



**Anexo 4** - Tabela com todos os genes identificados como diferencialmente expresso na análise de pacientes com carcinomas adrenocorticais com e sem a mutação p.R337H.

<b>Gene</b>	<b>Região</b>	<b>Fold-Change</b>	<b>Função</b>
<b>Expressão diminuída</b>			
<i>AMIGO2</i>	12q13.11	-12,14	
<i>LOC387723</i>	10q26.3	-4,77	
<i>LAMA2</i>	6q22-q23	-4,29	
<i>KCTD14</i>	11q14.1	-4,07	
<i>ST7-AS1</i>	7q31.2	-3,86	
<i>PTGS2</i>	1q25.2-q25.3	-3,52	
<i>C21orf7</i>	21q22.3	-3,43	
<i>LOC100240734</i>	12q13.13	-3,15	
<i>RXFP1</i>	4q32.1	-3,06	
<i>ACTN3</i>	11q13.1	-2,68	
<i>IL2RG</i>	Xq13.1	-2,63	D
<i>MAP4K3</i>	2p22.1	-2,57	
<i>CASD1</i>	7q21.3	-2,56	
<i>CCRN4L</i>	4q31.1	-2,52	
<i>LOC100131289</i>	6p22.1	-2,51	
<i>SCN9A</i>	2q24	-2,50	
<i>TTC30B</i>	2q31.2	-2,45	
<i>GOLGA5</i>	14q32.12	-2,36	ON
<i>NRP2</i>	2q33.3	-2,30	
<i>ETAA1</i>	2p14	-2,30	
<i>KLHL33</i>	14q11.2	-2,30	
<i>COL6A6</i>	3q22.1	-2,29	
<i>FAM117B</i>	2q33.2	-2,21	
<i>CD1E</i>	1q22-q23	-2,19	D
<i>ADAMTS2</i>	5qter	-2,12	
<i>LOC493754</i>	7q11.21	-2,12	
<i>SF3B4</i>	1q21.2	-2,04	
<i>BTNL8</i>	5q35.3	-2,04	
<i>POU4F2</i>	4q31.2	-2,04	
<i>CXCL6</i>	4q13.3	-2,03	CC
<i>TOX</i>	8q12.1	-2,03	FT
<i>FAM83B</i>	6p12.1	-1,98	
<i>HSD17B11</i>	4q22.1	-1,97	
<i>RASGEF1B</i>	4q21.21	-1,93	
<i>DLG1</i>	3q29	-1,87	
<i>GHRLOS2</i>	3p25.3	-1,82	
<i>OR2A7</i>	7q35	-1,81	
<i>LOC100131840</i>	3p21.31	-1,79	
<i>PVRL4</i>	1q22-q23.2	-1,76	
<i>TMEM119</i>	12q23.3	-1,75	
<i>OMD</i>	13A5;13	-1,73	ON

<i>MLLT4</i>	6q27	-1,72	FT,ON
<i>ZNF556</i>	19p13.3	-1,72	
<i>UGT2B11</i>	4q13.2	-1,70	
<i>KCNH5</i>	14q23.2	-1,66	
<i>STRN3</i>	14q13-q21	-1,63	
<i>ST18</i>	8q11.23	-1,63	
<i>NUMB</i>	14q24.3	-1,60	
<i>OR52K3P</i>	11p15.4	-1,53	
<i>PRODH2</i>	19q13.1	-1,53	
<i>INSM2</i>	14q13.2	-1,51	FT
<i>ACOT12</i>	5q14.1	-1,49	
<i>ORF1</i>	18q23	-1,46	
<i>S100G</i>	Xp22.2	-1,43	
<i>FGF5</i>	4q21	-1,37	
<i>FGF21</i>	19q13.33	-1,36	CC
<i>OR1L3</i>	9q33.2	-1,35	
<i>ALPPL2</i>	2q37	-1,35	
<i>RIMS1</i>	6q12-q13	-1,29	
<i>ADAM5P</i>	8p11.22	-1,28	
<i>LOC100506317</i>	Cromossomo 2	-1,28	
<i>KIAA1486</i>	2q36.3	-1,28	
<i>BPY2B</i>	Yq11.223	-1,28	
<i>GAGE1</i>	Xp11.23	-1,28	
<i>GPX6</i>	6p22.1	-1,28	
<i>RGS13</i>	1q31.2	-1,27	
<i>MAGEB18</i>	Xp21.3	-1,27	
<i>BPIFB4</i>	20q11.21	-1,26	
<i>MAGEA9</i>	Xq28	-1,26	
<i>C15orf43</i>	15q21.1	-1,26	
<i>C3orf49</i>	3p14.1	-1,26	
<i>DSCR10</i>	21q22.13	-1,25	
<i>LOC100130264</i>	20p11.23	-1,25	
<i>DYDC1</i>	10q23.1	-1,25	
<i>ECT2L</i>	6q24.1	-1,24	
<i>SETP4</i>	Xq21.1	-1,24	
<i>tAKR</i>	10p15.1	-1,23	
<i>RNF133</i>	7q31.32	-1,23	
<i>C15orf55</i>	15q14	-1,22	
<i>MUC13</i>	3q21.2	-1,22	
<i>LOC100507096</i>	4q24	-1,22	
<i>SPACA7</i>	13q34	-1,21	
<i>RPTN</i>	1q21.3	-1,20	
<i>LOC126536</i>	19p13.12	-1,20	
<i>PKD1L3</i>	16q22.2	-1,20	
<i>LOC57399</i>	5q12.1	-1,18	
<i>C17orf47</i>	17q22	-1,18	
<i>NPY2R</i>	4q31	-1,18	
<i>DMRTC2</i>	19q13.2	-1,18	
<i>WFDC6</i>	20q13.12	-1,17	

<i>WFDC8</i>	20q13.12	-1,17	
<i>KCNA1</i>	12p13.32	-1,17	
<i>GATA3</i>	4p14	-1,16	
<i>DCDC1</i>	11p13	-1,16	
<b>Expressão aumentada</b>			
<i>SPINK7</i>	5q32	1,37	
<i>DDX10</i>	11q22-q23	1,44	
<i>RGMB</i>	5q15	1,53	
<i>MLL2</i>	12q13.12	1,55	FT
<i>FGF22</i>	19p13.3	1,58	CC
<i>GNAT1</i>	3p21	1,64	
<i>CAPN5</i>	11q14	1,90	
<i>NR2C2</i>	3p25	1,93	
<i>RNF207</i>	1p36.31	1,93	
<i>C11orf84</i>	11q13.1	1,93	
<i>NLRP4</i>	19q13.43	1,99	
<i>CSH2</i>	17q24.2	1,99	
<i>SPRYD3</i>	12q13.13	2,02	
<i>C17orf79</i>	17q11.2	2,03	
<i>U2AF2</i>	19q13.42	2,13	
<i>ASCL3</i>	11p15.3	2,19	
<i>TCTE1</i>	6p21.1	2,20	
<i>DNAJB3</i>	2q37	2,26	
<i>DSCR8</i>	21q22.2	2,28	
<i>ACTL7B</i>	9q31	2,34	
<i>C2orf70</i>	2p23.3	2,37	
<i>LPO</i>	17q23.1	2,38	
<i>C12orf44</i>	12q13.13	2,39	
<i>C20orf3</i>	20p11.2	2,42	
<i>MUC3A</i>	7q22	2,50	
<i>SLC26A4</i>	7q31	2,51	
<i>FOXE3</i>	1p32	2,63	
<i>NOVA1</i>	14q	2,82	
<i>LENG9</i>	14q13.4	2,84	
<i>BAHD1</i>	15q15.1	3,05	
<i>GSC</i>	14q32.1	3,07	FT
<i>ONECUT2</i>	18q21.31	3,09	FT
<i>LOC100506066</i>	Chromosome 11	3,13	
<i>FAM46C</i>	1p12	3,46	
<i>C20orf165</i>	20q13.13	3,48	
<i>MYO5C</i>	15q21	3,65	
<i>MDGA1</i>	6p21	3,67	
<i>ANKRD18A</i>	9p13.1	4,11	
<i>RRBP1</i>	20p12	4,56	
<i>EYA2</i>	20q13.1	4,84	FT
<i>RYR1</i>	19q13.1	5,90	

Genes selecionados na análise comparativa entre as 11 amostras positivas e negativas para a mutação p.R337H. Os genes foram classificados como D = diferenciação, CC = crescimento celular, FT = fator de transcrição, ON = oncogene e ST = supressor tumoral.