

Novas perspetivas sobre o papel da autofagia no carcinoma adrenocortical

Marta Marques Alves

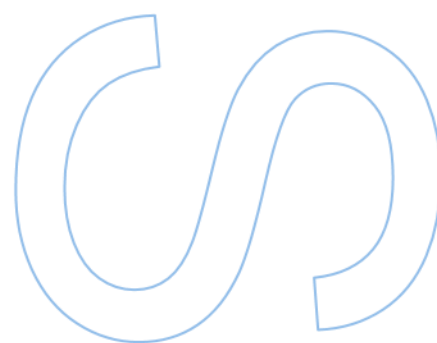
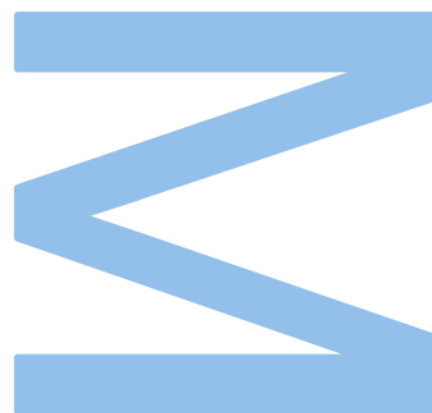
Mestrado em Bioquímica

Departamento de Química e Bioquímica

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e Instituto de Ciências

Biomédicas Abel Salazar

2024



Novas perspetivas sobre o papel da autofagia no carcinoma adrenocortical

Marta Marques Alves

Mestrado em Bioquímica

Departamento de Química e Bioquímica

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e Instituto de Ciências

Biomédicas Abel Salazar

2024

Orientadora

Sofia S. Pereira, PhD, Professora auxiliar,

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Unidade

Multidisciplinar em Investigação Biomédica, Universidade do Porto

Coorientadores

Diana Sousa, PhD, Professora auxiliar convidada,

Universidade Católica Portuguesa- Faculdade de Medicina

Dentária; Unidade Multidisciplinar em Investigação Biomédica

Duarte Pignatelli, MD, PhD, Professor auxiliar convidado,

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; Unidade de

saúde local de São João; Instituto de Investigação e Inovação em

Saúde (i3S)

U. PORTO



ICBAS | INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
**SCHOOL OF MEDICINE AND
BIOMEDICAL SCIENCES**



Agradecimentos

Primeiro, quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Sofia Pereira, pela excelente forma como me acolheu, por sempre estar disponível para me orientar e ensinar, e por fazer com que eu nunca deixasse de acreditar que ia dar certo. O meu sincero obrigada, sem dúvida que consigo foi tudo mais fácil.

À minha co-orientadora, Doutora Diana Sousa, pela oportunidade de trabalhar consigo, por mostrar sempre disponibilidade, pela ajuda e por toda a tranquilidade que transmitiu durante todas as reuniões.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Duarte Pignatelli, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Sofia Oliveira, pelo companheirismo, pela ajuda e disponibilidade. Obrigada pela partilha de momentos, desde os chocolates às longas horas na sala de cultura. Foi muito melhor contigo, Parceira.

À Madalena por toda a ajuda, por todo o conhecimento laboratorial que me transmitiu, por tornar tudo mais leve e por no fim de um “tu é que sabes” ter sempre os conselhos certos para me dar, que me fizeram sentir em casa.

À Ana pela ajuda, pela companhia e boa disposição, mas principalmente por nunca me deixar faltar mate. Obrigada, Ana.

Ao restante departamento de anatomia, por me terem recebido tão bem e por estarem presentes durante este ano. Obrigada.

À inês, à Marta, à Rita, ao Salvador e à Tatiana, pelos dois anos juntos que vivemos juntos, pelos cafés, pelas ajudas, pelas saídas, mas sobretudo pela amizade. À Ana, à Carolina, à Melissa e à Nobre por terem sido também uns pilares nesta etapa, que foi mais bonita convosco, obrigada por me ouvirem e por estarem sempre presentes.

A toda a minha família, que nunca me faltou com apoio e que se mostrou sempre presente. Apesar de pequenina, à minha afilhada que nos dias em que as coisas não corriam como eu queria, um sorriso dela bastava para me encher o coração

E claro, como não podia deixar de agradecer, à minha mãe que desde que me lembro sempre tornou os impossíveis possíveis. A ti que vives tudo intensamente comigo e que estás presente em todos os momentos, obrigada por acreditares como ninguém em mim e por seres o meu pilar.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento deste projeto (PTDC/MEC-ONC/31384/2017, UIDB/00215/2020, UIDP/00215/2020 and LA/P/0064/2020).

Resumo

Os tumores adrenocorticais (ACT) podem ser classificados em adenomas (ACA) ou carcinomas adrenocorticais (ACC). Ao contrário dos ACA, os ACC são raros, mas altamente agressivos. Atualmente, o diagnóstico baseia-se em características imagiológicas e histológicas (*Weiss score*) pouco específicas, o que dificulta o diagnóstico diferencial dos ACT. A dificuldade em diagnosticar precocemente os ACC, a conhecida heterogeneidade dessa patologia, e o fato de existir apenas um tratamento farmacológico disponível (o mitotano), resultam numa elevada percentagem de pacientes com ACC, com prognóstico desfavorável. Por isso, é fundamental estudar mecanismos celulares relevantes em oncologia, para entender melhor a patofisiologia dos ACC. A autofagia é um processo celular dinâmico em que a célula degrada e recicla os seus componentes. O duplo papel da autofagia tem sido alvo de estudo no cancro, visto que por um lado este mecanismo está associado à morte celular, mas também pode atuar na sobrevivência celular. O papel da autofagia nos ACT, ainda é pouco conhecido.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de proteínas envolvidas na autofagia nos ACT e verificar se estas podem ser potenciais marcadores de diagnóstico ou prognóstico dos ACC. Além disso, estudámos o potencial da autofagia no tratamento dos ACC.

Para isso, a expressão das proteínas envolvidas na autofagia, ATG5, LC3, e p62, foi avaliada por imunohistoquímica em cortes histológicos de ACC (n=21) e ACA (n=19). A marcação das proteínas foi comparada entre os grupos e correlacionada com as características dos ACT e dos pacientes. Além disso, células de ACC (linha celular JIL-2266) foram incubadas com mitotano, isoladamente ou em combinação com um inibidor tardio do fluxo autofágico (bafilomicina), e a expressão de LC3 e p62 foi avaliada por *western blot*.

Neste estudo, verificámos que as proteínas autofágicas ATG5, LC3 e p62 estão presentes na maioria dos ACT, tanto benignos quanto malignos. Os ACC com maior expressão de ATG5 apresentaram um *Weiss score* mais elevado, juntamente com características de invasão capsular, sinusoidal e venosa. A maioria dos ACA exibiu marcação nuclear para o p62, ao contrário dos ACC. Nenhuma das proteínas estudadas se correlacionou com a sobrevida dos pacientes.

Nas células tratadas com concentrações mais elevadas de mitotano, a expressão de LC3-II aumentou em comparação com o veículo correspondente. Além disso, os níveis de LC3-II foram ainda mais elevados quando as células foram co-tratadas com mitotano e bafilomicina, em comparação com o tratamento apenas com mitotano.

Este estudo demonstrou que a proteína ATG5 parece estar envolvida na progressão tumoral dos ACC, enquanto a ausência de marcação nuclear de p62 pode ser um indicativo de malignidade nesse tipo de tumor, e consequentemente um bom marcador de diagnóstico. Nenhuma das proteínas estudadas demonstrou potencial como marcador de prognóstico para os ACT. Além disso, os resultados deste estudo indicam que o mitotano modula a autofagia, e sugerem que esta evidência está relacionada com a indução da síntese de autofagossomas.

Palavras-chave: Tumores adrenocorticais, autofagia, diagnóstico, prognóstico, mitotano

Abstract

Adrenocortical tumors (ACT) can be classified as adrenocortical adenomas (ACA) or carcinomas (ACC). Unlike ACA, ACC are rare but highly aggressive. Currently, the diagnosis is based on poorly specific imaging and histological (Weiss score) features, which makes the differential diagnosis of ACT difficult. The difficulty in early diagnosis of ACC, the known heterogeneity of this pathology, and the fact that only one pharmacological treatment is available for ACC (mitotane) result in a high percentage of patients with poor prognosis. Therefore, it is crucial to study relevant cellular mechanisms in oncology to better understand the pathophysiology of ACC. Autophagy is a dynamic cellular process in which the cell degrades and recycles its protein components. The dual role of autophagy has been the subject of cancer research, as this mechanism is associated with cell death on the one hand, but can also promote cell survival. The role of autophagy in ACT is still poorly understood.

Thus, the aim of this work was to evaluate the expression of proteins involved in autophagy in ACT and to verify whether they could be potential diagnostic or prognostic markers for ACC. Additionally, we studied the potential of autophagy in the treatment of ACC.

For that, the expression of the autophagy-related proteins ATG5, LC3, and p62 was evaluated by immunohistochemistry, in histological sections of ACC (n=21) and ACA (n=19). The proteins expression was compared between the groups and correlated with the characteristics of ACT and the patients. Additionally, ACC cells (JIL-2266 cell line) were incubated with mitotane, either alone or in combination with a late-stage autophagic flux inhibitor (bafilomycin), and LC3 and p62 expression was evaluated by western blot.

In this study, we observed that the autophagic proteins ATG5, LC3, and p62 are present in most ACT, both benign and malignant. ACC with higher ATG5 expression showed the higher Weiss score and characteristics of capsular, sinusoidal, and venous invasion. Most ACA exhibited nuclear p62 staining, unlike ACC. None of the studied proteins correlated with patient survival.

In cells treated with higher concentrations of mitotane, LC3-II expression increased compared to the corresponding vehicle. Furthermore, LC3-II levels were even higher when cells were co-treated with mitotane and bafilomycin, compared to mitotane treatment alone. The levels of p62, in turn, did not show significant changes.

This study demonstrated that the ATG5 protein appears to be involved in the tumor progression of ACC, while the absence of nuclear p62 staining may be an indicator of malignancy in this type of tumor, and consequently a good diagnostic marker. None of the studied proteins demonstrated potential as prognostic markers for ACT. Additionally, the results of this study indicate that treatment with mitotane modulates autophagy and suggest that this evidence is related to the induction of autophagosome synthesis.

Keywords: Adrenocortical tumors, autophagy, diagnosis, prognosis, mitotane

Índice

Abreviaturas.....	xii
1. Introdução	1
1.1. Glândula Suprarrenal	1
1.2. Tumores Adrenocorticais	2
1.2.1 Diagnóstico dos tumores adrenocorticais.....	3
1.2.2. Estadiamento e tratamento dos tumores adrenocorticais.....	4
1.3. <i>Hallmarks</i> do cancro	6
1.4. Autofagia.....	7
2. Objetivo	13
3. Material e Métodos	15
3.1. Análise da expressão das proteínas autofágicas em tumores adrenocorticais	16
3.1.1 Amostras.....	16
3.1.2. Imunohistoquímica.....	17
3.1.3. Análise morfológica computadorizada do LC3 e do ATG5, nos ACT	18
3.1.4. Análise semi-quantitativa do p62, nos ACT	18
3.2. Estudos <i>in vitro</i> da modulação da autofagia como potencial terapêutico em ACC	19
3.2.1 Cultura celular	19
3.2.2. Otimização da densidade celular.....	20
3.2.3 Otimização da concentração do mitotano	20
3.2.3.1 Método Alamar blue	20
3.2.3.2 Ensaio de exclusão do Azul de tripano.....	21
3.2.4. Avaliação da expressão das proteínas LC3 e p62, nas células JIL-2266, por imunofluorescência	21
3.2.5 Avaliação do efeito do mitotano na expressão do LC3 e p62 e no fluxo autofágico das células JIL-2266 por <i>western blot</i>	21

3.2.5.1	Cultura celular e extração proteica	21
3.2.5.2	Western blot	23
3.3.	Análise estatística	23
4.1	Análise da expressão das proteínas autofágicas em tumores adrenocorticais	26
4.1.1	Expressão do ATG5 nos ACT	26
4.1.2	Expressão do LC3 nos ACT	27
4.1.3	Expressão do p62 nos ACT	27
4.1.4	Acuidade das proteínas ATG5, LC3 e p62 para o diagnóstico de ACC	31
4.1.5	Correlação das características dos pacientes e dos tumores com a expressão do ATG5, do LC3 e do p62	33
4.1.6	Acuidade das proteínas ATG5, LC3 e p62 para o prognóstico de ACC	36
4.2	Análise do potencial terapêutico da autofagia em ACC	36
4.2.1	Implementação da linha celular JIL-2266	36
4.2.2	Análise da expressão do LC3 e p62 na linha celular JIL-2266	37
4.2.3	Efeito do mitotano na expressão do LC3 e p62 na linha celular JIL-2266	38
4.2.4	Estudo do fluxo autofágico na linha celular JIL-2266 após tratamento com mitotano	44
5.	Discussão	45
6.	Conclusão	52
	Referências	54
	Figuras suplementares	59

Lista de Tabelas

Tabela 1- Weiss score para diagnóstico de ACC	4
Tabela 2- Classificação dos ACC segundo <i>European Network for the Study of Adrenal Tumors</i> (ENSAT)	5
Tabela 3 – Caraterísticas dos pacientes e dos respetivos tumores adrenocorticais.	16
Tabela 4 – Referências e diluições dos anticorpos.	17
Tabela 5- Descrição dos scores utilizados para avaliar as diferentes localizações dentro da célula.	19
Tabela 6- Correlação dos marcadores com as caraterísticas dos pacientes e dos tumores nos ACT.	33
Tabela 7- Percentagem de área marcada do ATG5 e do LC3 (metastização, a classificação ENSAT e presença de invasão capsular, venosa e sinusoidal).....	34
Tabela 8- Tipo de marcação celular do p62 de acordo com a metastização, a classificação ENSAT e a presença de invasão capsular, venosa e sinusoidal).....	35
Tabela 9- Regressão de Cox ajustada à idade para as proteínas ATG5 e LC3.	36
Tabela 10- Otimização da densidade celular por poço para as placas de 6, 12, 24 e 96 poços.	37

Lista de Figuras

Figura 1- Esteroidogénese nas várias zonas do córtex adrenal. 3 β -HSD isomerase: hidroxiesteroide desidrogenase; CYP11A1: enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol; CYP11B2: sintetase de aldosterona; CYP21A2: 21-hidroxilase; CYP17: 17-hidroxilase; CYP11B1: 11-hidroxilase; SULT2A1: sulfotransferase; DHEA: dehidroepiandrosterona; DHEA-S: sulfato de dehidroepiandrosterona.	2
Figura 2- <i>Hallmarks of cancer</i> . Figura adaptada do artigo (40)	7
Figura 3 - Os três tipos de autofagia. A macroautofagia depende da formação de autofagossomas, vesículas citosólicas de dupla membrana que transportam o conteúdo citoplasmático para o lisossoma. Na microautofagia, os lisossomas incorporam e digerem, porções do citoplasma por invaginação. Na autofagia mediada por chaperones, as proteínas desdobradas são transportadas até à membrana lisossomal onde são internalizadas e degradadas. Esquema adaptado do artigo (52) e criado no BioRender.....	9
Figura 4- Esquema das várias etapas da autofagia. A autofagia é um processo altamente regulado, focado na degradação lisossomal dos componentes celulares e/ou reciclagem de componente citosólicos. A iniciação da formação do fagóforo inicia-se quando o complexo cinase ULK1 é ativado. Um conjunto de proteínas ATG constituem complexos funcionais, que são ativados e recrutados para membranas para iniciar a autofagia. A conversão de LC3-I em LC3-II na etapa da expansão da membrana e a degradação do p62 na etapa da maturação são passos cruciais do processo autofágico. Esquema adaptado do artigo e criado no Biorender{Hansen, 2018 #142}.	11
Figura 5- Esquema das condições do ensaio da monitorização do fluxo autofágico em placa de 6 poços. BafA1- Bafilomicina; Veículo. veículo do mitotano (EtOH) e veículo da bafilomicina (DMSO).....	22
Figura 6 - Cortes histológicos de ACT marcados para a proteína ATG5 (200x). A: carcinoma adrenocortical (ACC), B: adenoma adrenocortical não funcionante (ACAn), C: adenoma adrenocortical funcionante com síndrome de Cushing (ACAc), D: controlo positivo (placenta), E: representação gráfica da área marcada entre ACC e ACA (Teste t: p>0,05), F: representação gráfica da área marcada entre os ACC e os ACAn e ACAc (ANOVA: p>0,05).....	27
Figura 7 - Cortes histológicos de ACT marcados pelo anticorpo LC3 (200x). A: carcinoma adrenocortical (ACC), B: adenoma adrenocortical não funcionante (ACAn), C: adenoma adrenocortical funcionante com síndrome de Cushing (ACAc), D: controlo positivo (placenta), E: representação gráfica da área marcada entre ACC e ACA (Teste t:	

p>0,05), F: representação gráfica da área marcada entre os ACC e os ACAn e ACAC (ANOVA: p>0,05).....	27
Figura 8- Imagens representativas da localização nuclear do p62 (200x). A: ACC com expressão nuclear <10%; B: ACC com expressão nuclear ≥10%; C: ACAn com expressão nuclear <10%; D: ACAn com expressão nuclear ≥10%; E ACAC com expressão nuclear <10%; F: ACAC com expressão nuclear ≥10%; G e H: Distribuição dos casos pela expressão do p62, entre ACC, ACA (ACAn e ACAC), onde a azul encontram-se os casos com ≥10% de expressão nuclear (azul) e a cinzento os casos com <10% de expressão nuclear (cinzento) (p<0,0001 entre ACC e ACA, teste de Fisher).	29
Figura 9- Imagens representativas da marcação citoplasmática do p62 (200x). A: ACC com score 0; B: ACC com score 1; C: ACC com Score 2; D: ACAn com score 0; E: ACAn com score 1; F: ACAn com Score 2; G: ACAC com score 0; H: ACAC com score 1; I: ACAC com Score 2; J: Distribuição dos casos de ACC e ACA quanto ao score 0 (cinzento), score 1 (azul) e score 2 (azul-escuro); K: Distribuição dos casos de ACC, ACAn e ACAC quanto ao score 0 (cinzento), score 1 (azul) e score 2 (azul-escuro) (p>0,05, teste de Fisher).....	30
Figura 10- Imagens representativas da marcação <i>dot-like</i> do p62 (200x). A: ACC sem marcação <i>dot-like</i> ; B: ACC comm marcação <i>dot-like</i> ; C: ACAn sem marcação <i>dot-like</i> ; D: ACAn com marcação <i>dot-like</i> (seta); E: ACAC com marcação <i>dot-like</i> ; F: Distribuição dos casos quanto à presença (azul) ou ausência (cinzento) de marcação do tipo <i>dot-like</i> , entre ACC e ACA; G: Distribuição dos casos quanto à presença (azul) ou ausência (cinzento) de marcação do tipo <i>dot-like</i> , entre ACC, ACAn e ACAC, (p>0,05, teste de Fisher).	31
Figura 11- Representação gráfica das curvas ROC para os marcadores ATG5 e LC3. A: análise entre carcinomas (ACC) e adenomas (ACA), B: análise entre carcinomas (ACC) e adenomas funcionantes (ACAC) com síndrome de Cushing, C: análise entre carcinomas (ACC) e adenomas não funcionantes (ACAn).....	32
Figura 12 Representação gráfica das curvas ROC para as várias localizações do marcador p62 A: análise entre carcinomas e adenomas, B: análise entre carcinomas e adenomas funcionantes com síndrome de Cushing, C: análise entre carcinomas e adenomas não funcionantes	33
Figura 13- Curvas de Kaplan-Meier para estimar a probabilidade de sobrevivência de acordo com os diferentes tipos de marcação para o p62.	36
Figura 14- Marcação do LC3 e do p62 nas células JIL-2266, analisado por imunofluorescência (400x), azul: DAPI (núcleos); verde: LC3 ou p62.....	38

Figura 15- Efeito das diferentes concentrações de mitotano (20, 40, 80, 100, 120 μ M) na viabilidade das células JIL-2266 analisado pelo ensaio de <i>alamar blue</i> , n=5.	39
Figura 16- Efeito das diferentes concentrações de mitotano (20, 40, 80, 100, 120 μ M) na viabilidade das células JIL-2266, avaliado pelo ensaio de <i>alamar blue</i> , normalizado ao veículo, em diferentes tempos (n=5).	40
Figura 17- Efeito das diferentes concentrações de mitotano (20, 40, 80, 100, 120 μ M), na morfologia das células (100x).	42
Figura 18- Efeito das diferentes concentrações de mitotano (20, 40, 80, 100, 120 μ M), na densidade celular analisado pelo ensaio de exclusão por azul de tripano (teste de <i>Kruskal-Wallis</i> (* p <0,05 entre o tratamento com mitotano 100 μ M e o veículo; ***p<0,01 entre o tratamento com mitotano 120 μ M e o veículo).	43
Figura 19- Efeito do mitotano nos níveis de expressão do LC3 e do p62, nas células JIL-2266, analisado por western blot. As células foram tratadas só com meio completo (branco), com as várias concentrações de mitotano e com os respetivos veículos de cada concentração, A: imagem representativa do western blot do LC3, p62 e GAPDH, B: Quantificação da expressão de LC3-II normalizada para o GAPDH onde cada ponto corresponde a uma réplica biológica, C: Quantificação da expressão de p62 normalizada para o GAPDH, onde cada ponto corresponde a uma réplica biológica, <i>Kruskal-Wallis</i> , p>0,05.	43
Figura 20- Efeito do co-tratamento do mitotano com a bafilomicina nos níveis de expressão de LC3-II e p62, analisado por western blot. As células foram tratadas durante 4 horas com mitotano 40 μ M e com bafilomicina 20nM, A: western blot da expressão do LC3, p62 e GAPDH, B: quantificação da expressão do LC3-II normalizada para o GAPDH, onde cada ponto corresponde a uma réplica biológica, C: quantificação expressão do p62 normalizada para o GAPDH, onde cada ponto corresponde a uma réplica biológica.	44

Abreviaturas

ACA	Adenoma adrenocortical
ACA _c	Adenoma adrenocortical funcionante produtor de cortisol
ACA _n	Adenoma adrenocortical não funcionante
ACC	Carinoma adrenocortical
ACT	Tumores adrenocorticais
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
AMC	Autofagia mediada por chaperones
ATG5	Autophagy protein 5
AUC	Area under the curve
BSA	Albumina sérica bovina
CYP11A1	Cadeia de enzimas de clivagem do colesterol
CYP11B1	11 β -hidroxilase
DAB	3,3-diaminobenzidina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEA-S	Dehidroepiandrosterona sulfatada
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDP	Etoposido, doxorubicina, cisplatina
ENSAT	<i>European network for the study of adrenal tumors</i>
ETOH	Etanol
Hsc70	<i>Heat shock cognate 71 kda protein</i>
HU	Unidades de <i>Hounsfield</i>
IF	Imunofluorescência
LAMP2A	Recetor <i>lysosome-associated membrane protein 2a</i>
LC3	Protein light chain 3
MTOR	Mammalian target of rampamycin
MUTYH	Muty DNA glycosylase
P62/SQSTM1	Sequestosome
PBS	Solução tamponada com fosfato
PE	Fosfatidiletanolamina
RE	Retículo endoplasmático
RGB	Red-Green-Blue
ROC	Receiver operating characteristic
SOAT1	Esterol- o -acil transferase 1
TBS	Solução salina tamponada com tris

ULK1

Unc-51 *like autophagy activating kinase 1*

1. Introdução

1.1. Glândula Suprarrenal

As suprarrenais são glândulas endócrinas retroperitoneais localizadas no polo superior de cada rim. Cada glândula é constituída por duas regiões, que têm origens embriológicas distintas: o córtex e a medula. O córtex corresponde, à região mais externa e é derivado da mesoderme, enquanto que a medula, região mais interna, deriva das células da crista neural, originadas da aorta dorsal (1).

O córtex adrenal é composto por células esteroideogénicas capazes de produzir, glucocorticoides, mineralocorticoides e androgénios (Figura 1). O córtex é dividido em três zonas com características histológicas distintas e cada uma tem um perfil enzimático característico que permite a produção de diferentes hormonas: a zona reticular, situada mais internamente, produz precursores de androgénios, nomeadamente a dehidroepiandrosterona (DHEA); a zona fasciculada, que é a zona intermédia, secreta glucocorticoides, principalmente cortisol; e a zona glomerulosa, a zona mais externa, é responsável pela produção de mineralocorticoides, predominantemente aldosterona (2).

A produção de glucocorticoides e de androgénios é principalmente regulada pela hormona adrenocorticotrófica (ACTH) que deriva da via da pró-opiomelanocortina e cuja libertação é controlada, pela concentração plasmática de cortisol. Já a secreção de mineralocorticoides é regulada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona, que depende principalmente da osmolaridade plasmática e da ativação por parte do sistema nervoso simpático (3).

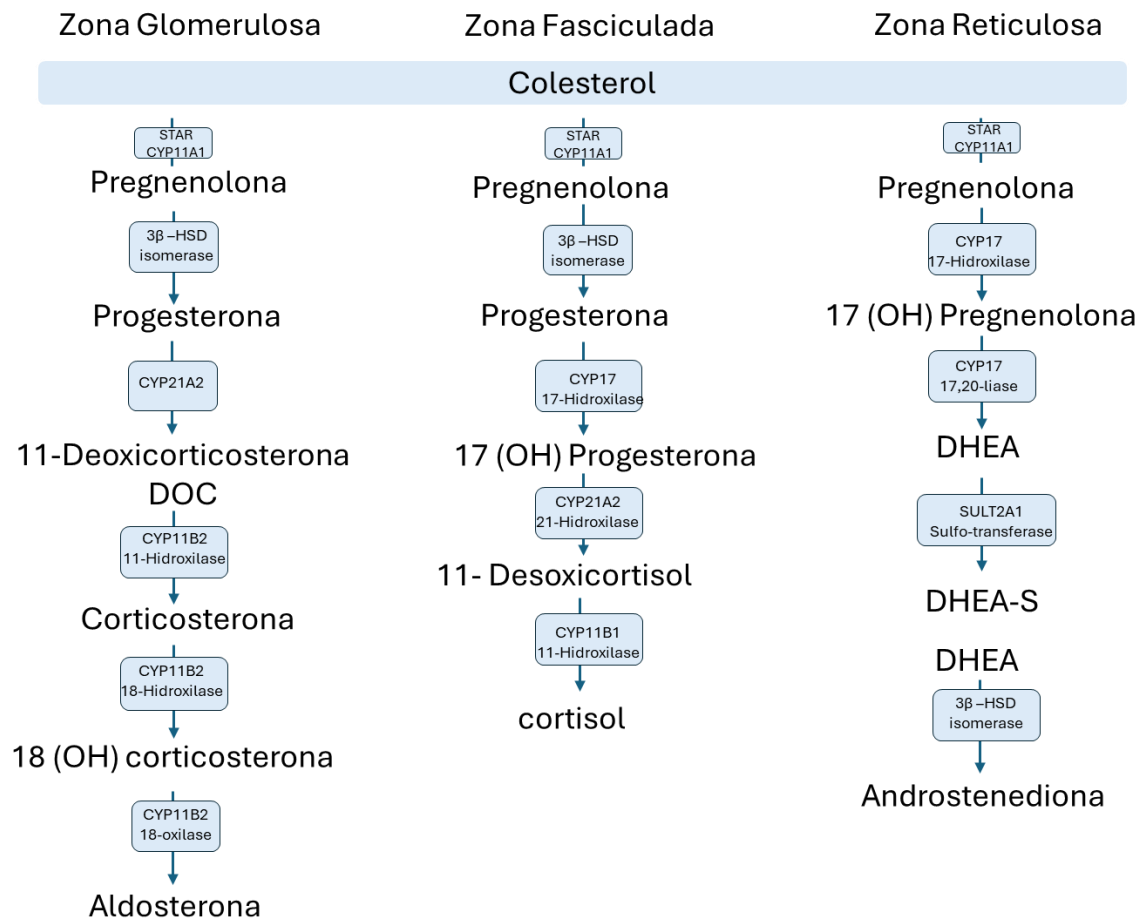


Figura 1- Esteroidogênese nas várias zonas do córtex adrenal. 3β-HSD isomerase: hidroxiesteroide desidrogenase; CYP11A1: enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol; CYP11B2: sintetase de aldosterona; CYP21A2: 21-hidroxilase; CYP17: 17-hidroxilase; CYP11B1: 11-hidroxilase; SULT2A1: sulfotransferase; DHEA: dehidroepiandrosterona; DHEA-S: sulfato de dehidroepiandrosterona.

Por outro lado, a medula adrenal é responsável por produzir catecolaminas, nomeadamente epinefrina e norepinefrina, que estão envolvidas na resposta do sistema nervoso a situações de stress (4).

1.2. Tumores Adrenocorticais

Os tumores adrenocorticais (ACT) são tumores originados no córtex da suprarrenal. Estes podem ser classificados de acordo com o seu comportamento biológico em malignos (carcinoma) ou benignos (adenoma) e ainda pelo seu comportamento funcional, em funcionantes ou não funcionantes (5). Os ACT funcionantes caracterizam-se pela capacidade de produzir hormonas esteroides de modo autónomo, provocando sintomas relacionados com o excesso hormonal. Por sua vez, os não funcionantes, não produzem ou produzem níveis demasiado baixos e por isso não levam a manifestações clínicas (6). Estes últimos são frequentemente diagnosticados acidentalmente, durante

exames radiológicos que foram feitos por outros motivos que não a suspeita de patologia da suprarrenal, denominados assim de incidentalomas (7).

Dentro dos tumores funcionantes do córtex da suprarrenal, as manifestações clínicas associadas são diversas dependendo da hormona produzida. A produção autónoma de elevadas quantidades de cortisol é responsável pela síndrome de Cushing, cujas principais manifestações clínicas são a hipertensão arterial, aparecimento de estrias e acumulação de gordura abdominal e cervical (8). A produção em excesso de aldosterona conduz ao aparecimento de hiperaldosteronismo, que pode ser traduzido no síndrome de *Conn*, em que os sintomas mais notórios são a hipertensão arterial e a hipocalemia (9). A secreção em excesso de androgénios, dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) e androstenediona, tem como manifestações clínicas o aparecimento de características fenotípicas masculinas em mulheres (7).

Ainda que os adenomas adrenocorticais (ACA) não funcionantes (ACAn) sejam frequentes (incidência entre 3-10%) (10), a incidência de carcinomas adrenocorticais (ACC) é baixa, sendo apenas de 0,7-2 casos por milhão, de habitante, por ano (11). Os ACC apresentam dois picos de incidência: em crianças com menos de 5 anos e em pessoas entre os 40 e os 60 anos de idade, com maior incidência em indivíduos do sexo feminino (12). A maioria dos ACC são funcionantes e produzem cortisol, androgénios ou ambas as hormonas (13).

Os ACC, apesar de raros, são muito agressivos e associam-se geralmente a um mau prognóstico. Este mau prognóstico é consequência da dificuldade de haver um diagnóstico precoce, da facilidade de metastização dos ACC e da inexistência de tratamentos eficazes (14, 15).

1.2.1 Diagnóstico dos tumores adrenocorticais

Após a identificação de uma massa no cortex suprarrenal é realizado um estudo bioquímico para avaliação da funcionalidade do tumor (16), contudo o diagnóstico é sobretudo baseado em características imagiológicas, como o tamanho do tumor e a densidade radiológica. As técnicas mais utilizadas para avaliar esses parâmetros são a tomografia computadorizada e a ressonância magnética. Um tumor com um diâmetro superior a 4 centímetros e um valor de unidades de *Hounsfield* (HU) superior a 10, é geralmente um ACC e, portanto, recomendado para cirurgia. Neste tipo de tumores, as biópsias são desaconselhadas por estarem associadas a um risco elevado de disseminação tumoral e pela inexistência de marcadores moleculares específicos para diagnóstico (17).

Após a remoção cirúrgica do tumor, o diagnóstico é baseado no reconhecimento de características macroscópicas e microscópicas associadas a malignidade. Dentro das características macroscópicas destacam-se o tamanho, as áreas de necrose e de hemorragia, integridade da cápsula e invasão tecidos adjacentes (18).

O sistema de pontuação Weiss é o método de diagnóstico mais utilizado para os ACT (19) e baseia-se no reconhecimento microscópico de nove parâmetros morfológicos: a presença de citoplasma eosinofílico (“escuro”), de arquitetura difusa, necrose, de núcleos atípicos, índice mitótico, mitoses atípicas, invasão sinusoidal, venosa e capsular (Tabela 1). A malignidade está associada à presença de 3 ou mais critérios.

Tabela 1- Weiss score para diagnóstico de ACC

Critério	0	1
Índice mitótico	<5 por 50 campos de alta potência	> 5 por 50 campos de alta potência
Mitoses atípicas	Ausente	Distribuição anormal de cromossomas ou número elevado de fusos mitóticos
Núcleos atípicos	Ausente	Presente
Necrose tumoral	Ausente	Presente
Células claras	>25% do tumor tem células claras	<25% do tumor tem células claras
Arquitetura difusa	<1/3 do tumor tem zonas de células sem padrão	>1/3 do tumor tem zonas de células sem padrão
Invasão sinusoidal	Ausente	Presente
Invasão venosa	Ausente	Presente
Invasão capsular	Ausente	Presente

1.2.2. Estadiamento e tratamento dos tumores adrenocorticais

Quando um ACT apresenta características sugestivas de ACA e é funcionante, a cirurgia é o tratamento recomendado. Se os pacientes recusarem a cirurgia, o tratamento médico passa por usar bloqueadores dos recetores hormonais, de modo a diminuir a síntese excessiva de hormonas. No caso de ser um ACAn, estes geralmente não requerem tratamento, sendo os pacientes seguidos para monitorização do tamanho do tumor e dos níveis hormonais (20, 21).

No caso, de haver suspeita de malignidade e o tumor ser localizado, a abordagem terapêutica mais eficaz é a resseção cirúrgica completa (R0) (22).

Após a cirurgia, o estadiamento dos ACT é realizado de acordo com o sistema ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumors) que corresponde a uma adaptação do sistema tumor- nódulo- metástase (TMN) (Tabela 2) (23).

Tabela 2- Classificação dos ACC segundo *European Network for the Study of Adrenal Tumors* (ENSAT)

Estádios	TMN
I	T1; N0; M0
II	T2; N0; M0
III	T3-T4; N1; M0
IV	T1-T4; N0-N1; M1

T1: tumor ≤5cm; T2: >5cm; T3: invasão tumoral dos tecidos circundantes; T4: invasão tumoral nos órgãos adjacentes. N0: sem linfonodos positivos, ausência de metástases nos gânglios linfáticos; N1: linfonodos positivos, presença de metástases nos gânglios linfáticos. M1: presença de metástases à distância.

Outro parâmetro utilizado para fazer o estadiamento do tumor e, portanto, avaliar o seu prognóstico é a análise da expressão do marcador de proliferação, Ki-67, através da técnica de imunohistoquímica (IHQ)(24). Estes fatores (sistema ENSAT e expressão de Ki-67), têm a limitação de não conseguirem prever o prognóstico de alguns tumores devido à sua heterogeneidade. Embora ainda não tenham aplicabilidade clínica, diversos estudos indicam que a análise genética e epigenética dos tumores pode ser útil no prognóstico. Por exemplo, a expressão genética elevada de *PINK1* (envolvida na mitofagia) e a metilação das regiões do DNA contendo sequências CpG (citosina-guanina) estão associadas a um prognóstico desfavorável (25). Além disso, estudos anteriores observaram que pacientes com ACC funcionantes produtores de glucocorticoides parecem também ter um pior prognóstico (26, 27).

Nos pacientes em que a resseção cirúrgica completa não é possível, ou o tumor tem um estadio I/II com Ki-67>10%, ou um estadio III, é realizado tratamento farmacológico adjuvante com mitotano (28). Se o tumor tiver estadio IV, realiza-se tratamento com mitotano combinado com quimioterapia usando etoposido-doxorrubicina-cisplatina (EDP) (24). Neste último caso, a cirurgia pode também ser realizada para controlar a progressão do tumor primário ou tratamento de metástases (28-30).

A ação do mitotano envolve a inibição de enzimas esteroideogénicas (CYP11A1 e CYP11B1), a despolarização da membrana mitocondrial e o stress do retículo endoplasmático (RE), levando à morte celular das células adrenocorticais (31-33).

Este fármaco provoca efeitos secundários, tais como distúrbios gastrointestinais (náuseas, vómitos) e neurológicos (tremores musculares, perdas de memória, tonturas e sonolência) (34). Estes efeitos secundários levam a que 20 % dos pacientes tenham uma baixa tolerância a este fármaco (35). Além disso, a eficácia do mitotano é limitada. O uso de mitotano como terapia adjuvante reduz a taxa de recorrência da doença em 38% dos pacientes com ACC e diminui as mortes relacionadas em 31%, após a cirurgia (36-38).

1.3. *Hallmarks* do cancro

As células tumorais adquirem um conjunto de alterações que as caracterizam e as distinguem de células normais, que são denominadas como *hallmarks of cancer*. Estas foram descritas, pela primeira vez, em 2000, por Hanahan e Weinberg (39) e desde então têm vindo a ser atualizadas, sendo a versão mais atual de 2022 (Figura 2) (40).

As células tumorais adquirem estas características através de mutações e interações com o microambiente tumoral. As alterações descritas promovem a sobrevivência em condições desfavoráveis e a proliferação de forma descontrolada (40).

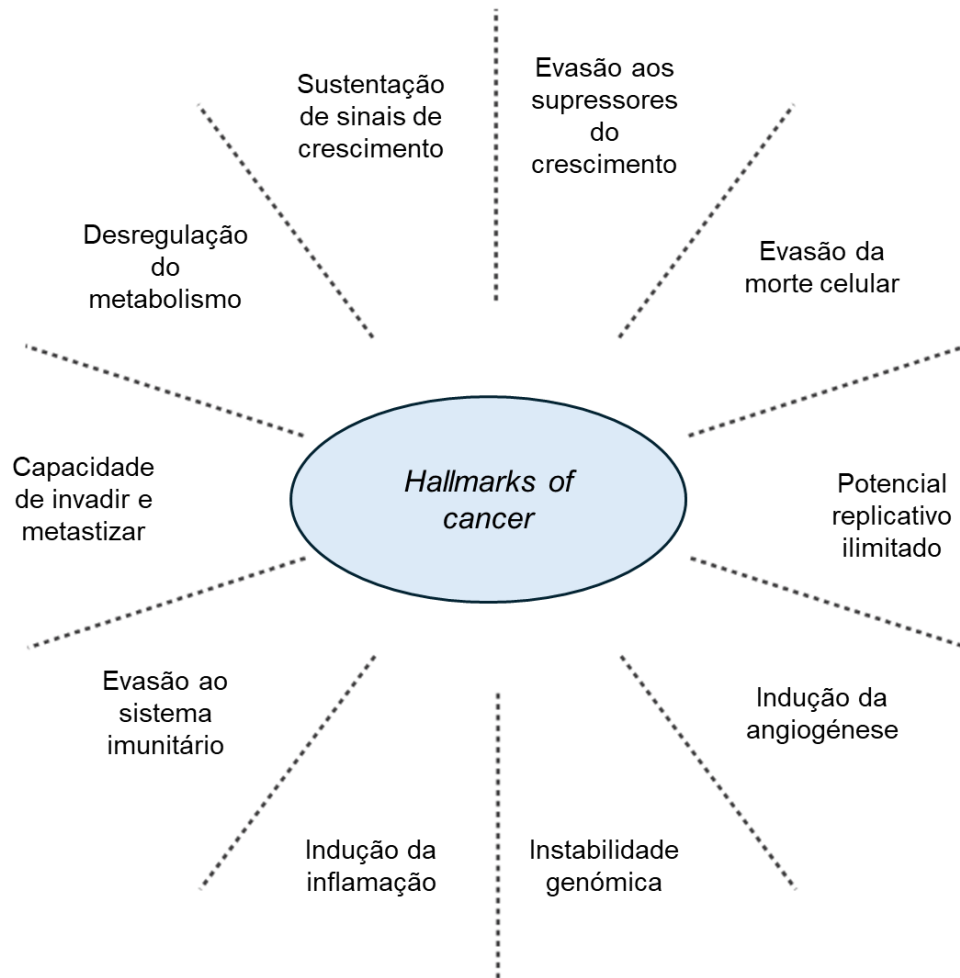


Figura 2- *Hallmarks of cancer*. Figura adaptada do artigo (40)

1.4. Autofagia

A autofagia é um mecanismo dinâmico, onde ocorre degradação de componentes intracelulares (41).

A autofagia envolve normalmente o sequestro de proteínas codificadas por genes mutados ou com alterações no enovelamento, assim como de organelos danificados ou envelhecidos em estruturas autofágicas. Para tal, é necessário a associação de proteínas que ajudam na formação destas estruturas, para que posteriormente todo este material possa ser sequestrado e degradado ou reciclado (42).

A autofagia participa na regulação de diferentes processos como a homeostasia energética e o metabolismo celular, e por isso está presente quer em contexto fisiológico, quer patológico (ex: doenças neurodegenerativas, cardiomiopatia e cancro) (43).

O papel da autofagia no cancro tem sido descrito paradoxalmente. Inicialmente, foi descrito como um mecanismo que promovia a sobrevivência do tumor, e posteriormente, outros estudos demonstraram que a autofagia também pode promover a morte das células tumorais (44).

São conhecidos três tipos principais de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperones (AMC) (Figura 3) (45).

A macroautofagia, é um processo catabólico não seletivo. Os componentes a degradar são capturados do citoplasma e envolvidos pelo fagóforo, uma estrutura de dupla membrana, que se alonga até formar o autofagossoma. De seguida, o autofagossoma funde-se com um lisossoma, originando o autofagolisossoma, onde os componentes são degradados, por hidrolases lisossomais, em pH ácido (46). A biogénese do autofagossoma é um processo complexo, regulado por proteínas e lípidos provenientes de vários locais da célula (RE, locais de contacto entre o RE e as mitocôndrias, complexo de Golgi e membrana plasmática) (47). Após a degradação, os produtos resultantes são libertados de volta para o citosol, de modo a reciclar os compostos macromoleculares e gerar energia mantendo a viabilidade celular perante condições desfavoráveis e protegendo a célula do *stress* (48).

A microautofagia ocorre diretamente na membrana lisossomal, não havendo a formação do autofagossoma, uma vez que o fagóforo não está envolvido. Primeiro, as proteínas ligam-se diretamente ou são transferidas através do corpo multivesicular para a membrana lisossomal e depois o lisossoma engloba a carga autofágica, pela invaginação da membrana, o que permite o sequestro do material a ser degradado, para o interior do lisossoma (49).

A autofagia mediada por chaperones, é um processo específico e importante no caso, por exemplo, das proteínas globulares ou hidrofóbicas, que são de difícil acesso. Este mecanismo também não forma um fagóforo, uma vez que o conteúdo é incorporado. Para isso, é necessário que as proteínas contenham uma sequência de aminoácidos específica (KFERQ) que vai permitir a ligação à *Heat shock cognate 71 kDa protein* (Hsc70), um chaperone citosólico. Esta ligação, juntamente com a assistência de co-chaperones, forma um complexo com a proteína, facilitando o seu transporte para a superfície do lisossoma, onde vai ser internalizada e posteriormente degradada. Na membrana do lisossoma, as proteínas vão ser reconhecidas e ligadas ao recetor *Lysosome-Associated Membrane Protein 2A* (LAMP2A). De seguida, ocorre a multimerização do LAMP2A formando-se um complexo de translocação, o que leva à

internalização para o lúmen lisossomal, onde as proteínas são degradadas por proteases (50, 51).

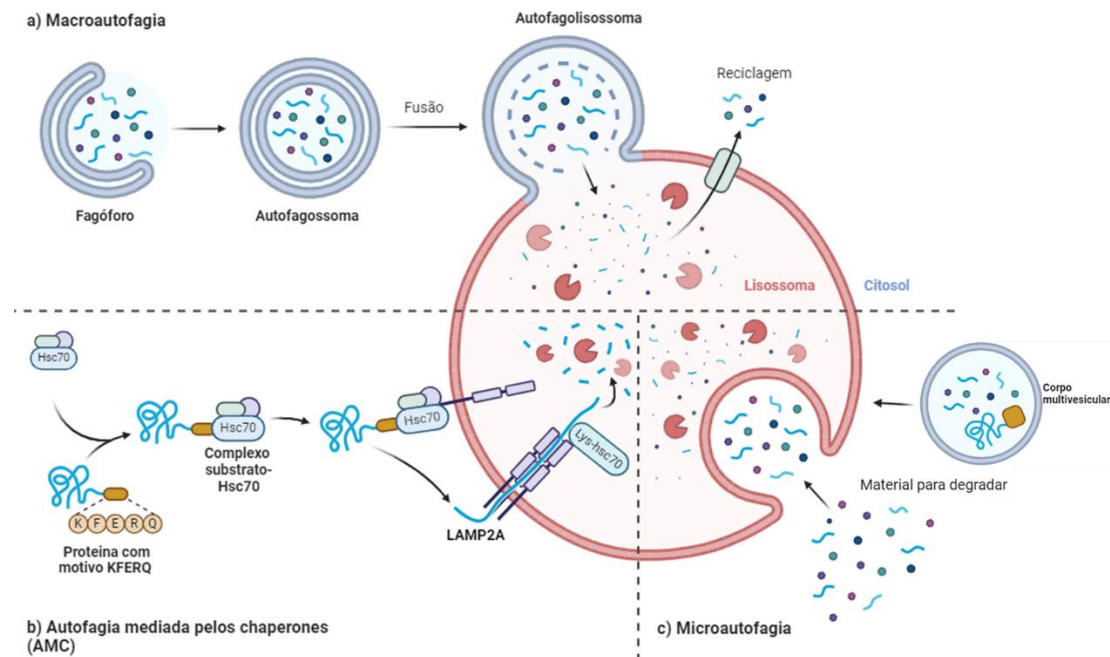


Figura 3 - Os três tipos de autofagia. A macroautofagia depende da formação de autofagossomas, vesículas citosólicas de dupla membrana que transportam o conteúdo citoplasmático para o lisossoma. Na microautofagia, os lisossomas incorporam e digerem, porções do citoplasma por invaginação. Na autofagia mediada por chaperones, as proteínas desdobradas são transportadas até à membrana lisossomal onde são internalizadas e degradadas. Esquema adaptado do artigo (52) e criado no BioRender.

Neste trabalho, apenas a macroautofagia será detalhada e estudada e, desta forma, será denominada apenas como “autofagia”, ao longo do texto.

Como referido acima, a autofagia apresenta quatro etapas principais: iniciação, formação do fagóforo, expansão das membranas e maturação (fusão) (Figura 4) (53).

Um dos estímulos para a ativação da autofagia amplamente descritos é a inibição da via do *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Contudo, importa salientar que diferentes estudos descrevem a ativação da autofagia independente da via mTOR (54-56).

A iniciação da autofagia ocorre no citoplasma através da ativação complexo ULK1(57). Quando este complexo ULK1 está ativo é translocado para a membrana do RE. Depois, o complexo ULK1 ativa outras proteínas importantes, como a VPS34 e a Beclina-1. Importa referir que a Beclina-1 pode interagir com o Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, o que impede a ativação da autofagia. Esta ligação permite a interação entre a autofagia e a apoptose (58, 59).

Posteriormente, ocorre a expansão do fagóforo. A expansão da membrana é regulada por dois sistemas de conjugação do tipo ubiquitina, ATG12-ATG5 e o sistema LC3-PE. No primeiro sistema, o ATG12 é conjugado com o ATG5 através de reações de ubiquitinação mediadas pelo ATG7 (enzima tipo E1, enzima ativadora) e pelo ATG10 (enzima tipo E2, envolvida na conjugação). O ATG7 ativa o ATG12, de forma dependente de ATP. Após a ativação, o ATG10 facilita a ligação covalente do ATG12 ao ATG5. Há ainda uma interação deste complexo com o homodímero ATG16, formando o complexo ATG5- ATG12-ATG16, que é essencial para a extensão/alongamento do fagóforo (60).

O segundo sistema semelhante à ubiquitinação, importante para a formação e maturação do autofagossoma, induz a conjugação de fosfatidiletanol com o LC3. Este é clivado no C-terminal pela protease ATG4 de maneira a formar LC3-I citosólico. Por sua vez, o LC3-I citosólico é conjugado com fosfatidiletanolamina (PE), resultando na forma lipídica de LC3 (LC3-II), que permanece anexada à membrana do autofagossoma. O ATG7, o ATG3 e o complexo ATG12-ATG5-ATG16 (enzima tipo E3, ubiquitina ligase) estão envolvidos de forma direta na conjugação do LC3-II. O LC3-II é encontrado na superfície luminal e citosólica do autofagossoma, desempenhando um papel importante quer no fecho da membrana e no reconhecimento seletivo da carga, quer na fusão do autofagossoma com o lisossoma. Após a fusão com os lisossomas, o LC3-II do lúmen é degradado, enquanto o citosólico pode ser reciclado. O LC3-II é o principal marcador associado aos autofagossomas. Os níveis de LC3-II aumentam quando a síntese de autofagossomas é maior ou quando a sua degradação está inibida, daí ser um marcador muito utilizado nos estudos sobre autofagia (50, 53, 61).

A formação do autofagossoma é finalizada pelo fecho do fagóforo. O autofagossoma aproxima-se do lisossoma e, a membrana externa do autofagossoma funde-se com a membrana lisossomal. Depois, as hidrolases degradam a membrana interna e o conteúdo que está dentro do autofagossoma é exposto, completando a fusão. A degradação inicia-se pela destruição da membrana interna, seguido do transporte dos resíduos para o exterior do autofagolisossoma. Desta forma, os nutrientes são reciclados, para o citosol, podendo ser utilizados para fornecer energia para outros processos celulares (57).

Um componente fundamental e que estabelece ligação direta com o LC3, é o p62/SQSTM1 (sequestroma 1). O p62 é essencial para identificar e entregar o conteúdo a ser degradado ao LC3 para que depois possa ocorrer a degradação seguindo as

etapas referidas em cima. O p62, liga as proteínas ubiquitinadas e interage com o LC3-II. No final do processo autofágico, o p62 é degradado (62, 63).

Importa referir, que a análise dos níveis de p62, juntamente com a avaliação dos níveis de LC3-II é importante para garantir uma correta interpretação do fluxo autofágico (61, 63).

A autofagia é frequentemente estudada no contexto tumoral, uma vez que como descrito acima, apresenta um duplo papel na progressão tumoral (promoção quer da sobrevivência quer da morte celular) (59). No caso dos ACT, o número de estudos que avaliaram a expressão das proteínas envolvidas na autofagia, tal como LC3 e o p62, é reduzido. No entanto, em estudos anteriores, em que avaliaram a expressão de LC3 em ACT, verificaram que o número de células isoladas dentro dos tumores, com expressão de LC3 era superior nos tumores malignos (64). Para além disso, também foi sugerido que a inibição da autofagia pode ser utilizada como terapia adjuvante do mitotano e da cisplatina para melhorar a eficácia da terapia (65). Contudo, um estudo mais detalhado, incluindo a avaliação do fluxo autofágico, é necessário para aprofundar o entendimento do papel da autofagia no contexto dos ACT e avaliar o potencial da translação deste conhecimento para a prática clínica (50, 66).

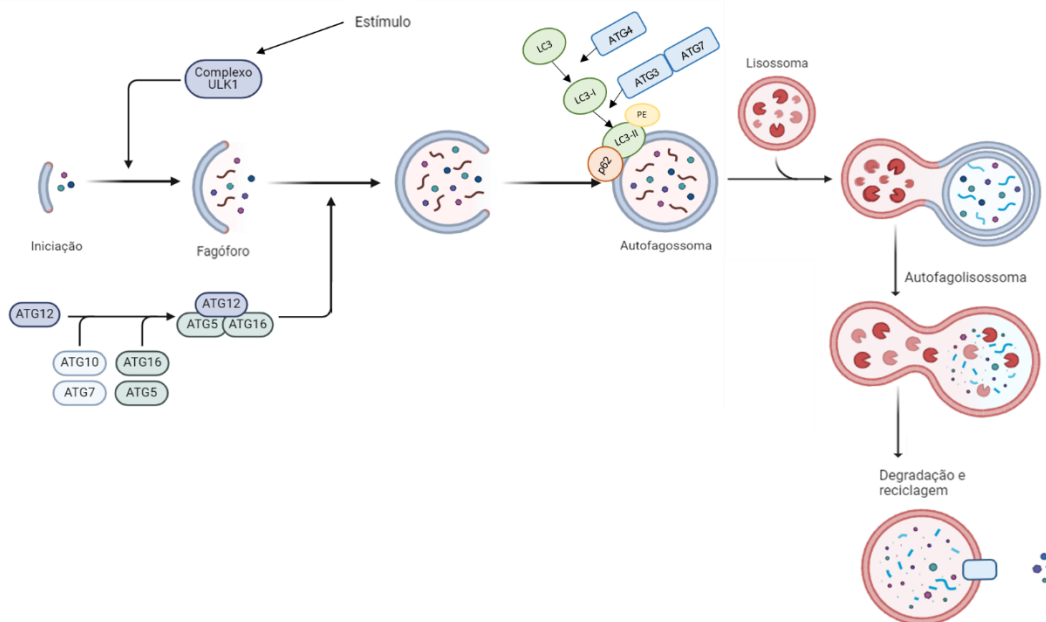


Figura 4- Esquema das várias etapas da autofagia. A autofagia é um processo altamente regulado, focado na degradação lisossomal dos componentes celulares e/ou reciclagem de componente citosólicos. A iniciação da formação do fagóforo inicia-se quando o complexo cinase ULK1 é ativado. Um conjunto de proteínas ATG constituem complexos funcionais, que são ativados e recrutados para membranas para iniciar a autofagia. A conversão de LC3-I em LC3-II na etapa da expansão da membrana e a degradação do p62 na etapa da maturação são passos cruciais do processo autofágico. Esquema adaptado do artigo (67) e criado no Biorender

2. Objetivo

Com este trabalho pretendemos avaliar a expressão de proteínas envolvidas na autofagia nos ACT e verificar se estas podem ser potenciais biomarcadores de diagnóstico ou prognóstico dos ACC. Além disso, pretendemos estudar o potencial terapêutico da autofagia no tratamento dos ACC.

3. Material e Métodos

3.1. Análise da expressão das proteínas autofágicas em tumores adrenocorticais

3.1.1 Amostras

Para este estudo foram utilizadas 40 amostras de ACT das quais 21 eram ACC e 19 ACA. Dentro dos ACA, 63% eram tumores não funcionantes (ACAn, n = 12) enquanto 37% eram ACA funcionantes produtores de cortisol (ACAc, n=7). Todas as amostras foram obtidas durante adrenalectomias.

As características dos pacientes e dos tumores estão presentes na tabela 3.

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da Unidade Local de Saúde de São João (CE 62-14), do Instituto Português de Oncologia (CE 14/2020) e da Unidade Local de Saúde de Santo António (173-DEFI/180-CE).

Tabela 3 – Características dos pacientes e dos respetivos tumores adrenocorticais.

	ACC	ACA	
		ACAn	ACAc
N	21	12	7
Idade à cirurgia	52 ± 10	59 ± 12	33 ± 7
Sexo F:M	14:7	9:3	6:1
Tamanho do tumor (cm)	10 ± 5,6	4,1 ± 2,2	3,5 ± 0,9
(intervalo)	(2,7-20)	(1,8-9,5)	(2,4-5)
Weiss score	3-8	0	0-1
(intervalo)			
ENSAT score			
1	17%		
2	25%	NA	NA
3	33%		
4	25%		
Funcionalidade			
N/F	10%	100%	0
Cortisol	10%	0	100%
Aldosterona	5%	0	0
Androgénios	10%	0	0
Cortisol + Androgénios	5%	0	0
Desconhecido	60%	0	0

ACC: Carcinoma adrenocortical; ACA: Adenomas adrenocorticais; ACAn: Adenomas adrenocorticais não funcionantes; ACAc: Adenomas adrenocorticais funcionantes com síndrome de cushing ENSAT: *European Network for the Study of Adrenal Tumors*; NA: Não aplicável.

3.1.2. Imunohistoquímica

Para avaliar a expressão das proteínas, envolvidas na autofagia, nomeadamente o ATG5, o LC3 e o p62 foi realizada a técnica de imunohistoquímica (IHQ).

Para isso, foram efetuados cortes histológicos de 3µm do tecido, para cada amostra e estes aderidos em lâminas adesivadas (SuperfrostTMPlus, Germany). Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados utilizando concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70%), seguidos de lavagem em água corrente. Em seguida, foi realizada a recuperação antigénica. Para o LC3 e o p62 este procedimento foi realizado através da utilização de uma solução de tampão citrato (0,01M, pH 6,0), durante 15 minutos, no microondas, enquanto para o ATG5 a recuperação antigénica foi feita utilizando uma solução de tampão citrato (0,01M, pH 6,0) na panela de pressão, durante 3 minutos. Posteriormente foram efetuadas 3 lavagens com o tampão fosfato salino (PBS), com Tween 20 (P1379-1L, Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), a 0,05% (PBS-T). Para o bloqueio da peroxidase endógena os cortes foram incubados com uma solução de peróxido de hidrogénio (Merck, Germany), a 3% em metanol (Fisher Scientific, UK), durante 20 minutos e de seguida foram feitas 3 lavagens em PBS-T.

Na IHQ efetuada para avaliação da expressão do LC3 e do p62, os cortes foram incubados durante 30 minutos, em câmara húmida, com soro normal de cabra (1:5 em Albumina sérica bovina (BSA) 10%, S-1000, Vector Laboratories, Newark, USA), para o bloqueio de marcação inespecífica. Na IHQ para estudo do ATG5, o passo do bloqueio com soro normal, não foi necessário. Posteriormente, os cortes foram incubados, também em câmara húmida, com os respetivos anticorpos primários, durante a noite, a 4°C (Tabela 4).

Tabela 4 – Referências e diluições dos anticorpos.

Anticorpo	Marca, Referência	Diluição
ATG5	Invitrogen, MA5-35339	1:100 em PBS-T
LC3B	Abcam, ab192890	1:500 em BSA 5%
p62	Abcam, ab109012	1:200 em BSA 5 %

ATG5: Autophagy protein 5; LC3: Protein light chain 3; p62: Sequestosome; BSA: Albumina sérica bovina; PBS: Tampão fosfato salino; PBS-T: tampão fosfato salino com 0,05%Tween 20.

De seguida, na IHQ para o ATG5, os cortes foram incubados, durante 60 minutos, à temperatura ambiente, com o polímero do kit comercial Dako Real™ EnVision™ (K5007, Dako, Dinamarca). Na IHQ para o LC3 e para o p62 os cortes foram incubados inicialmente, com o anticorpo secundário (BA-1000, Vector, preparado numa diluição de 1:200 em BSA 5 %), durante 30 minutos, à temperatura ambiente, e posteriormente incubados com o complexo Avidina-Biotina (ABC, PK-4000, Vector, Vectastain, 1:100 em BSA 5%).

O passo de revelação, foi realizado usando o DAB (3,3-diaminobenzidina, Dako) como cromogénio. Na IHQ do LC3, a incubação foi realizada durante 1 minuto. Na IHQ do ATG5 e na IHQ do p62, a incubação foi de 4 minutos. A contrastação nuclear foi realizada com hematoxilina mayer (1.09249.2500, Sigma-aldrich). Por último, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 95%, 100%) e montadas com *Entellan*, para depois serem observadas no microscópio ótico.

Os controlos positivos utilizados foram os seguintes: placenta para o ATG5, rim para o LC3 e estômago para o p62. Os mesmos tecidos sem incubação com o anticorpo primário, foram utilizados como controlo negativo.

3.1.3. Análise morfométrica computadorizada do LC3 e do ATG5, nos ACT

A marcação para o LC3, e para o ATG5 nas amostras de ACT, foi quantificada através da avaliação da proporção da área marcada a castanho, em relação ao tecido total da amostra.

Para isso, as lâminas foram digitalizadas utilizando o sistema *Olympus® VS110™ virtual slide scanning* e o programa *VS-ASW* (version 2.3 for Windows) e posteriormente analisadas usando o programa *imageJ*. (*National Institutes of Health, USA*). No *ImageJ*, a imagem original foi decomposta em 3 imagens de cores com base no sistema *Red-Green-Blue* (RGB). Desta forma, conseguimos obter a imagem com coloração castanha que, corresponde à marcação da proteína em análise e a imagem com coloração azul, que corresponde à coloração com hematoxilina e, portanto, à área total do tecido. Fazendo o rácio entre a área marcada para a proteína de interesse e a área total do tecido, obtivemos a % de área marcada das respetivas proteínas, por área de tumor.

3.1.4. Análise semi-quantitativa do p62, nos ACT

O p62 apresentou diferentes localizações dentro da célula, e por isso não foi possível recorrer a uma análise morfométrica computadorizada, como descrito para o ATG5 e o LC3. Em alternativa, realizou-se uma análise semi-quantitativa, adaptada do estudo Niklaus M *et al* (68), como apresentado na tabela 5.

Tabela 5- Descrição dos scores utilizados para avaliar as diferentes localizações dentro da célula.

	Score 0	Score 1	Score 2
Núcleo	<10% dos núcleos marcados	≥10% dos núcleos marcados	NA
Citoplasma	Sem expressão	Expressão intermédia	Expressão elevada
<i>Dot-like</i>	Ausente	Presente	NA

NA: não aplicável

Para avaliação da percentagem de núcleos marcados, nos ACT foram analisadas 10 fotografias aleatórias de cada caso, capturadas na ampliação 200x, e os núcleos quantificados usando o programa *ImageJ*. A análise da expressão do p62 foi realizada por duas pessoas individualmente.

3.2. Estudos *in vitro* da modulação da autofagia como potencial terapêutico em ACC

3.2.1 Cultura celular

A linha celular humana de ACC, JIL-2266, gentilmente cedida pelo Professor Martin Fassnacht (Univerisdade Würzburg, Alemanha), foi implementada no nosso laboratório. Estas células foram cultivadas em meio DMEM: F12 (1:3, Ham, Invitrogen, USA), suplementado com soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS (10%, Santa cruz Biotechnology, USA)), insulina (5ug/ml,Sigma-Aldrich, USA), hidro cortisona (0,4ug/ml, Sigma-Aldrich) toxina da cólera (8,4ng/mL, Sigma-Aldrich) , adenina (24 ug/ml ,Sigma-Aldrich), fator de crescimento epidérmico (*Epithelial-Growth Factor*, EGF, 10ng/ml, Invitrogen) e penicilina-streptomicina (15140-122, Gibco, Grand Island, USA), a partir de agora denominado por meio completo. As células foram mantidas a 37°C com uma atmosfera húmida de 5% de CO₂.

Uma vez que esta linha celular estava a ser estabelecida no laboratório pela primeira vez, efetuou-se a genotipagem da linha celular, com base no perfil *short tandem repeat* (STR), usando Powerplex 16 HS kit (Promega), no serviço de Genómica do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S). Em paralelo, foi realizado o teste do mycoplasma, através do método PCR em tempo real, para garantir a ausência de contaminação, no serviço *Cell culture and genotyping* do i3S.

3.2.2. Otimização da densidade celular

A otimização da densidade celular ideal para cada tipo de placa, foi efetuada pelo método de exclusão por azul de tripano.

Para isso, diferentes densidades das células JIL-2266 foram semeadas, em triplicado, em placas de 6, 12, 24 e 96 poços e incubadas a 37°C, em meio de cultura completo, durante 24h, 48h e 72h. As diferentes densidades celulares testadas foram baseadas na literatura (69). Após esse período, as células foram tripsinizadas e a densidade celular foi determinada. Para isso, foi adicionado o corante azul tripano (T8154, Sigma-Aldrich), à suspensão celular, na diluição de 1:10 e transferido para a câmara de Neubauer. As células viáveis (que não incorporaram o corante) e as células mortas (com o corante incorporado), foram contadas. As células viáveis em cada poço, foram determinadas através da seguinte equação:

$$\frac{n}{4} * x * 10^4 = \text{número de células/mL}$$

Onde n corresponde ao número de células viáveis contadas e o x corresponde à diluição que foi preparada.

3.2.3 Otimização da concentração do mitotano

3.2.3.1 Método Alamar blue

As células foram semeadas na densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço, em placas de 96 poços, em meio completo e incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Após 24h, foi adicionado a cada poço, 100µl de mitotano (C2719, Alsachim) nas concentrações (40, 80, 100 e 120µM), ou o respetivo veículo (EtOH), ou o branco (apenas meio completo) Além disso, na mesma altura, foi adicionado o *Alamar blue* (10%, BUF012B, AbD Serotec, UK). De seguida, às 0, 12, 18, 36, 42 e 48 horas após a incubação com mitotano, foram medidas as absorvâncias, no comprimento de onda de 570 nm e 595 nm, usando o leitor de placas (Thermo Scientific™ Multiskan™ Microplate Photometer). A % de redução da resazurina foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{redução} = \left(\frac{E_{ox\lambda 2} * A_{\lambda 1} - E_{ox\lambda 1} * A_{\lambda 2}}{E_{red\lambda 1} * A_{branco\lambda 2} - E_{red\lambda 2} * A_{branco\lambda 1}} \right) * 100$$

Onde:

$\lambda 1$ = absorvância lida a 570 nm

$\lambda 2$ = absorvância lida a 595 nm

E_{ox1} = coeficiente de oxidação a 570 nm = 80,573

E_{ox2} = coeficiente de oxidação a 595 nm = 117,216

E_{red1} = coeficiente de redução a 570 nm = 155,667

E_{red2} = coeficiente de redução a 595 nm = 14,652

3.2.3.2 Ensaio de exclusão do Azul de tripano

As células foram semeadas nas placas de 6 poços, na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poço e incubadas com meio de cultura completo, a 37°C com 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio foi removido, e as células foram incubadas, com diferentes concentrações de mitotano (40, 80, 100, 120 µM). Como controlo, as células foram incubadas com meio completo ou com um volume equivalente de veículo (EtOH). Após 24 e 48 horas, as células foram tripsinizadas e a densidade celular foi determinada após incubação com azul de tripano, como acima descrito, na secção 3.2.2.

3.2.4. Avaliação da expressão das proteínas LC3 e p62, nas células JIL-2266, por imunofluorescência

As células JIL-2266 foram semeadas ($2,5 \times 10^5$ células/poço), em lamelas imersas em placas de 6 poços, com meio completo ou com meio sem soro (como indutor da autofagia). Passadas 48 horas, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 5%, durante 15 minutos. As células foram em seguida permeabilizadas com triton X-100 0,3% (142314, Panreac, Espanha) durante 15 minutos e incubadas com BSA 1% preparada em PBS 0,3% triton X-100, durante 1 hora.

As células foram incubadas durante a noite, a 4°C, com os anticorpos: anti-p62 (1:250, ab109012, Abcam), ou anti-LC3 (1:250, ab192890, Abcam), diluídos em PBS com 1% BSA e 0,3% Triton X-100. No dia seguinte, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-Rabbit (1:1000, Alexa Fluor 555, ref.4413, Cell-Signaling Technology, Danvers, MA), durante 2 horas. Por fim, as lâminas foram montadas com o meio vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) que contém o DAPI para marcação dos núcleos. As prepações foram observadas num microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci-plus microscope, Nikon, Shi-nagawa, Tokyo, Japan).

3.2.5 Avaliação do efeito do mitotano na expressão do LC3 e p62 e no fluxo autofágico das células JIL-2266 por western blot

3.2.5.1 Cultura celular e extração proteica

As células foram plaqueadas ($2,5 \times 10^5$ células/poço) em placas de 6 poços, e incubadas durante 24 horas, com meio de cultura completo a 37°C e 5% de CO₂. Passado esse

tempo, para avaliar o efeito do mitotano na expressão das proteínas autofágicas, as células foram incubadas com mitotano nas concentrações de 40, 80, 100 e 120 μ M. Como controlo, as células foram incubadas com meio completo e com um volume equivalente de veículo (EtOH).

Para avaliar o efeito do mitotano no fluxo autofágico, após as 24 horas, efetuou-se o co-tratamento das células JIL-2266 com mitotano e com um inibidor da autofagia (bafilomicina). As células foram incubadas durante 4 horas com mitotano (40 μ M), bafilomicina (20nM, B1793, Sigma-Aldrich), ou ambos (co-tratamento), como representado na figura 5. Como controlo, as células foram incubadas com meio completo e com um volume equivalente de veículo (EtOH no caso do mitotano e DMSO no caso da bafilomicina).

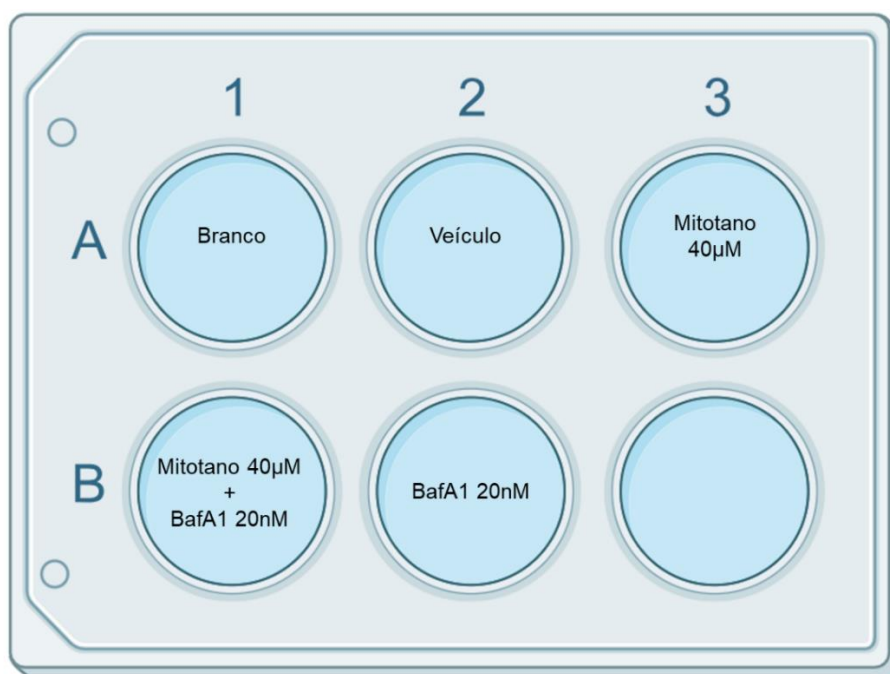


Figura 5- Esquema das condições do ensaio da monitorização do fluxo autofágico em placa de 6 poços. BafA1- Bafilomicina; Veículo: veículo do mitotano (EtOH) e veículo da bafilomicina (DMSO).

Após os tempos acima referidos, o *pellet* foi recolhido em cada condição e efetuou-se a lise celular. Para isso, as células foram tripsinizadas e as suspensões celulares foram centrifugadas a 1500 rpm, durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi lavado com PBS e centrifugado novamente. Depois de descartar o sobrenadante, foram adicionados ao *pellet* 30 μ l de tampão lise (RIPA), suplementado com um cocktail de inibidor de proteases (04693124001, Roche, Suíça). Durante a lise celular, as amostras foram mantidas em gelo durante 30 minutos, com agitação. Após centrifugação a 14000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C, recolheu-se o sobrenadante.

3.2.5.2 Western blot

Após a extração proteica, a concentração de proteína foi quantificada utilizando o kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific™ Pierce™), de acordo com as instruções do comerciante. Em resumo, numa placa de 96 poços, adicionou-se a cada poço 25µl de cada amostra ou dos padrões com concentrações crescentes de BSA. Posteriormente, adicionou-se 200µl de uma solução contendo ácido bicinconínico (BCA) em todos os poços. De seguida, a placa foi incubada a 60°C. Passados 30 minutos, a absorbância (570nm) foi medida no leitor de placas. Para a separação das proteínas por eletroforese (SDS-PAGE), após a desnaturação, a 95°C, por 5 minutos, 15µg de proteínas foram corridas em gel de agarose (15% de acrilamida). Em seguida, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad laboratories, UK) e a transferência foi confirmada, através da incubação da membrana com a solução de Ponceau (P7170-1L, Sigma- Aldrich). A membrana foi posteriormente bloqueada com leite a 5%, numa solução salina tamponada de Tris, contendo 0,05% Tween 20 (TBS-T), durante 1 hora. Passado este tempo, a membrana foi incubada a 4°C, durante a noite, com o respetivo anticorpo primário: anti-GAPDH (1:10000, Ab8245, Abcam, UK) ou anti-LC3 (1:2500, ab192890, Abcam) ou anti-p62 (1: 10000, ab109012, Abcam), diluídos em leite 5%, em TBS-T. De seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário, anti-rabbit conjugado com a enzima Horseradish Peroxidase (HRP) (1:10000, ab6721, Abcam) à temperatura ambiente, durante 1 hora. A revelação foi realizada por quimioluminescência usando o reagente de deteção Enhanced chemiluminescence (ECL) (1705060, Bio-Rad) no sistema de imagem Chemi-Doc™ XRS+ System (Bio-Rad). As intensidades das bandas foram quantificadas utilizando o programa Image Lab (versão 6.1, Bio-Rad Laboratories).

3.3. Análise estatística

Todas as variáveis contínuas estão apresentados como média $\pm$ erro padrão, a não ser que esteja especificado de forma diferente. As variáveis categóricas estão apresentadas como n e a respetiva percentagem. A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada através do teste Shapiro-Wilk. Para as variáveis com distribuição normal, utilizou-se o teste ANOVA com a análise post-hoc de Dunnett, para comparar mais do que dois grupos e o teste t para comparar apenas dois grupos. Para as variáveis que não apresentam distribuição normal, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis com a análise post-hoc de Dunn, para comparar mais do que dois grupos e o teste Mann-Whitney para comparar dois grupos. As variáveis categóricas foram comparadas entre os vários grupos utilizando o teste de Fisher ou o chi-squared test, dependendo do tamanho

amostral. A correlação entre as variáveis com distribuição normal, foi avaliada através do teste de Pearson, enquanto que a correlação entre variáveis que não apresentam distribuição normal foi realizada pelo teste de Spearman. Para comparar a sobrevida após cirurgia, dos pacientes com os diferentes parâmetros de expressão do P62 utilizou-se o teste Kaplan-Meier, enquanto que para o LC3 e o ATG5 utilizou-se a regressão de Cox ajustada à idade. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para determinar a acuidade de diagnóstico dos diferentes marcadores, usou-se o valor da área abaixo da curva Receiver Operating Characteristic, (ROC) (AUC), onde um valor compreendido entre 0,9 e 1 é considerado excelente, entre 0,8 e 0,9 bom, entre 0,7 e 0,8 razoável, entre 0,6 e 0,7 fraco e, abaixo de 0,6 muito fraco. As análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad (versão 8.0.1, para o Windows, La Jolla, CA, USA), com exceção das regressões de Cox, que foram realizadas recorrendo ao programa SPSS (versão 29, para o Windows, USA).

4. Resultados

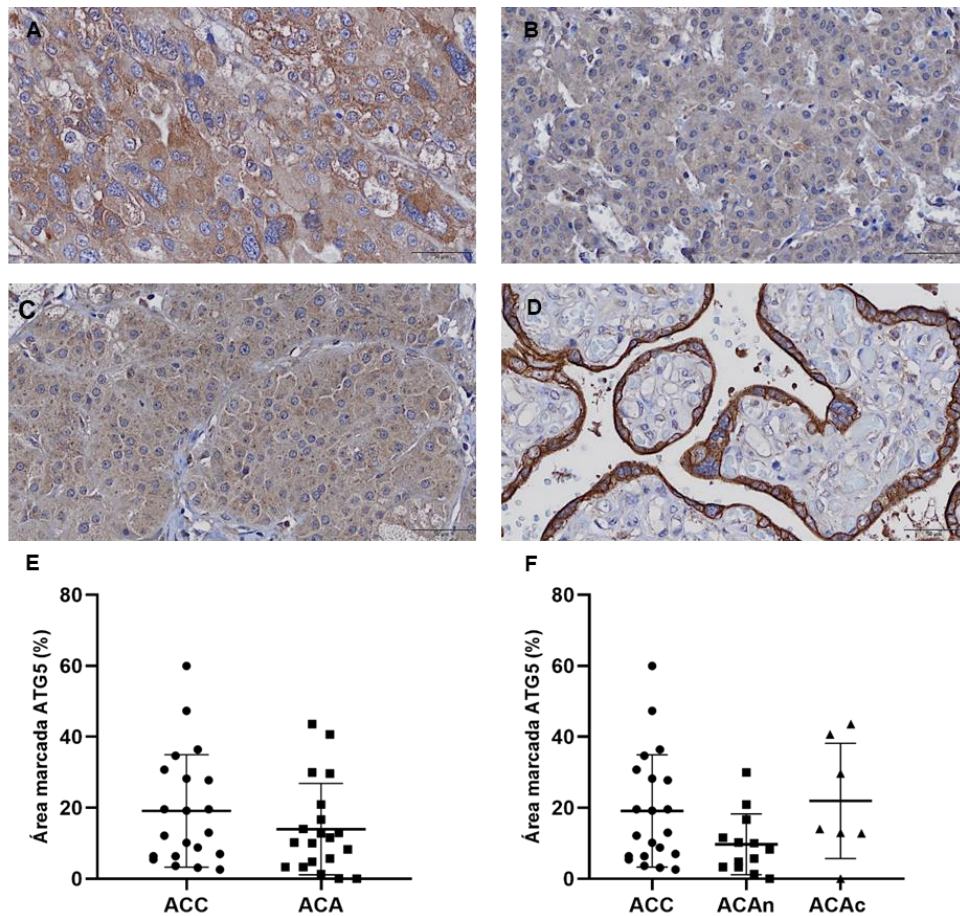


Figura 6 - Cortes histológicos de ACT marcados para a proteína ATG5 (200x). A: carcinoma adrenocortical (ACC), B: adenoma adrenocortical não funcionante (ACAn), C: adenoma adrenocortical funcionante com síndrome de Cushing (ACAc), D: controlo positivo (placenta), E: representação gráfica da área marcada entre ACC e ACA (Teste t: $p>0,05$), F: representação gráfica da área marcada entre os ACC e os ACAn e ACAC (ANOVA: $p>0,05$).

4.1.2 Expressão do LC3 nos ACT

O LC3 estava expresso em todos os casos com exceção de 1 ACC e 1 ACAC. A localização observada para o LC3 foi citoplasmática (Figura 7).

A expressão de LC3 foi semelhante nos ACC ($25,37 \pm 4,27\%$) e ACA ($17,56 \pm 1,66\%$, $p=0,37$) (Figura 7E), independentemente da funcionalidade (ACAn: $17,29 \pm 1,94\%$, $p=0,37$; ACAC: $18,13 \pm 3,42$, $p=0,66$, Figura 7F).

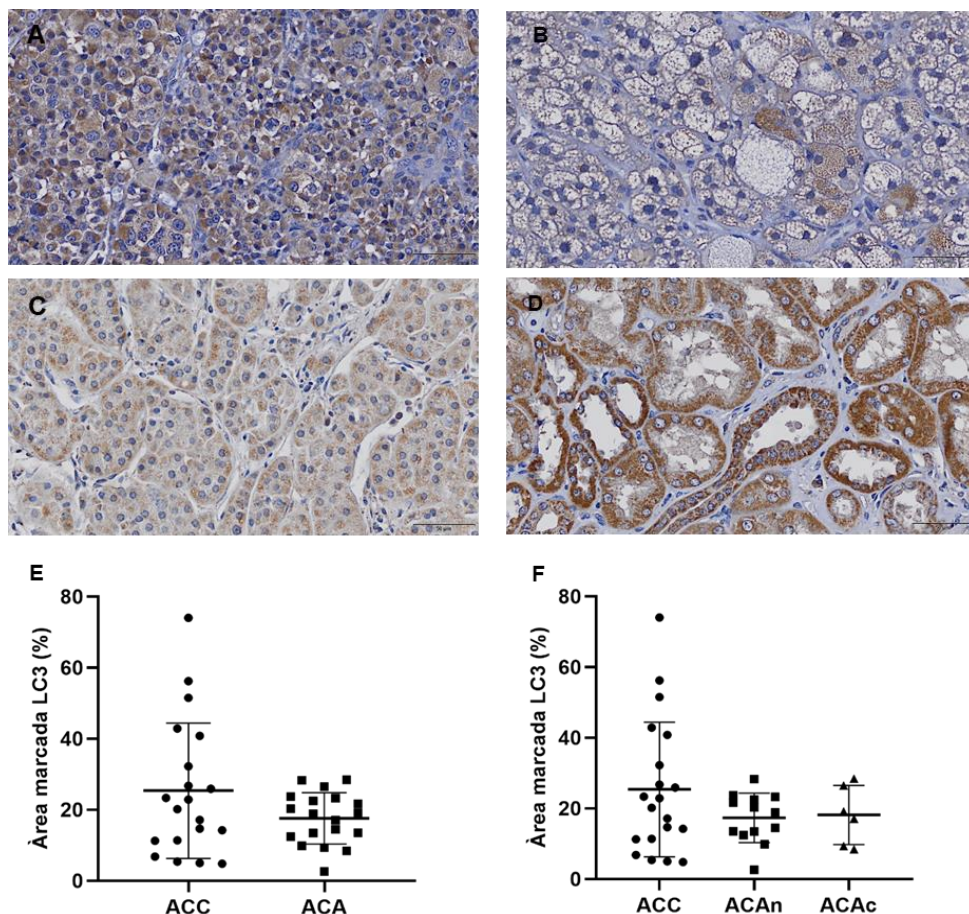


Figura 7 - Cortes histológicos de ACT marcados pelo anticorpo LC3 (200x). A: carcinoma adrenocortical (ACC), B: adenoma adrenocortical não funcionante (ACAn), C: adenoma adrenocortical funcionante com síndrome de Cushing (ACAC), D: controlo positivo (rim), E: representação gráfica da área marcada entre ACC e ACA (Teste t: $p>0,05$), F: representação gráfica da área marcada entre os ACC e os ACAn e ACAC (ANOVA: $p>0,05$).

4.1.3 Expressão do p62 nos ACT

O p62 estava expresso em todos os casos de ACT, exceto em 2 ACC e 1 ACAn. A análise da marcação do p62 não foi efetuada utilizando a mesma metodologia das

proteínas anteriores, uma vez que este não se localizava apenas num único compartimento celular. Foi possível observar quer marcação nuclear quer citoplasmática. Dentro da citoplasmática, verificamos que havia tumores com marcação difusa e outros do tipo *dot-like* (ponteados nas células). Uma vez que esta proteína foi analisada de forma diferente das restantes, os resultados serão apresentados isoladamente. Na figura 8, 9 e 10 estão representadas as diferentes marcações e a distribuição pelos diferentes grupos de ACT.

Em relação à localização nuclear, observaram-se significativamente menos ACC com este tipo de marcação em comparação com os ACA (5,56% vs 72,22%, $p < 0,0001$, Figura 8G). Não se verificaram diferenças significativas entre os restantes grupos ($p > 0,05$, Figura 8H)

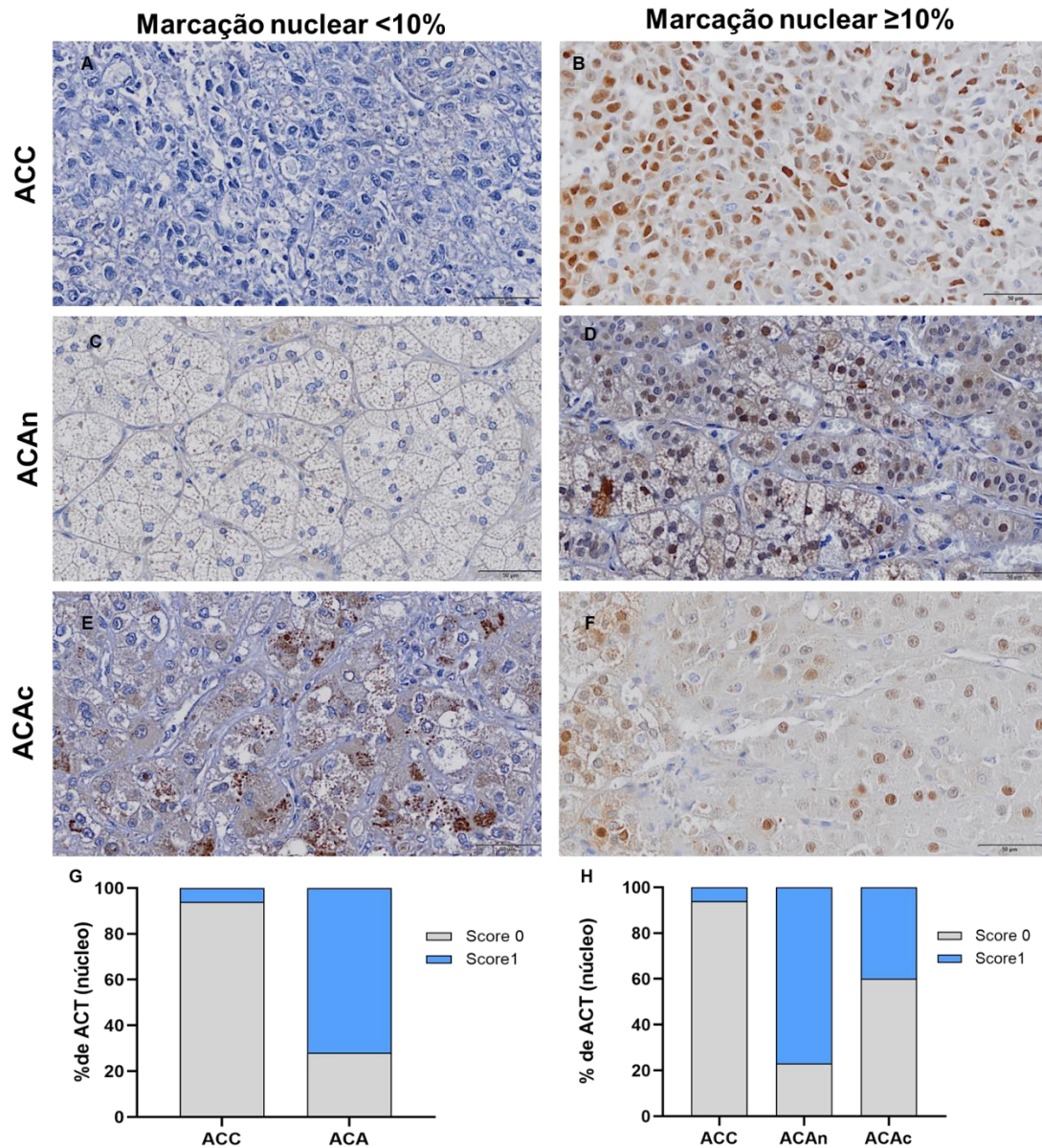


Figura 8- Imagens representativas da localização nuclear do p62 (200x). A: ACC com expressão nuclear <10%; B: ACC com expressão nuclear ≥10%; C: ACAn com expressão nuclear <10%; D: ACAn com expressão nuclear ≥10%; E: ACAC com expressão nuclear <10%; F: ACAC com expressão nuclear ≥10%; G e H: Distribuição dos casos pela expressão do p62, entre ACC, ACA (ACAn e ACAC), onde a azul encontram-se os casos com ≥10% de expressão nuclear (azul) e a cinzento os casos com <10% de expressão nuclear (cinzento) ($p < 0,0001$ entre ACC e ACA, teste de Fisher).

O número de tumores com marcação citoplasmática e a respetiva intensidade, foi semelhante entre os diferentes grupos de ACT ($p > 0,05$, Figura 9).

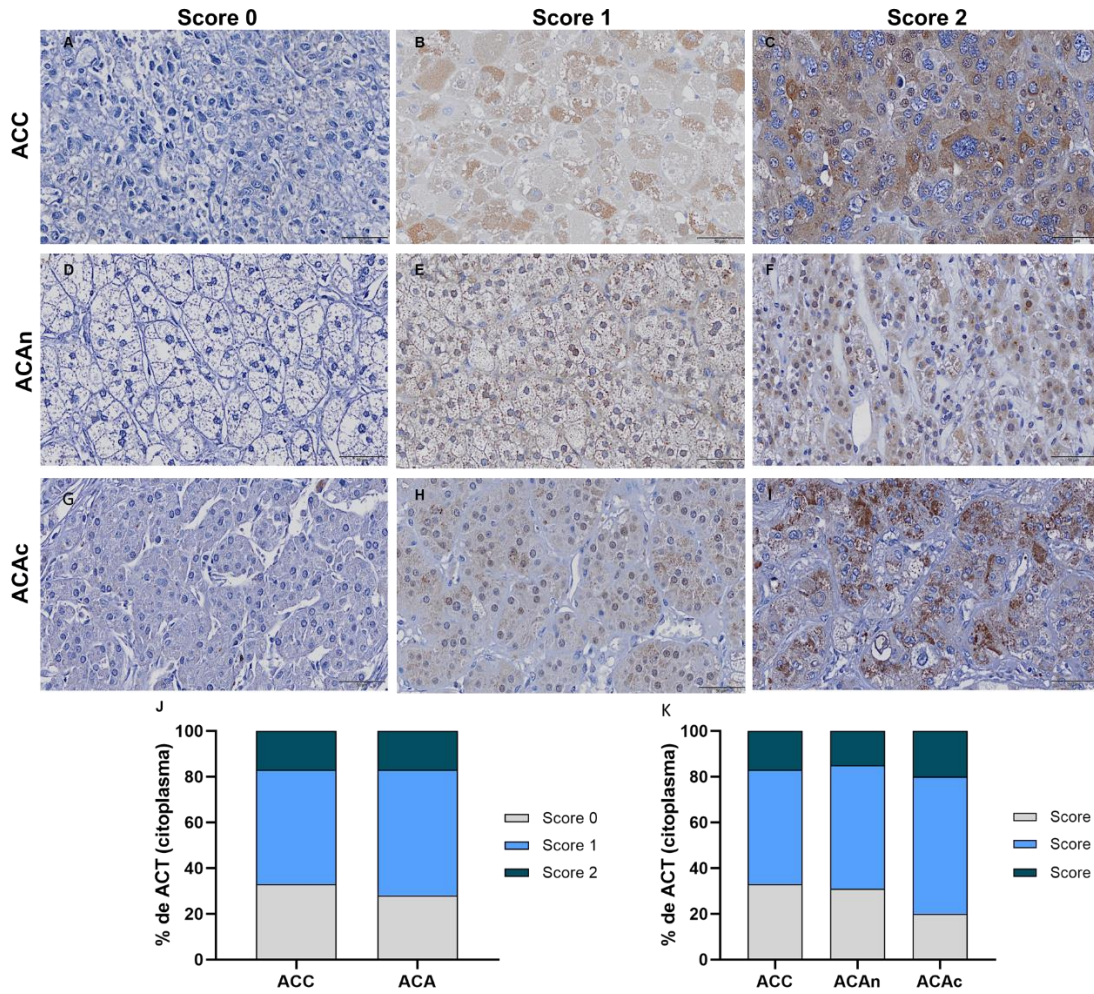


Figura 9- Imagens representativas da marcação citoplasmática do p62 (200x). A: ACC com score 0; B: ACC com score 1; C: ACC com Score 2; D: ACAn com score 0; E: ACAn com score 1; F: ACAn com Score 2; G: ACAC com score 0; H: ACAC com score 1; I: ACAC com Score 2; J: Distribuição dos casos de ACC e ACAn quanto ao score 0 (cinzento), score 1 (azul) e score 2 (azul-escuro); K: Distribuição dos casos de ACC, ACAn e ACAC quanto ao score 0 (cinzento), score 1 (azul) e score 2 (azul-escuro) ($p > 0,05$, teste de Fisher).

Quando analisada a marcação do tipo *dot-like* entre os tumores, verificou-se que a % de ACT com este tipo de marcação era semelhante nos vários grupos ($p > 0,05$, Figura 10)

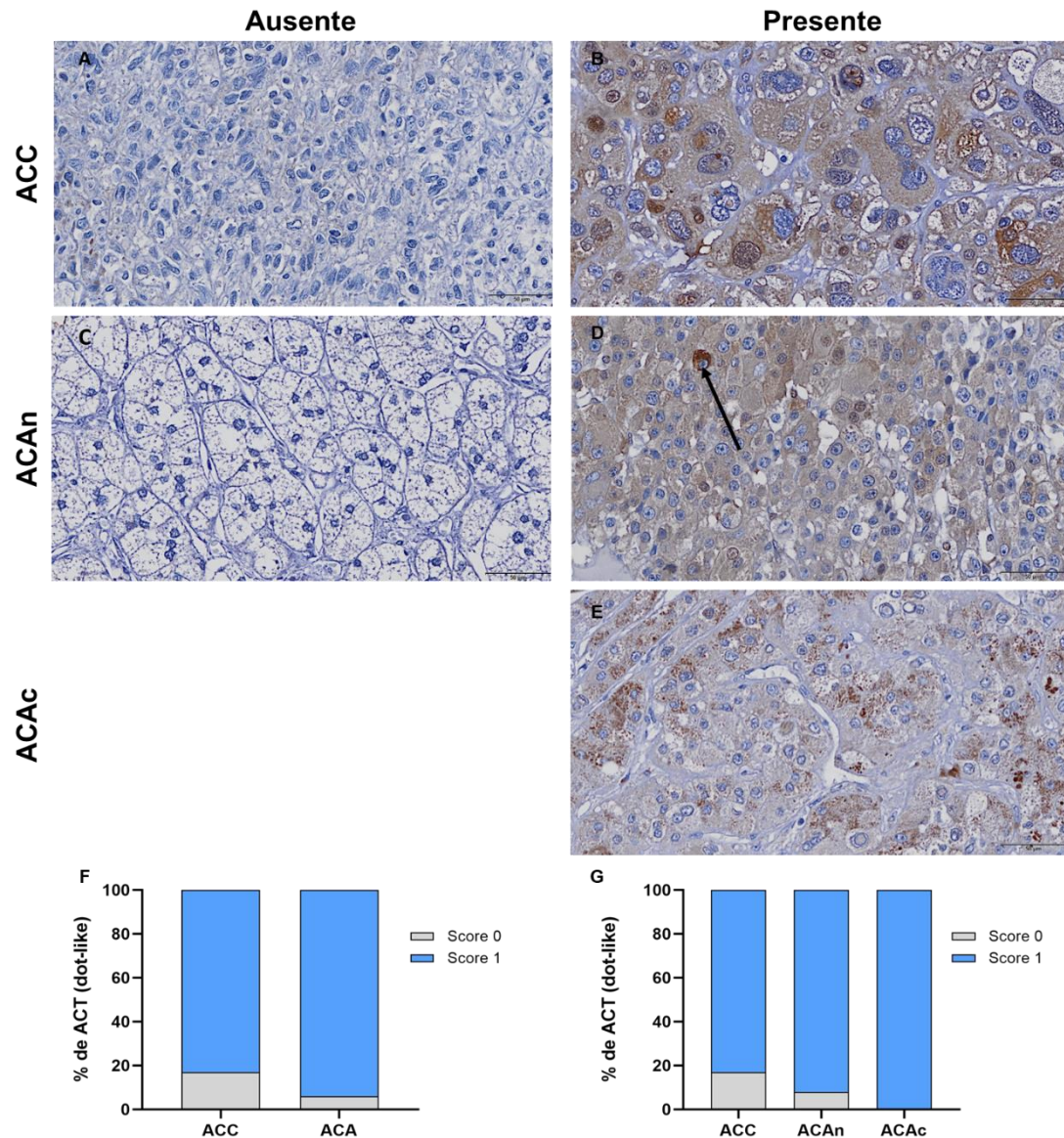


Figura 10- Imagens representativas da marcação *dot-like* do p62 (200x). A: ACC sem marcação *dot-like*; B: ACC com marcação *dot-like*; C: ACAn sem marcação *dot-like*; D: ACAn com marcação *dot-like* (seta); E: ACAC com marcação *dot-like*; F: Distribuição dos casos quanto à presença (azul) ou ausência (cinza) de marcação do tipo *dot-like*, entre ACC e ACAn; G: Distribuição dos casos quanto à presença (azul) ou ausência (cinza) de marcação do tipo *dot-like*, entre ACC, ACAn e ACAC, ($p > 0,05$, teste de Fisher).

4.1.4 Acuidade das proteínas ATG5, LC3 e p62 para o diagnóstico de ACC

A acuidade das proteínas ATG5, LC3 e p62 para o diagnóstico dos ACC, foi realizada recorrendo-se às curvas ROC (Figura 11 e 12). Tanto para o ATG5 como para o LC3, as AUC das curvas ROC foram inferiores a 0,7, pelo que estas proteínas demonstraram uma baixa acuidade para distinguir os ACC dos ACAn, independentemente da funcionalidade (Figura 11).

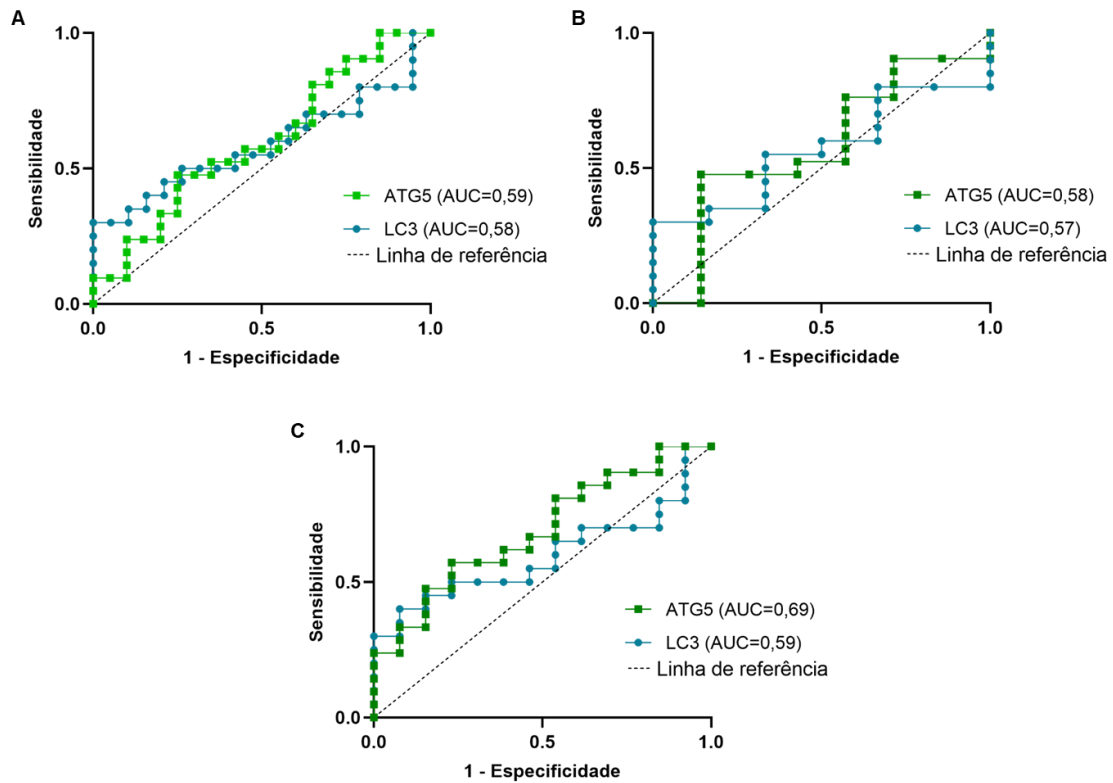


Figura 11- Representação gráfica das curvas ROC para os marcadores ATG5 e LC3. A: análise entre carcinomas (ACC) e adenomas (ACA), B: análise entre carcinomas (ACC) e adenomas funcionantes (ACAc) com síndrome de Cushing, C: análise entre carcinomas (ACC) e adenomas não funcionantes (ACAn).

Através da análise da marcação nuclear para o p62, obtivemos valores de AUC de 0,83, entre ACC e ACA, 0,77 entre ACC e ACAc e de 0,86 entre ACC e ACAn. Assim, a marcação nuclear parece ter uma boa acuidade de diagnóstico entre ACA e ACC. Para os restantes tipos de marcação, os valores de AUC foram inferiores a 0,7 (Figura 12).

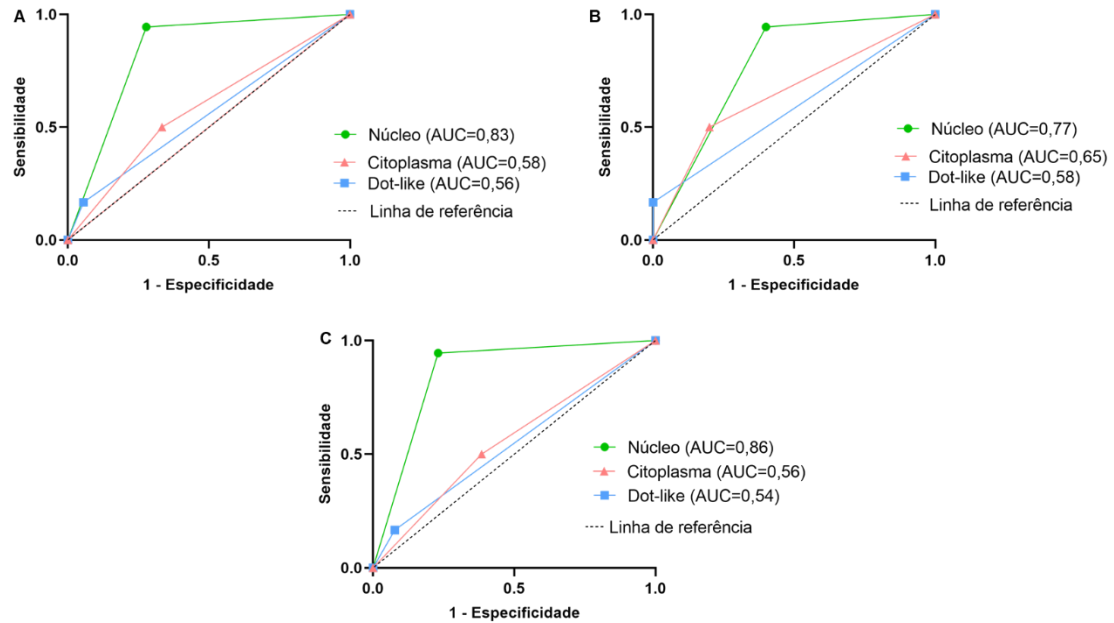


Figura 12 Representação gráfica das curvas ROC para as várias localizações do marcador p62 A: análise entre carcinomas e adenomas, B: análise entre carcinomas e adenomas funcionantes com síndrome de Cushing, C: análise entre carcinomas e adenomas não funcionantes

4.1.5 Correlação das características dos pacientes e dos tumores com a expressão do ATG5, do LC3 e do p62

Não foram observadas correlações significativas entre a expressão dos marcadores autofágicos e as características dos pacientes, nem nos grupos dos ACC, nem nos grupos de ACA, independentemente da funcionalidade (Tabela 6).

Tabela 6- Correlação dos marcadores com as características dos pacientes e dos tumores nos ACT.

Correlação		Coeficiente de correlação (r)			p
Proteína	Características dos pacientes/tumores	ACC	ACAn	ACAc	
ATG5	Idade	-0,04	0,07	0,23	ns
	Tamanho do tumor	-0,001	-0,32	0,56	ns
	Weiss score	0,19	-	-	ns
	ENSAT score	0,35	-	-	ns
LC3	Idade	0,08	0,18	-0,87	ns
	Tamanho do tumor	0,12	-0,19	-0,18	ns
	Weiss score	0,04	-	-	ns
	ENSAT score	-0,02	-	-	ns

Para o grupo dos ACC correlacionou-se ainda a percentagem de área marcada com a classificação ENSAT, presença ou não de metástases, invasão capsular, invasão venosa e invasão sinusoidal. Nenhuma diferença foi observada entre a expressão das proteínas e os vários parâmetros (Tabela 7). No entanto, de notar que os ACC que apresentam maior expressão de ATG5, têm valores de Weiss score superiores e apresentam invasão capsular, venosa e sinusoidal.

Tabela 7- Percentagem de área marcada do ATG5 e do LC3 (metastização, a classificação ENSAT e presença de invasão capsular, venosa e sinusoidal).

		ATG5	LC3
Metastização	sim	12,9 ± 3,67	17,68 ± 12,59
	não	17,67 ± 5,37	27,45 ± 8,451
	p	0,62	0,52
ENSAT	1 e 2	8,75 ± 2,88	32,09 ± 15,05
	3 e 4	22,72 ± 5,91	19,47 ± 5,922
	p	0,08	0,39
Invasão Capsular	sim	16,06 ± 3,91	20,57 ± 4,193
	não	10,91 ± 8,31	45,57 ± 28,44
	p	0,44	0,41
Invasão Venosa	sim	15,57 ± 6,11	29,06 ± 6,95
	não	14,20 ± 3,39	24,31 ± 9,055
	p	0,96	0,46
Invasão Sinusoidal	sim	17,51 ± 4,22	24,82 ± 6,76
	não	11,95 ± 7,950	28,95 ± 11,83
	p	0,54	0,76

Relativamente ao p62 também não foram observadas diferenças significativas entre a localização da sua marcação e os vários parâmetros dos ACC analisados (Tabela 8).

Tabela 8- Tipo de marcação celular do p62 de acordo com a metastização, a classificação ENSAT e a presença de invasão capsular, venosa e sinusoidal).

		Nuclear		Citoplasma		Dot-like	
		Ausente	Presente	Baixo	Alto	Ausente	Presente
ENSAT	1-2	100%	0%	0%	100%	50%	50%
	3-4	100%	0%	20%	80%	60%	40%
	<i>p</i>	>0,9999		>0,9999		>0,9999	
Metástases	Yes	100%	0%	33%	67%	33%	67%
	No	100%	0%	67%	33%	0%	100%
	<i>p</i>	>0,9999		0,5238		0,3333	
Invasão Capsular	Yes	100%	0%	50%	50%	10%	90%
	No	100%	0%	0%	100%	0%	100%
	<i>p</i>	>0,9999		>0,9999		>0,9999	
Invasão venosa	Yes	100,00%	0%	50%	50%	0%	100%
	No	100%	0%	57%	43%	14%	86%
	<i>p</i>	>0,9999		>0,9999		>0,9999	
Invasão sinusoidal	Yes	100%	0%	56%	44%	11%	89%
	No	100%	0%	33%	67%	0%	100%
	<i>p</i>	>0,9999		>0,9999		>0,9999	

4.1.6 Acuidade das proteínas ATG5, LC3 e p62 para o prognóstico de ACC

A acuidade das proteínas ATG5 e LC3 para o prognóstico de ACC foi avaliada através das regressões de Cox, ajustadas à idade (Tabela 9).

A expressão destas proteínas não se correlacionou com a sobrevida após cirurgia, dos pacientes com ACC (Tabela 9).

Tabela 9- Regressão de Cox ajustada à idade para as proteínas ATG5 e LC3.

Proteína	HR	95% CI	p
ATG5	1,07	0,99 -1,17	0,10
LC3	1,03	0,99 -1,08	0,12

Para o p62, utilizou-se o método de *Kaplan-Meier* para comparar os diferentes tipos de marcação desta proteína, com a sobrevida dos pacientes com ACC, após cirurgia (Figura 13). Uma vez que não tínhamos informação relativa aos pacientes com ACC com marcação nuclear e com um score de 2 no citoplasma, não foi possível verificar se estas características têm influência no tempo de sobrevida destes pacientes. As restantes marcações celulares não apresentaram relação com o tempo de sobrevida dos pacientes (Figura 13).

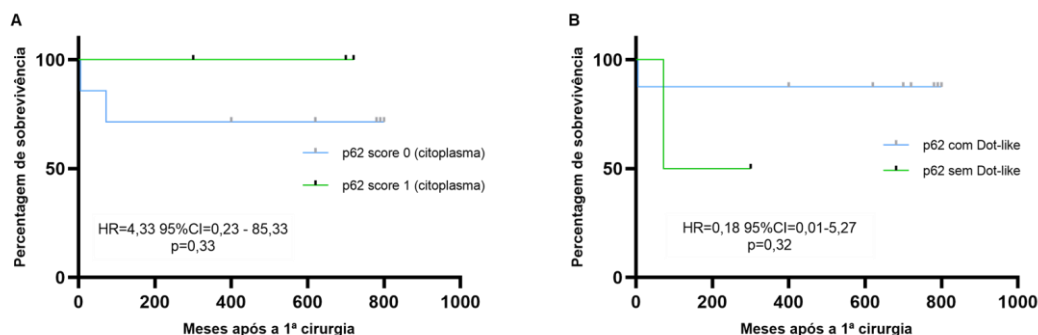


Figura 13- Curvas de Kaplan-Meier para estimar a probabilidade de sobrevivência de acordo com os diferentes tipos de marcação para o p62.

4.2 Análise do potencial terapêutico da autofagia em ACC

4.2.1 Implementação da linha celular JIL-2266

Os estudos mecanísticos *in vitro* para melhorar o conhecimento sobre ACC e explorar novas estratégias terapêuticas são ainda um desafio dada a complexidade biológica e a raridade da doença, o que limita a disponibilidade de modelos celulares.

Para ultrapassar este desafio, durante este estudo, estabelecemos uma nova colaboração com o grupo do Professor Martin Fassnacht (Univerisdade Würzburg,

Alemanha) que desenvolveu recentemente uma nova linha celular de ACC, JIL-2266. Esta linha celular foi implementada no laboratório e após genotipagem para validação da sua autenticidade (Figura suplementar 1), verificou-se ainda que as células estavam ausentes de mycoplasma (Figura suplementar 2).

O número de células escolhido a plaquear em placas de 6, 12, 24 e 96 poços, para efetuar os trabalhos *in vitro* de estudo da autofagia subsequentes, encontra-se na Tabela 10. A escolha foi baseada na análise dos gráficos (Figura suplementar 3) relativos à viabilidade e densidade celular, nos vários tempos testados (24, 48 e 72 horas).

Tabela 10- Otimização da densidade celular por poço para as placas de 6, 12, 24 e 96 poços.

Placa	Densidade celular/poço
Placa de 6 poços	$2,5 \times 10^5$
Placa de 12 poços	1×10^5
Placa de 24 poços	5×10^4
Placa de 96 poços	$1,5 \times 10^4$

4.2.2 Análise da expressão do LC3 e p62 na linha celular JIL-2266

À semelhança dos ACT avaliados por imunohistoquímica, avaliou-se a expressão de LC3 e p62 na linha celular de ACC JIL-2266 (Figura 14). Para além disso, e apesar de não ter sido possível quantificar, em condições de privação de nutrientes (meio sem soro- descritas como indutoras de autofagia), o perfil de localização do p62 e do LC3 observado assemelhava-se mais ao tipo “*puncta*” em relação às células cultivadas em meio com 10% de soro.

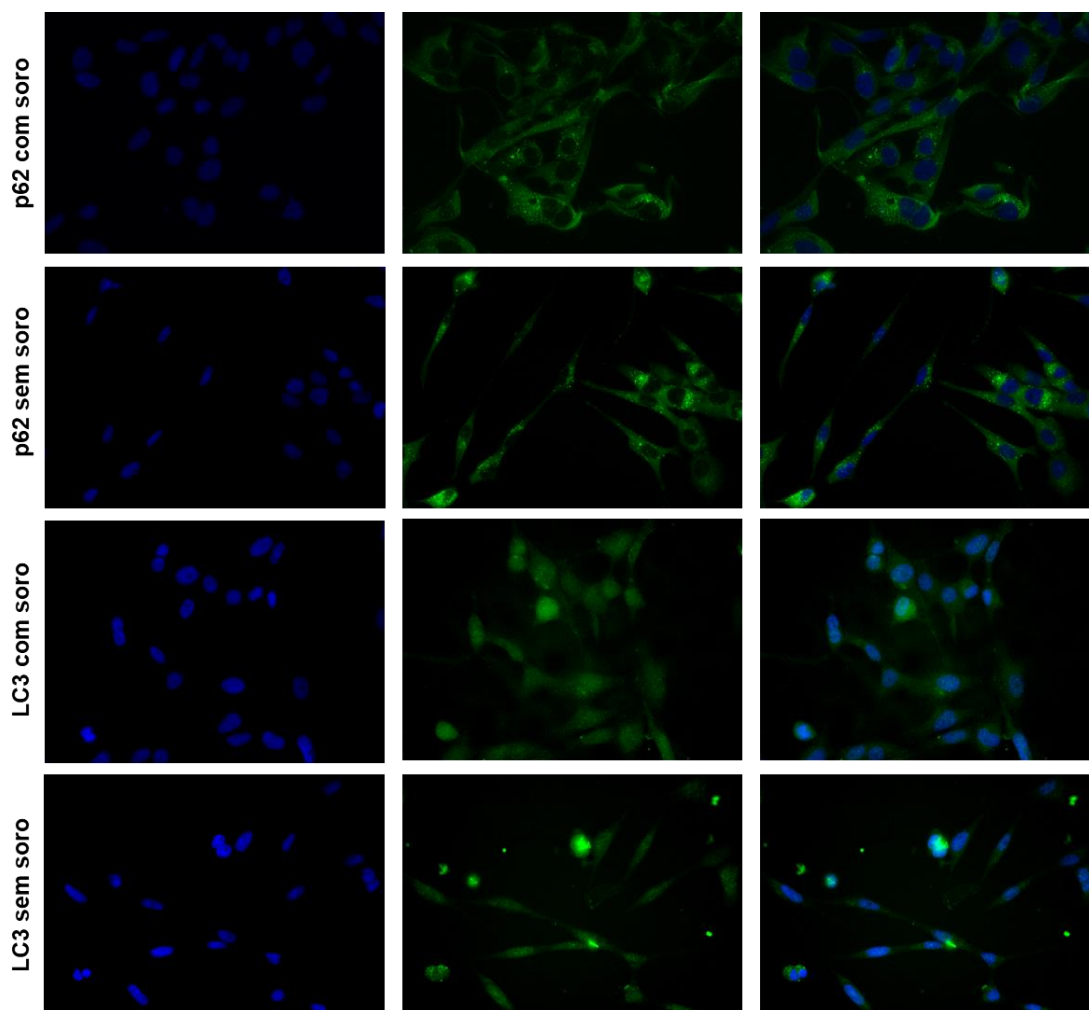


Figura 14- Marcação do LC3 e do p62 nas células JIL-2266, analisado por imunofluorescência (400x), azul: DAPI (núcleos); verde: LC3 ou p62.

4.2.3 Efeito do mitotano na expressão do LC3 e p62 na linha celular JIL-2266

Visto que o único fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do ACC é o mitotano (70), e após a confirmação da expressão das proteínas autofágicas nas células JIL-2266, o objetivo foi avaliar o potencial terapêutico da modulação da autofagia nos ACC. Para isso, avaliou-se primeiro o efeito do tratamento do mitotano nesta linha celular, nomeadamente na expressão do LC3 e do p62.

Inicialmente foi necessário otimizar a concentração de mitotano adequada para os estudos *in vitro*. Para isso, avaliou-se a viabilidade celular através do ensaio com o *alamar blue*. No entanto, não se observaram diferenças significativas entre as diferentes concentrações de mitotano e o veículo, em nenhum dos tempos avaliados ($p > 0,05$, Figuras 15 e 16). Importa referir que a observação microscópica indicou menor número de células a partir do tratamento com a dose $80\mu\text{M}$ às 24h, o que sugeriu que o mitotano estaria a influenciar o metabolismo celular e por isso a diminuição da densidade celular

estava a ser mascarada no ensaio de *alar blue*. Concluiu-se assim que este ensaio não era o adequado para a otimização da dose apropriada de mitotano para os estudos de autofagia e, por isso em alternativa efetuou-se o ensaio de exclusão por azul de tripano.

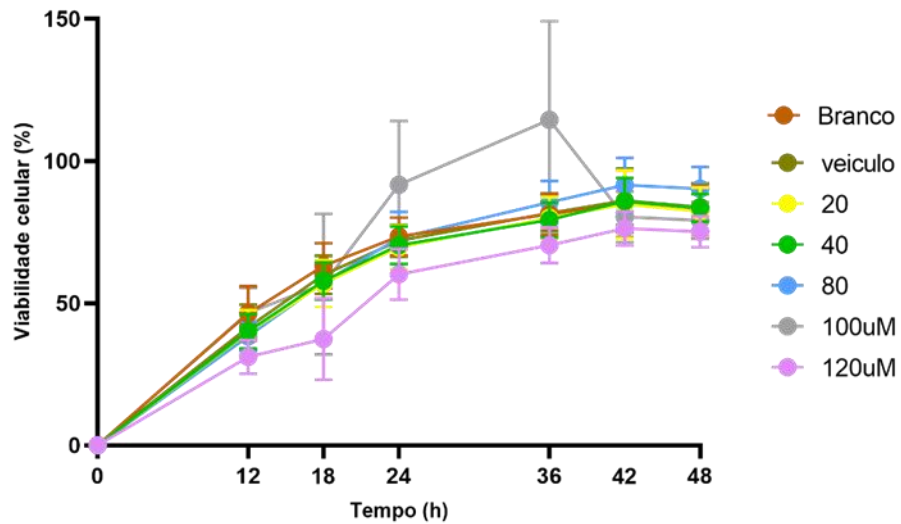


Figura 15- Efeito das diferentes concentrações de mitotano (20, 40, 80, 100, 120 µM) na viabilidade das células JIL-2266 analisado pelo ensaio de *alar blue*, n=5.

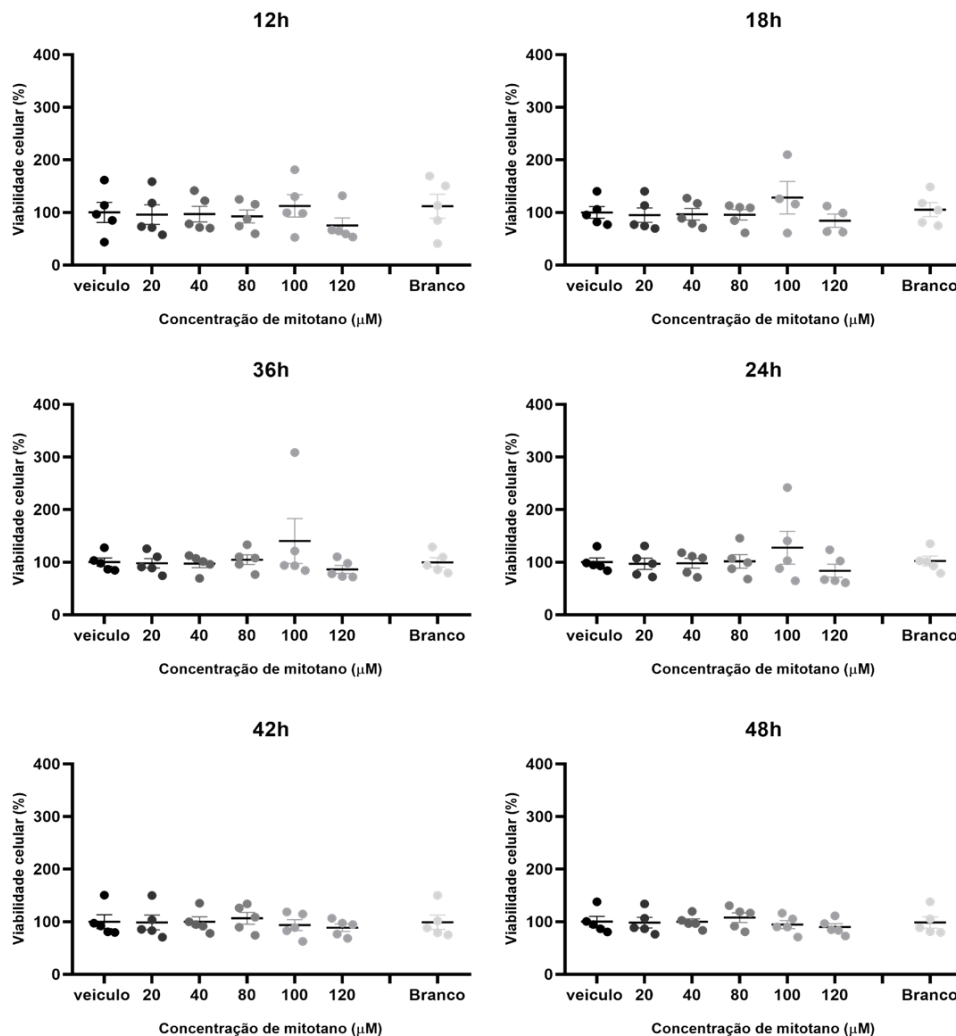
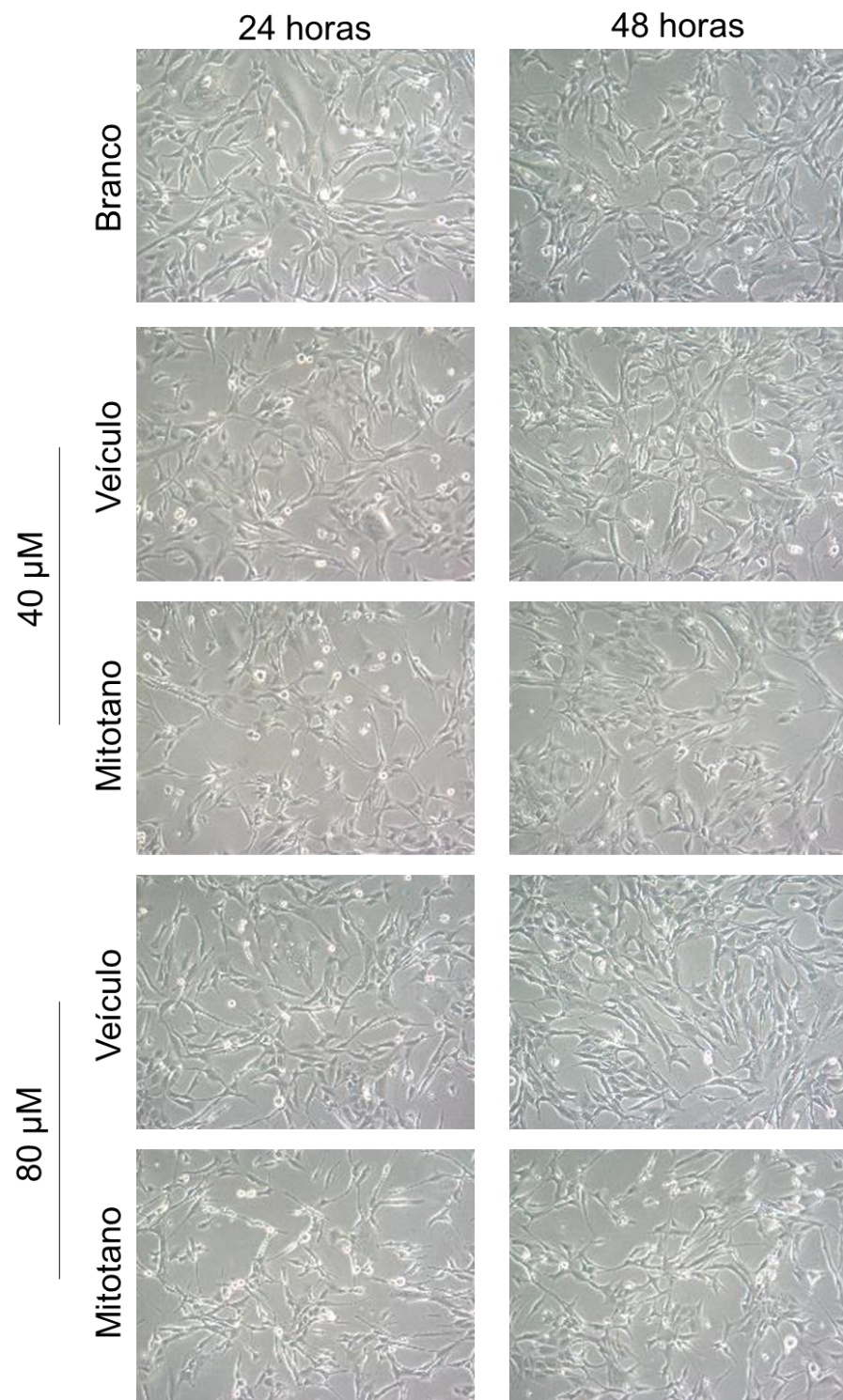


Figura 16- Efeito das diferentes concentrações de mitotano (20, 40, 80, 100, 120 µM) na viabilidade das células JIL-2266, avaliado pelo ensaio de *alamar blue*, normalizado ao veículo, em diferentes tempos (n=5).

Para o ensaio de exclusão por azul de tripano, com base na otimização anterior do número de células e do descrito na bibliografia referente às doses de mitotano, as células JIL-2266 foram semeadas ($2,5 \times 10^5$ células/poço) em placas de 6 poços e tratadas com diferentes concentrações de mitotano (40, 80, 100, 120 µM) assim como com o respetivo veículo (EtOH) e apenas com meio (branco), durante 48 horas.

O número de células viáveis nas condições de 100 e 120µM de mitotano foram significativamente menores relativamente ao veículo ($49 \pm 12,4\%$, $p < 0,05$, e $17 \pm 3,5\%$, $p < 0,001$, respetivamente) (Figura 17 e 18). A análise microscópica efetuada em paralelo, corroborou que nas condições referidas as células apresentavam diferente morfologia e redução no número de células vivas (Figura 17) em relação às células tratadas com o veículo ou com o branco.



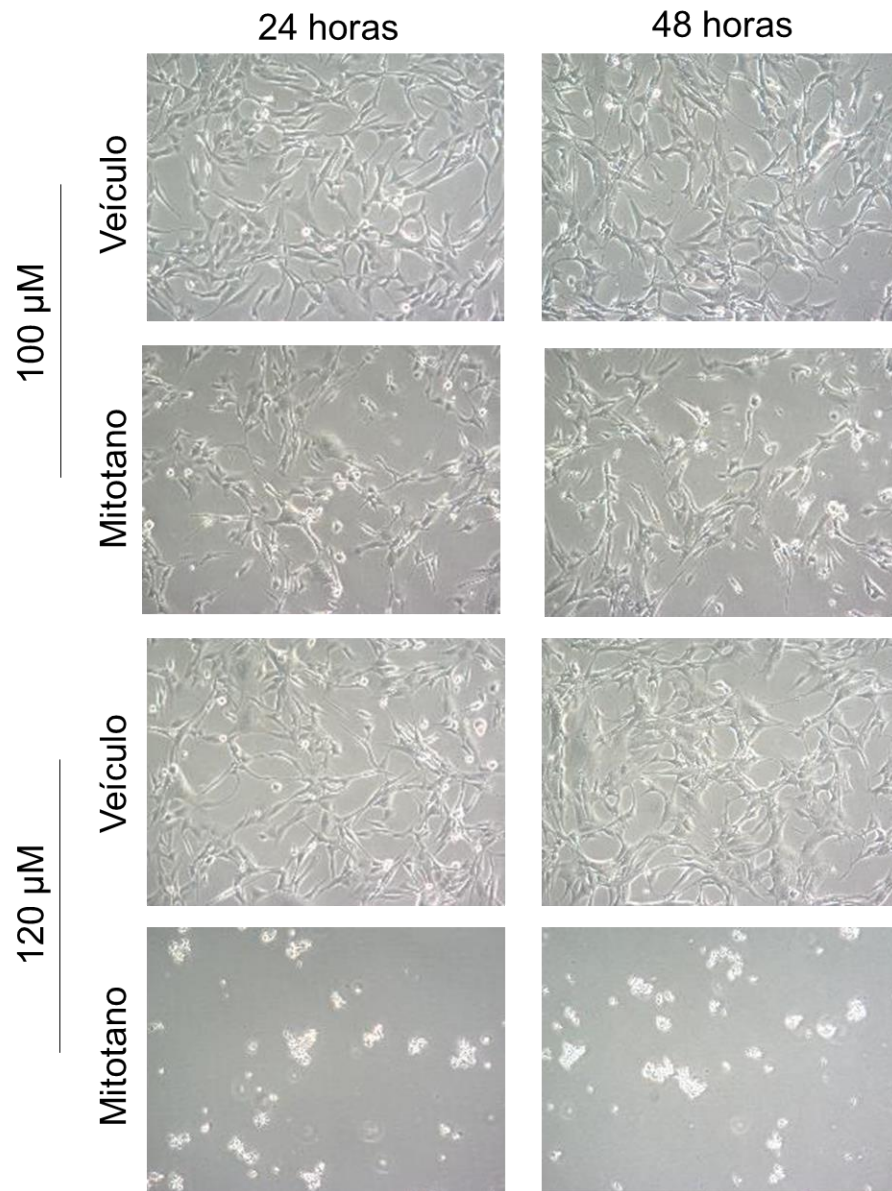


Figura 17- Efeito das diferentes concentrações de mitotano (20, 40, 80, 100, 120 μM), na morfologia das células (100x).

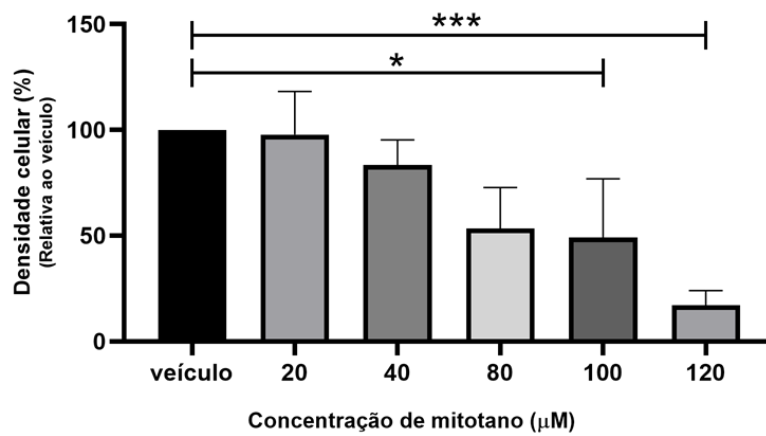


Figura 18- Efeito das diferentes concentrações de mitotano (20, 40, 80, 100, 120 μ M), na densidade celular analisado pelo ensaio de exclusão por azul de tripano (teste de *Kruskal-Wallis* (* $p < 0,05$ entre o tratamento com mitotano 100 μ M e o veículo; *** $p < 0,001$ entre o tratamento com mitotano 120 μ M e o veículo).

De seguida, a expressão do LC3 (-I e -II) e do p62 foi analisada por *western blot* após o tratamento das células JIL-2266 com mitotano.

Nas células tratadas com concentrações de mitotano mais elevadas (a partir dos 100 μ M) a expressão do LC3-II estava aumentada em relação ao respetivo veículo. Os níveis do p62 não apresentaram alterações relevantes em nenhuma das condições testadas. (Figura 19).

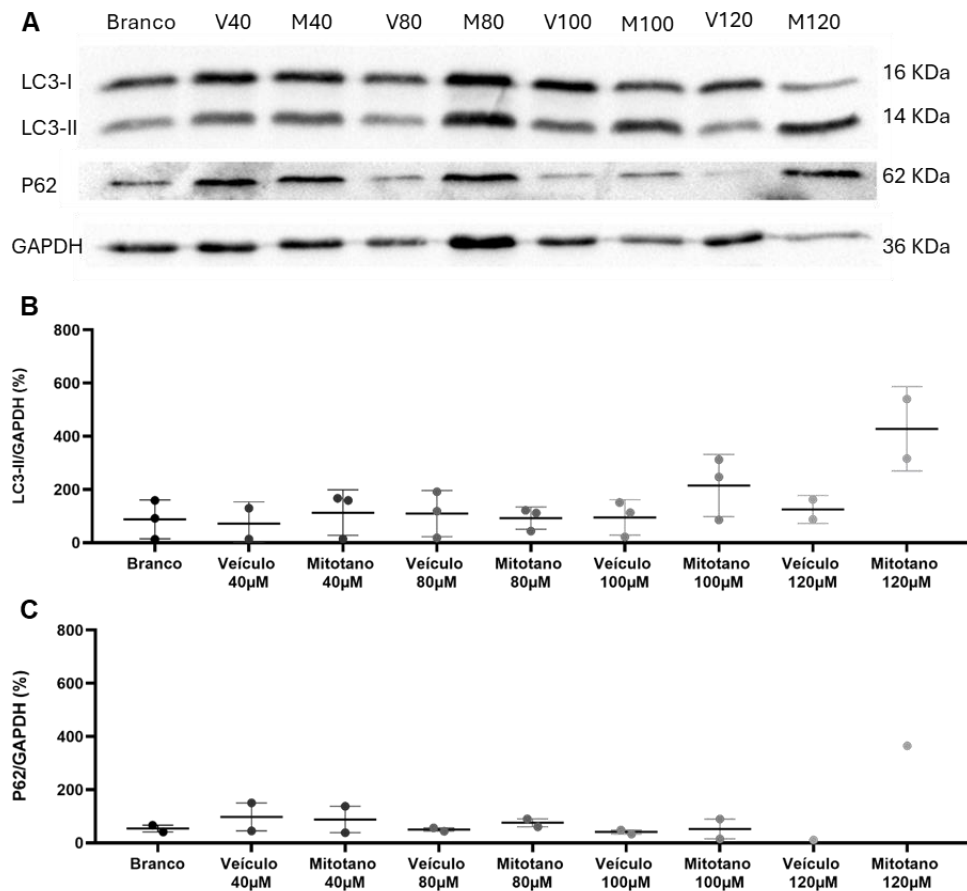


Figura 19- Efeito do mitotano nos níveis de expressão do LC3 e do p62, nas células JIL-2266, analisado por western blot. As células foram tratadas só com meio completo (branco), com as várias concentrações de mitotano e com os respetivos veículos de cada concentração, A: imagem representativa do western blot do LC3, p62 e GAPDH, B: Quantificação da expressão de LC3-II normalizada para o GAPDH onde cada ponto corresponde a uma réplica biológica, C: Quantificação da expressão de p62 normalizada para o GAPDH, onde cada ponto corresponde a uma réplica biológica, *Kruskal-Wallis*, $p > 0,05$.

4.2.4 Estudo do fluxo autofágico na linha celular JIL-2266 após tratamento com mitotano

Por último, para avaliar o fluxo autofágico em células tratadas com mitotano, foi efetuado o co-tratamento do fármaco com a bafilomicina (inibidor da autofagia na formação do autofagolisossoma). As células JIL-2266 foram tratadas com mitotano (40µM) e com bafilomicina (20 nM) durante 4 horas, segundo as indicações das *guidelines* do estudo da autofagia (50).

Verificou-se que os níveis de LC3-II estavam aumentados quando as células eram co-tratadas com mitotano e bafilomicina comparando com as células que tratadas apenas com mitotano. Os níveis de p62 não mostraram alterações consideráveis (Figura 20).

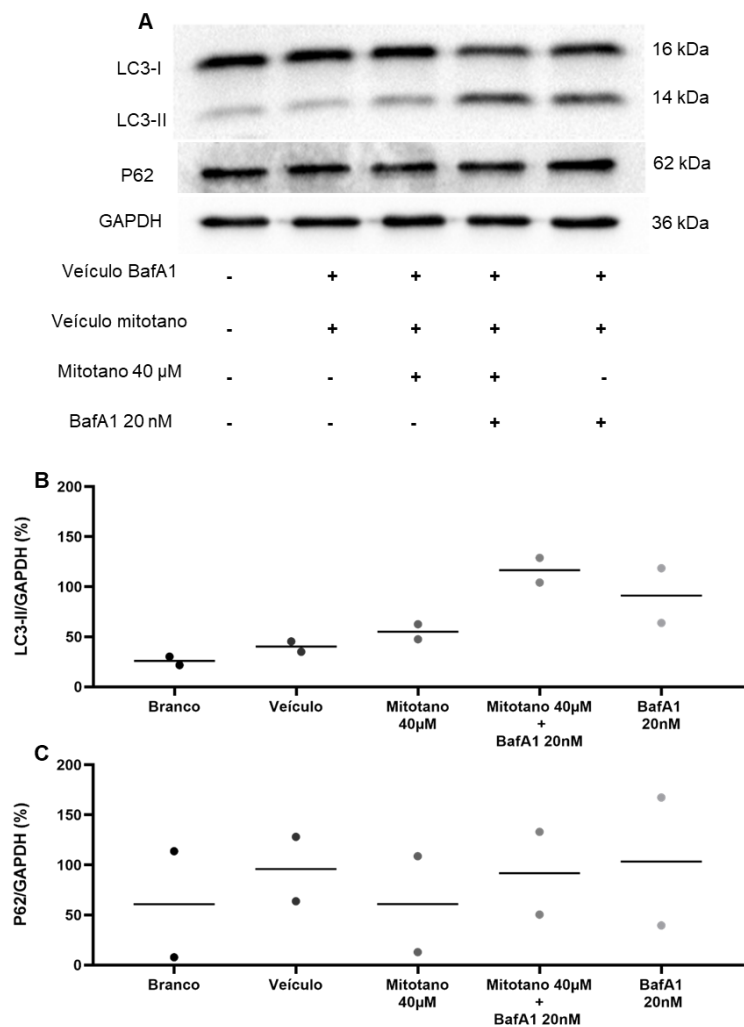


Figura 20- Efeito do co-tratamento do mitotano com a bafilomicina nos níveis de expressão de LC3-II e p62, analisado por western blot. As células foram tratadas durante 4 horas com mitotano 40 µM e com bafilomicina 20nM, A: western blot da expressão do LC3, p62 e GAPDH, B: quantificação da expressão do LC3-II normalizada para o GAPDH, onde cada ponto corresponde a uma réplica biológica, C: quantificação expressão do p62 normalizada para o GAPDH, onde cada ponto corresponde a uma réplica biológica.

5. Discussão

O diagnóstico diferencial entre ACA e ACC é atualmente baseado em características radiológicas e histológicas pouco específicas (71). Além disso, a cirurgia completa (R0) é o único tratamento com potencial curativo para os ACC. Quando essa opção não é viável, recorre-se ao tratamento farmacológico com mitotano, o único fármaco disponível para esses tipos de tumores (72). Assim, a dificuldade em identificar precocemente os ACC e o número reduzido de terapias disponíveis para esta patologia, resultam numa percentagem elevada destes pacientes com um prognóstico desfavorável (73). Atualmente, os fatores de prognóstico utilizados são a classificação ENSAT e o Ki-67. Contudo, estes fatores não têm capacidade de abranger a heterogeneidade biológica dos ACC (74). Por isso, é fundamental estudar mecanismos celulares relevantes em oncologia, como a autofagia, para entender melhor a patofisiologia dos ACC e identificar novos marcadores moleculares que possam ser utilizados na prática clínica para o diagnóstico e/ou prognóstico desses tumores.

O primeiro objetivo deste estudo foi analisar a expressão de proteínas envolvidas na autofagia (ATG5, LC3 e p62) em ACA e ACC e avaliar o potencial destas proteínas para o diagnóstico e/ou prognóstico dos ACC.

O ATG5 é uma proteína envolvida nas fases iniciais da autofagia, em particular na formação do autofagossoma (75). Neste estudo, verificamos que a % de área marcada para esta proteína foi semelhante entre ACA e ACC. No entanto, verificamos uma grande heterogeneidade na % de área marcada nos ACC. Curiosamente, os ACC com maior expressão de ATG5 são tumores com o Weiss score mais elevado, e que apresentaram invasão capsular, venosa e sinusoidal, sugerindo que esta proteína poderá estar envolvida na progressão dos ACC. Estudos anteriores, noutros tipos de tumores, reportaram que a inibição do ATG5, por siRNA ou após tratamento com cloroquina, impede a transição epitelial-mesenquimal (EMT), tornando as células de carcinoma gástrico menos invasivas (76, 77). No cancro colorretal, a expressão de ATG5 parece estar associada a um aumento da invasão vascular tumoral (78). Assim, estes estudos e os resultados do nosso trabalho apontam para o papel desta proteína na progressão tumoral.

O LC3 é um dos principais marcadores utilizados para identificar a formação de autofagossomas. O LC3 apresenta-se como LC3-I e LC3-II. O LC3-I é a forma citosólica e é convertido em LC3-II quando sofre lipidação (conjugação de fosfatidiletanolamina) e se liga à membrana do autofagossoma. Tal ocorre após indução do fluxo autofágico. Esta proteína é importante no reconhecimento do conteúdo a degradar e no fecho do fagóforo (79). Neste estudo, verificamos que o LC3 está expresso na maioria dos ACT

e que apesar de não ser significativo, a sua expressão foi superior nos ACC. Além disso, verificou-se que há uma heterogeneidade superior na expressão de LC3 dentro deste grupo, em comparação com os ACA. Kim HM *et al* também avaliaram a expressão de LC3 em ACT e classificaram todos os ACC como negativos para esta proteína, com a exceção da existência de células positivas isoladas dentro do tecido. Curiosamente, nesse estudo verificou-se que a presença dessas células era significativamente superior em ACC em comparação com os ACA (64). Importa salientar que não é possível comparar os nossos resultados com os descritos no estudo de Kim HM *et al*, uma vez que: i) efetuaram a análise em *tissue microarrays* e, portanto, num fragmento de tecido muito inferior ao que foi utilizado neste estudo e ii) o método de avaliação da expressão foi diferente (64). No entanto, tendo em consideração os resultados obtidos por ambos os estudos podemos concluir que o LC3 parece estar aumentado nos ACC, mas que há uma grande heterogeneidade na expressão desta proteína quer inter-, quer intratumoral. De notar que a avaliação do LC3 por IHQ no presente estudo, não permite a distinção entre a forma conjugada e não conjugada do LC3, pelo que não poderemos relacionar diretamente os resultados obtidos com o estado da autofagia nos ACC.

O p62 é uma proteína importante na autofagia, uma vez que se liga ao material ubiquitinado e ao LC3-II, promovendo a degradação do conteúdo celular (80). No final do processo autofágico, esta proteína é também degradada e desta forma, a diminuição na expressão de p62 sugere que há indução da autofagia(81). Contudo, para confirmar que a autofagia está a ser induzida, a avaliação da expressão do p62 é complementada por ensaios para a monitorização do fluxo autofágico (82). No nosso estudo verificamos uma heterogeneidade na marcação intratumoral, quer na localização celular (núcleo e citoplasma), quer na marcação citoplasmática (marcação difusa ou em *dot-like*). Esta heterogeneidade intratumoral para a expressão do p62 já foi anteriormente descrita em ACT (64). A marcação do p62 em *dot-like* foi descrita anteriormente como sendo um bom indicador de autofagia por estar relacionada com a acumulação de agregados dentro de autofagossomas (83). No presente estudo, verificamos que este tipo de marcação estava presente tanto em ACA como em ACC, numa percentagem semelhante.

Verificamos ainda que o número de ACC com expressão de p62 no núcleo foi significativamente inferior em comparação com os ACA. Um estudo anterior, que também avaliou a expressão de p62 em ACT, verificou que a expressão desta proteína era semelhante em ACC e ACA. No entanto, esse estudo não avaliou isoladamente a marcação do p62, nos vários compartimentos celulares (64).

Para além do papel do p62 na autofagia, esta proteína quando localizada no citoplasma, ativa a via *Nuclear Factor Kappa B* (NF-KB), uma via que promove a proliferação e sobrevivência das células tumorais, levando à expressão de genes associados à invasão tumoral (84). Já no núcleo, esta proteína tem capacidade de interagir com fatores envolvidos na regulação da transcrição génica, como *Nuclear Factor Erythroid 2-Related factor 2* (NRF2) (regula a transcrição de genes que protegem a célula do stress oxidativo), genes pró-inflamatórios através da interação com a via NF-KB (resposta inflamatória) e reparação de danos no DNA, podendo ser associada a um bom prognóstico (85). Assim, os nossos resultados sugerem que a reduzida % de localização nuclear de p62 parece ser uma característica dos tumores adrenocorticais malignos. Isto é corroborado pela análise das proteínas autofágicas como potenciais marcadores de diagnóstico, no presente estudo, onde a marcação nuclear do p62 demonstrou ser um bom biomarcador, ao contrário, das restantes proteínas analisadas.

Estudos anteriores demonstraram que a autofagia tem um papel importante na disponibilização de colesterol, necessária para a esteroidogénese (86). Por consequência, quando a autofagia está inibida, há um comprometimento da esteroidogénese e, portanto, há uma diminuição da síntese de esteroides (87). Por isso, a avaliação das proteínas autofágicas foi avaliada de acordo com a funcionalidade dos ACA. No entanto, não se verificaram diferenças entre ACA funcionantes e não funcionantes sugerindo que a autofagia não parece estar envolvida no mecanismo associado à produção ou não de hormonas, neste tipo de tumores. Esta análise não foi realizada nos ACC porque a nossa coorte de ACC apresenta uma grande variabilidade em relação à funcionalidade e os respetivos subgrupos seriam muito pequenos.

Em relação ao prognóstico, nenhuma das proteínas se correlacionou com a sobrevida dos doentes, após cirurgia e por isso, nenhuma parece ter potencial como marcador de prognóstico neste tipo de tumores.

Os resultados da imunohistoquímica dos ACT demonstraram que a maioria dos ACC expressam ATG5, LC3 e p62 e que os ACC com expressão mais elevada de ATG5 apresentam um Weiss score maior, logo tumores mais agressivos. Desta forma, pretendeu-se avaliar ainda se a autofagia se poderia relacionar com a resposta à terapia em ACC. O mitotano, o único fármaco aprovado para o tratamento de ACC, apresenta grandes limitações visto que uma elevada percentagem de pacientes, desenvolvem resistência a este fármaco. Desta forma, é essencial uma compreensão dos mecanismos de ação do mitotano (88, 89).

O mitotano promove a morte celular em parte por causar stress no RE. A autofagia é um mecanismo associado à resistência dos tumores à terapia, nomeadamente pela inibição da morte celular causada pelo stress do RE. Desta forma a modulação da autofagia poderá ser um mecanismo de resistência ao mitotano (90). De facto, a terapia combinada de mitotano com cloroquina (um inibidor tardio da autofagia) promoveu níveis mais elevados de (*Poly (ADP- ribose) polymerase*) (PARP) clivada (sugerindo maior indução de apoptose), quando comparados com o tratamento isolado com mitotano, numa linha celular proveniente de uma metástase hepática num doente ACC com síndrome de Lynch (CU-ACC2) (65). Apesar do número reduzido de publicações sobre a autofagia em ACC, para além do estudo anterior, destaca-se o estudo que reporta que o tratamento concomitante de outro fármaco, cisplatina, com cloroquina aumentou a taxa de apoptose da linha celular de ACC, SW13, quando comparado com a monoterapia com cisplatina. Estes resultados foram confirmados *in vivo* (66). Verificou-se ainda que o tratamento das células SW13 com ácido tauroursodeoxicólico diminuiu o stress do RE, induziu autofagia e inibiu a apoptose das células ACC (90). Importa salientar que a indução da autofagia referida acima foi avaliada pelo aumento dos níveis de LC3-II. Contudo, como descrito nas *guidelines* dos estudos da autofagia, para a monitorização da indução ou inibição da autofagia é essencial avaliar o fluxo autofágico (50).

Assim, o segundo objetivo deste trabalho foi estudar o fluxo autofágico de células de ACC em resposta ao tratamento com mitotano.

Para isso, neste estudo utilizamos como modelo uma linha celular de ACC, a JIL-2266. Esta linha celular foi implementada no nosso laboratório no decorrer deste trabalho experimental. A linha celular JIL-2266 foi recentemente estabelecida pelos nossos colaboradores e demonstra ser um modelo promissor para o estudo da doença, pois é derivada de um tumor primário de ACC (69). Isso contrasta com a linha celular SW13, mencionada anteriormente, que, embora inicialmente descrita como proveniente de um tumor primário do córtex da suprarrenal, a sua incapacidade para a esteroidogénese tem levantado a questão de estas células serem provenientes não de um tumor primário mas sim de uma metástase na glândula suprarrenal (91).

Iniciou-se este estudo pela avaliação da expressão e localização das proteínas autofágicas, LC3 e p62, por imunofluorescência, na nova linha celular a fim de verificar se seria um bom modelo de estudo. Após confirmação da expressão de LC3 e p62 nas JIL-2266, o efeito do tratamento do mitotano nos níveis de LC3-II e p62 foi analisado. Verificou-se que após o tratamento com 100 μ M de mitotano durante 48 horas, o

fármaco reduziu o número de células relativamente ao veículo. Interessantemente, nesta condição, os níveis de LC3-II (principal marcador associado à síntese de autofagossomas) também aumentaram em relação ao controlo. Após o tratamento das células de ACC com uma dose superior de mitotano (120 μ M), verificou-se um aumento ainda mais acentuado quer na redução da densidade celular, quer no aumento dos níveis de LC3-II. Importa referir que este resultado foi reproduzível nas diferentes réplicas biológicas. Por outro lado, não se observou uma tendência evidente na alteração dos níveis de p62. Tal pode estar relacionado com a ampla gama de funções atribuídas ao p62. Como descrito anteriormente, para além do seu papel na autofagia, o p62 participa na regulação de processos, como a apoptose, ou o estado redox (92). Assim, para monitorizar o fluxo autofágico foi essencial efetuar o ensaio de co-tratamento do mitotano com o inibidor tardio da autofagia, a bafilomicina.

A Bafilomicina bloqueia o passo da formação do autofagolisossoma (93), promovendo assim a acumulação de LC3-II, pois o fluxo autofágico é bloqueado numa fase tardia. Se o tratamento induzir a formação dos autofagossomas, o co-tratamento com bafilomicina vai promover posteriormente a sua acumulação na célula (94).

Interessantemente, o co-tratamento do mitotano com a Bafilomicina nas células de ACC, promoveu um aumento da expressão do LC3-II maior do que o tratamento com o mitotano apenas. Este resultado indica que o mitotano é um indutor da síntese de autofagossomas nas condições testadas (50, 95). Por outro lado, os níveis de p62, mais uma vez não sofreram alterações acentuadas. Os resultados obtidos neste estudo indicam que o tratamento com o mitotano seguramente provoca alterações na autofagia, e sugerem que esta evidência está relacionada com a indução da síntese de autofagossomas. À semelhança de outros modelos tumorais, a indução da síntese de autofagossomas após tratamento com o fármaco pode estar associada à resistência do ACC à terapia com mitotano (96). De facto, como descrito acima, outro estudo reportou uma taxa de apoptose superior numa linha celular proveniente de metástase hepática num doente ACC com síndrome de Lynch no tratamento com mitotano e cloroquina (um inibidor da autofagia) quando comparado com o tratamento apenas com mitotano (65). No presente estudo, utilizando como modelo uma linha celular de ACC proveniente do tumor primário, a evidência da indução da síntese de autofagossomas após tratamento com mitotano fortalece a necessidade de aprofundar o estudo da modulação da autofagia para melhorar a eficácia do tratamento do ACC.

Como Debnath *et al* defenderam recentemente, há duas considerações chave no desenvolvimento de terapias dirigidas: “quando” e “como” dirigir (97). Dada a

importância fundamental da autofagia na homeostasia, o momento da intervenção é particularmente crucial. Estes autores defendem que se deve considerar a inibição da autofagia na terapia anti-tumoral apenas em contextos onde há uma dependência claramente aumentada da autofagia no tumor em comparação com o resto dos tecidos. Os ensaios clínicos sobre a utilização da hidroxicloroquina como agente antitumoral exemplificam a complexidade desta abordagem. Estes estudos apesar de terem apresentado algum sucesso, não foram transformadores e apresentaram muitos desafios relativamente às doses necessárias (98). De facto, no presente estudo, quando efetuámos os ensaios preliminares para a monitorização do fluxo autofágico *in vitro*, verificámos que o co-tratamento do mitotano com uma dose diferente de bafilomicina (resultados não apresentados), não se induzia alterações nos níveis de LC3-II. Esta evidência, juntamente com os resultados da avaliação dos marcadores de diagnóstico e prognóstico, sugere-nos a importância de, no futuro, se avaliar se os ACC são verdadeiramente dependentes da autofagia ou se apenas se caracterizam por acumulação de autofagossomas ou por alterações de LC3-II e p62.

As principais limitações deste estudo incluíram o número reduzido de casos e a falta de informações clínicas em alguns pacientes. Adicionalmente, os estudos *in vitro* foram realizadas apenas numa linha celular de ACC e com um número de réplicas biológicas insuficiente limitando a robustez dos resultados. No futuro, pretendemos validar estes resultados, numa coorte de doentes ACT aumentada, e expandir o estudo do fluxo autofágico noutras linhas celulares. Pretendemos também detalhar o estudo mecanístico da autofagia, quer pela utilização de inibidores do fluxo autofágico iniciais e tardios, quer pela utilização de ensaios adicionais, como o ensaio da monodensilcadaverina e a visualização de autofagossomas e autofagolisossomas, por microscopia eletrónica.

6. Conclusão

Neste estudo verificamos que as proteínas autofágicas ATG5, LC3 e p62 estão presentes na maioria dos ACT benignos e malignos. Os ACC com expressão mais elevada de ATG5, apresentavam um Weiss score maior e presença de invasão capsular, sinusoidal e venosa, indicando que o ATG5 está envolvido na progressão dos ACC. A maioria dos ACC não apresentou marcação nuclear para o p62, ao contrário dos ACA, sugerindo que a ausência dessa marcação pode ser um bom indicador de malignidade nesse tipo de tumor. Nenhuma das proteínas estudadas se correlacionou com a sobrevida dos doentes e por isso, nenhuma parece ter potencial como marcador de prognóstico de ACT. Além disso, os resultados deste estudo indicam que o tratamento com o mitotano modula a autofagia, e sugerem que esta evidência está relacionada com a indução da síntese de autofagossomas.

Referências

1. Silverman ML, Lee AK. Anatomy and pathology of the adrenal glands. *Urol Clin North Am.* 1989;16(3):417-32.
 2. Abou Nader N, Boyer A. Adrenal Cortex Development and Maintenance: Knowledge Acquired From Mouse Models. *Endocrinology.* 2021;162(12).
 3. Pignatti E, Leng S, Carlone DL, Breault DT. Regulation of zonation and homeostasis in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;441:146-55.
 4. Dutt M, Wehrle CJ, Jialal I. Physiology, Adrenal Gland. *StatPearls.* Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Chase Wehrle declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Ishwarlal Jialal declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing
- Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.; 2023.
5. Sherlock M, Scarsbrook A, Abbas A, Fraser S, Limumpornpetch P, Dineen R, et al. Adrenal Incidentaloma. *Endocr Rev.* 2020;41(6):775-820.
 6. Low G, Sahi K. Clinical and imaging overview of functional adrenal neoplasms. *Int J Urol.* 2012;19(8):697-708.
 7. Pingle SR, Jalil F, Millar D, Malchoff CD, Ristau BT. Isolated DHEAS production by an adrenal neoplasm: Clinical, biochemical and pathologic characteristics. *Urol Case Rep.* 2020;31:101148.
 8. Fushimi Y, Tatsumi F, Sanada J, Shimoda M, Kamei S, Nakanishi S, et al. Concurrence of overt Cushing's syndrome and primary aldosteronism accompanied by aldosterone-producing cell cluster in adjacent adrenal cortex: case report. *BMC Endocr Disord.* 2021;21(1):163.
 9. Gupta ADVMS. Hyperaldosteronism. *StatPearls* February 12, 2023.
 10. Savoie PH, Murez T, Neuville P, Van Hove A, Rocher L, Fléchon A, et al. French AFU Cancer Committee Guidelines Update 2022-2024: Adrenal tumor - Assessment of an adrenal incidentaloma and oncological management. *Prog Urol.* 2022;32(15):1040-65.
 11. Assié G, Letouzé E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet.* 2014;46(6):607-12.
 12. Damilano RA, Bergoglio MT. [Adrenocortical carcinoma in women of reproductive age]. *Medicina (B Aires).* 2023;83(2):307-10.
 13. Fassnacht M, Dekkers OM, Else T, Baudin E, Berruti A, de Krijger RR, et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *European Journal of Endocrinology.* 2018;179(4):G1-G46.
 14. Else T, Kim AC, Sabolch A, Raymond VM, Kandathil A, Caoili EM, et al. Adrenocortical carcinoma. *Endocr Rev.* 2014;35(2):282-326.
 15. Sigala S, Bothou C, Penton D, Abate A, Peitzsch M, Cosentini D, et al. A Comprehensive Investigation of Steroidogenic Signaling in Classical and New Experimental Cell Models of Adrenocortical Carcinoma. *Cells.* 2022;11(9).
 16. Nieman LK. Approach to the patient with an adrenal incidentaloma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(9):4106-13.
 17. de Ponthaud C, Roy M, Gaujoux S. Adrenocortical carcinoma: what you at least should know. *British Journal of Surgery.* 2024;111(8).
 18. Mete O, Erickson LA, Juhlin CC, de Krijger RR, Sasano H, Volante M, et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Adrenal Cortical Tumors. *Endocr Pathol.* 2022;33(1):155-96.
 19. Lenders JWM, Kerstens MN, Amar L, Prejbisz A, Robledo M, Taieb D, et al. Genetics, diagnosis, management and future directions of research of pheochromocytoma and paraganglioma: a position statement and consensus of the Working Group on Endocrine Hypertension of the European Society of Hypertension. *J Hypertens.* 2020;38(8):1443-56.

20. Ridho FE, Adam FM, Adam JM. Adrenal incidentaloma. *Acta Med Indones.* 2009;41(2):87-93.
21. Mahmood E, Loughner CL, Anastasopoulou C. Adrenal Adenoma. *StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Chelsea Loughner declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Catherine Anastasopoulou declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing*
- Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.
22. Bernal C, Alcázar JM. Feocromocitoma: presentación clínica. Diagnóstico y tratamiento. *Hipertensión.* 2006;23(6):173-83.
23. Libé R. Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:45.
24. Fassnacht M, Dekkers OM, Else T, Baudin E, Berruti A, de Krijger R, et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(4):G1-g46.
25. Lippert J, Appenzeller S, Liang R, Sbiera S, Kircher S, Altieri B, et al. Targeted Molecular Analysis in Adrenocortical Carcinomas: A Strategy Toward Improved Personalized Prognostication. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(12):4511-23.
26. Ge X, Liu Z, Jiao X, Yin X, Wang X, Li G. Establishment and Validation of a Gene Signature-Based Prognostic Model to Improve Survival Prediction in Adrenocortical Carcinoma Patients. *Int J Endocrinol.* 2021;2021:2077633.
27. Sun-Zhang A, Juhlin CC, Carling T, Scholl U, Schott M, Larsson C, et al. Comprehensive genomic analysis of adrenocortical carcinoma reveals genetic profiles associated with patient survival. *ESMO Open.* 2024;9(7):103617.
28. Vaidya A, Nehs M, Kilbridge K. Treatment of Adrenocortical Carcinoma. *Surg Pathol Clin.* 2019;12(4):997-1006.
29. Fassnacht M, Assie G, Baudin E, Eisenhofer G, de la Fouchardiere C, Haak HR, et al. Adrenocortical carcinomas and malignant pheochromocytomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2020;31(11):1476-90.
30. Puglisi S, Calabrese A, Basile V, Pia A, Reimondo G, Perotti P, et al. New perspectives for mitotane treatment of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2020;34(3):101415.
31. Lo Iacono M, Puglisi S, Perotti P, Saba L, Petiti J, Giachino C, et al. Molecular Mechanisms of Mitotane Action in Adrenocortical Cancer Based on In Vitro Studies. *Cancers (Basel).* 2021;13(21).
32. Corso CR, Acco A, Bach C, Bonatto SJR, de Figueiredo BC, de Souza LM. Pharmacological profile and effects of mitotane in adrenocortical carcinoma. *Br J Clin Pharmacol.* 2021;87(7):2698-710.
33. van Koetsveld PM, Creemers SG, Dogan F, Franssen GJH, de Herder WW, Feelders RA, et al. The Efficacy of Mitotane in Human Primary Adrenocortical Carcinoma Cultures. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(2):407-17.
34. Vikner ME, Krogh J, Daugaard G, Andreassen M. Metabolic and hormonal side effects of mitotane treatment for adrenocortical carcinoma: A retrospective study in 50 Danish patients. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2021;94(2):141-9.
35. Terzolo M, Fassnacht M, Perotti P, Libé R, Kastelan D, Lacroix A, et al. Adjuvant mitotane versus surveillance in low-grade, localised adrenocortical carcinoma (ADIUVO): an international, multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial and observational study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2023;11(10):720-30.
36. Kerkhofs TM, Ettaieb MH, Hermesen IG, Haak HR. Developing treatment for adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2015;22(6):R325-38.

37. Tamburello M, Abate A, Rossini E, Basnet RM, Zizioli D, Cosentini D, et al. Preclinical Evidence of Progesterone as a New Pharmacological Strategy in Human Adrenocortical Carcinoma Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7).
38. Tang Y, Liu Z, Zou Z, Liang J, Lu Y, Zhu Y. Benefits of Adjuvant Mitotane after Resection of Adrenocortical Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9362108.
39. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
40. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46.
41. Beesabathuni NS, Park S, Shah PS. Quantitative and temporal measurement of dynamic autophagy rates. *Autophagy.* 2023;19(4):1164-83.
42. Onorati AV, Dyczynski M, Ojha R, Amaravadi RK. Targeting autophagy in cancer. *Cancer.* 2018;124(16):3307-18.
43. Rakesh R, PriyaDharshini LC, Sakthivel KM, Rasmi RR. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2022;1868(7):166400.
44. Levine B, Kroemer G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell.* 2019;176(1-2):11-42.
45. Yamamoto H, Matsui T. Molecular Mechanisms of Macroautophagy, Microautophagy, and Chaperone-Mediated Autophagy. *J Nippon Med Sch.* 2024;91(1):2-9.
46. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(3):460-73.
47. Fleming A, Bourdenx M, Fujimaki M, Karabiyik C, Krause GJ, Lopez A, et al. The different autophagy degradation pathways and neurodegeneration. *Neuron.* 2022;110(6):935-66.
48. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Research.* 2014;24(1):24-41.
49. Schuck S. Microautophagy - distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *J Cell Sci.* 2020;133(17).
50. Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). *Autophagy.* 2021;17(1):1-382.
51. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(6):365-81.
52. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology.* 2013;15(7):713-20.
53. Yang X, Yu DD, Yan F, Jing YY, Han ZP, Sun K, et al. The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. *Cell Biosci.* 2015;5:14.
54. Bar-Peled L, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol.* 2014;24(7):400-6.
55. Yang Y, Zhu Y, Zhou S, Tang P, Xu R, Zhang Y, et al. TRIM27 cooperates with STK38L to inhibit ULK1-mediated autophagy and promote tumorigenesis. *Embo j.* 2022;41(14):e109777.
56. Paquette M, El-Houjeiri L, L CZ, Puustinen P, Blanchette P, Jeong H, et al. AMPK-dependent phosphorylation is required for transcriptional activation of TFEB and TFE3. *Autophagy.* 2021;17(12):3957-75.
57. Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy.* 2018;14(2):207-15.
58. Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z. The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol.* 2010;20(6):355-62.
59. Alvarez-Meythaler JG, Garcia-Mayea Y, Mir C, Kondoh H, ME LL. Autophagy Takes Center Stage as a Possible Cancer Hallmark. *Front Oncol.* 2020;10:586069.
60. Li M, Gao P, Zhang J. Crosstalk between Autophagy and Apoptosis: Potential and Emerging Therapeutic Targets for Cardiac Diseases. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):332.

61. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer*. 2020;19(1):12.
62. Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*. 2009;452:181-97.
63. Jeong SJ, Zhang X, Rodriguez-Velez A, Evans TD, Razani B. p62/SQSTM1 and Selective Autophagy in Cardiometabolic Diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2019;31(6):458-71.
64. Kim HM, Koo JS. Autophagy-Related Proteins Are Differentially Expressed in Adrenal Cortical Tumor/Pheochromocytoma and Associated with Patient Prognosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19).
65. Tompkins K, Towers C, Kar A, Zhang Y, Kiseljic-Vassiliades K, Thorburn A, et al. SAT-LB064 Mitotane Induces Autophagy: A Mechanism to Promote Chemoresistance in Adrenocortical Carcinoma. *Journal of the Endocrine Society*. 2019;3(Supplement_1).
66. Qin L, Xu T, Xia L, Wang X, Zhang X, Zhang X, et al. Chloroquine enhances the efficacy of cisplatin by suppressing autophagy in human adrenocortical carcinoma treatment. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:1035-45.
67. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(9):579-93.
68. Niklaus M, Adams O, Berezowska S, Zlobec I, Graber F, Slotta-Huspenina J, et al. Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer. *Oncotarget*. 2017;8(33):54604-15.
69. Landwehr LS, Schreiner J, Appenzeller S, Kircher S, Herterich S, Sbiera S, et al. A novel patient-derived cell line of adrenocortical carcinoma shows a pathogenic role of germline MUTYH mutation and high tumour mutational burden. *Eur J Endocrinol*. 2021;184(6):823-35.
70. Haider MS, Ahmad T, Groll J, Scherf-Clavel O, Kroiss M, Luxenhofer R. The Challenging Pharmacokinetics of Mitotane: An Old Drug in Need of New Packaging. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2021;46(5):575-93.
71. Gambella A, Volante M, Papotti M. Histopathologic Features of Adrenal Cortical Carcinoma. *Adv Anat Pathol*. 2023;30(1):34-46.
72. Cavallaro G, Tarallo M, Chiappini A, Crocetti D, Polistena A, Petramala L, et al. Surgical Management of Adrenocortical Carcinoma: Current Highlights. *Biomedicines*. 2021;9(8).
73. Bedrose S, Daher M, Altameemi L, Habra MA. Adjuvant Therapy in Adrenocortical Carcinoma: Reflections and Future Directions. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2).
74. Mizdrak M, Tičinović Kurir T, Božić J. The Role of Biomarkers in Adrenocortical Carcinoma: A Review of Current Evidence and Future Perspectives. *Biomedicines*. 2021;9(2).
75. Yassin R, Tadmor H, Farber E, Igbariye A, Armaly-Nakhoul A, Dahan I, et al. Alteration of autophagy-related protein 5 (ATG5) levels and Atg5 gene expression in diabetes mellitus with and without complications. *Diab Vasc Dis Res*. 2021;18(6):14791641211062050.
76. Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*. 2011;25(8):795-800.
77. Cao QH, Liu F, Yang ZL, Fu XH, Yang ZH, Liu Q, et al. Prognostic value of autophagy related proteins ULK1, Beclin 1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG9, ATG10, ATG12, LC3B and p62/SQSTM1 in gastric cancer. *Am J Transl Res*. 2016;8(9):3831-47.
78. Cho DH, Jo YK, Kim SC, Park IJ, Kim JC. Down-regulated expression of ATG5 in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2012;32(9):4091-6.
79. Filali-Mounecef Y, Hunter C, Roccio F, Zagkou S, Dupont N, Primard C, et al. The ménage à trois of autophagy, lipid droplets and liver disease. *Autophagy*. 2022;18(1):50-72.
80. Danieli A, Martens S. p62-mediated phase separation at the intersection of the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *J Cell Sci*. 2018;131(19).
81. Vavilova JD, Boyko AA, Troyanova NI, Ponomareva NV, Fokin VF, Fedotova EY, et al. Alterations in Proteostasis System Components in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Parkinson Disease: Focusing on the HSP70 and p62 Levels. *Biomolecules*. 2022;12(4).

82. Alcober-Boquet L, Zang T, Pietsch L, Suess E, Hartmann M, Proschak E, et al. The PB1 and the ZZ domain of the autophagy receptor p62/SQSTM1 regulate the interaction of p62/SQSTM1 with the autophagosome protein LC3B. *Protein Sci.* 2024;33(1):e4840.
83. Lee HS, Daniels BH, Salas E, Bollen AW, Debnath J, Margeta M. Clinical utility of LC3 and p62 immunohistochemistry in diagnosis of drug-induced autophagic vacuolar myopathies: a case-control study. *PLoS One.* 2012;7(4):e36221.
84. Hennig P, Fenini G, Di Filippo M, Karakaya T, Beer HD. The Pathways Underlying the Multiple Roles of p62 in Inflammation and Cancer. *Biomedicines.* 2021;9(7).
85. Hewitt G, Carroll B, Sarallah R, Correia-Melo C, Ogrodnik M, Nelson G, et al. SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy.* 2016;12(10):1917-30.
86. Gao F, Li G, Liu C, Gao H, Wang H, Liu W, et al. Autophagy regulates testosterone synthesis by facilitating cholesterol uptake in Leydig cells. *J Cell Biol.* 2018;217(6):2103-19.
87. Park JE, Kim YJ, Kim JM. Is Autophagy a Prerequisite for Steroidogenesis in Leydig Cells? *Dev Reprod.* 2023;27(3):149-57.
88. Seidel E, Walenda G, Messerschmidt C, Obermayer B, Peitzsch M, Wallace P, et al. Generation and characterization of a mitotane-resistant adrenocortical cell line. *Endocr Connect.* 2020;9(2):122-34.
89. Sousa D, Pereira SS, Pignatelli D. Modulation of Autophagy in Adrenal Tumors. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:937367.
90. Huang X, Wu L, Kuang Y, Li X, Deng X, Liang X, et al. Tauroursodeoxycholic acid mediates endoplasmic reticulum stress and autophagy in adrenocortical carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2019;18(6):6475-82.
91. Wang T, Rainey WE. Human adrenocortical carcinoma cell lines. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351(1):58-65.
92. Kuma A, Komatsu M, Mizushima N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy.* 2017;13(10):1619-28.
93. Mauvezin C, Neufeld TP. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy.* 2015;11(8):1437-8.
94. Li LQ, Xie WJ, Pan D, Chen H, Zhang L. Inhibition of autophagy by bafilomycin A1 promotes chemosensitivity of gastric cancer cells. *Tumour Biol.* 2016;37(1):653-9.
95. Streeter A, Menzies FM, Rubinsztein DC. LC3-II Tagging and Western Blotting for Monitoring Autophagic Activity in Mammalian Cells. In: Castrillo JI, Oliver SG, editors. *Systems Biology of Alzheimer's Disease.* New York, NY: Springer New York; 2016. p. 161-70.
96. Mele L, Del Vecchio V, Liccardo D, Prisco C, Schwerdtfeger M, Robinson N, et al. The role of autophagy in resistance to targeted therapies. *Cancer Treat Rev.* 2020;88:102043.
97. Debnath J, Gammoh N, Ryan KM. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023;24(8):560-75.
98. Verbaanderd C, Maes H, Schaaf MB, Sukhatme VP, Pantziarka P, Sukhatme V, et al. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents. *Ecancermedicallscience.* 2017;11:781.

Figuras suplementares

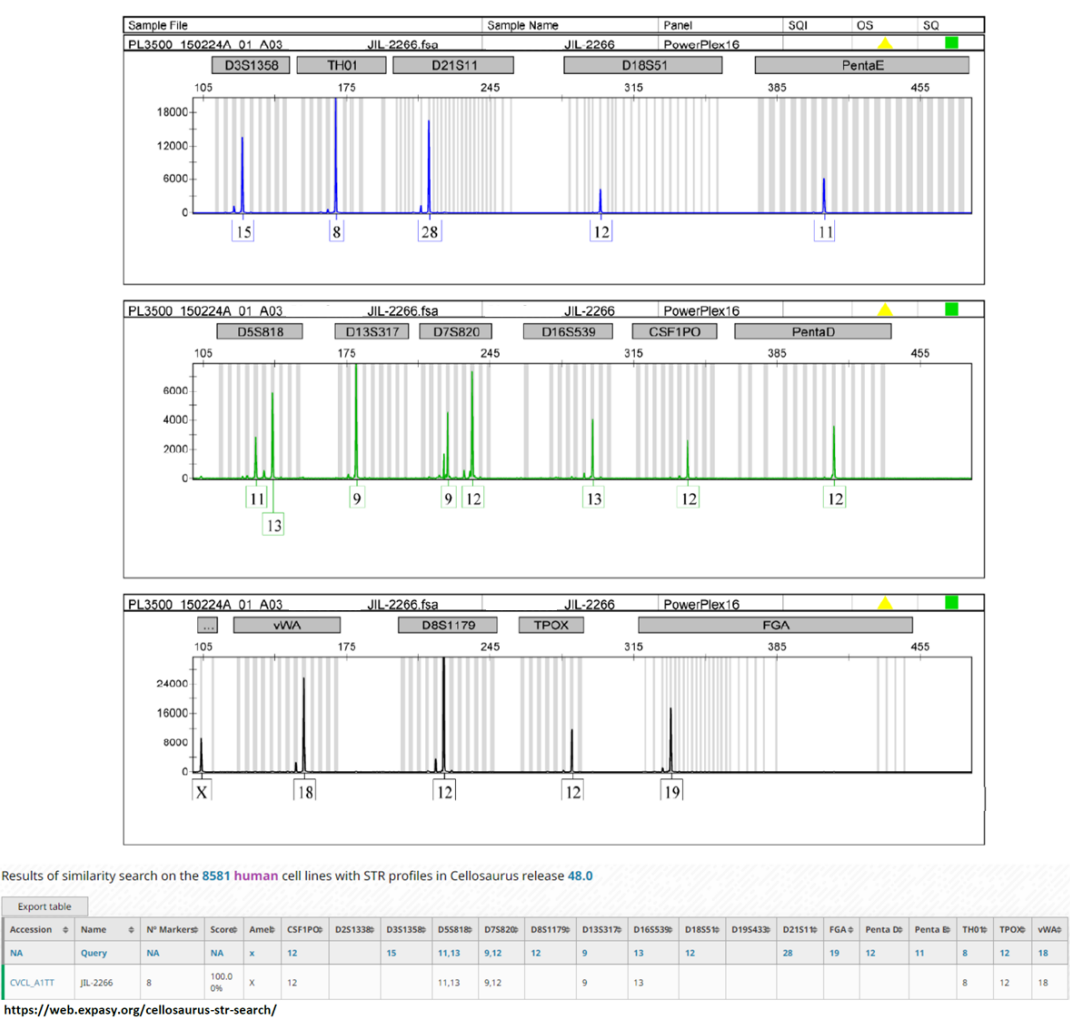


Figura suplementar 1 – Validação da linha celular JIL 2266 por análise de perfil de STRs autossómicos.

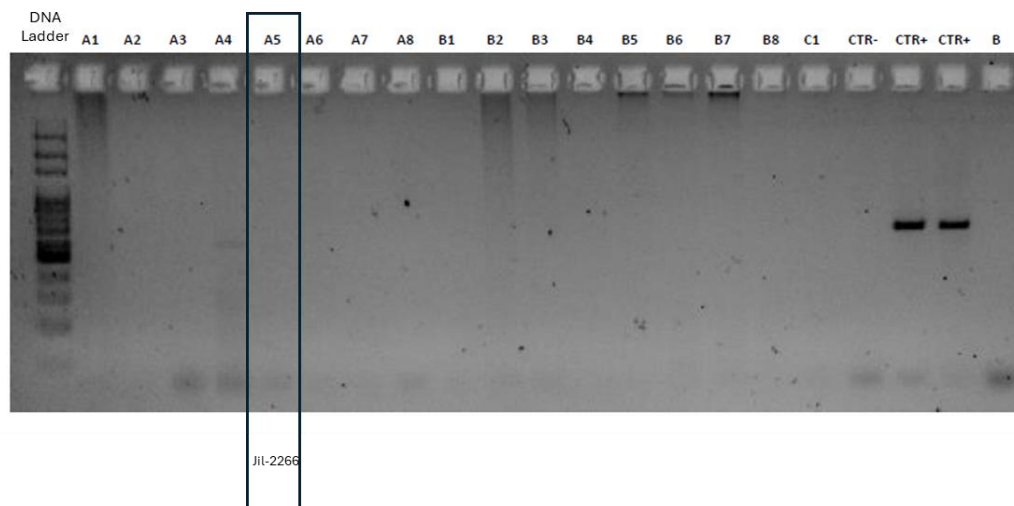


Figura suplementar 2-Gel de agarose da amplificação por PCR (primers MGS01/GP01) do sobrenadante da linha celular JIL2266 para confirmação da ausência de contaminação por mycoplasma.

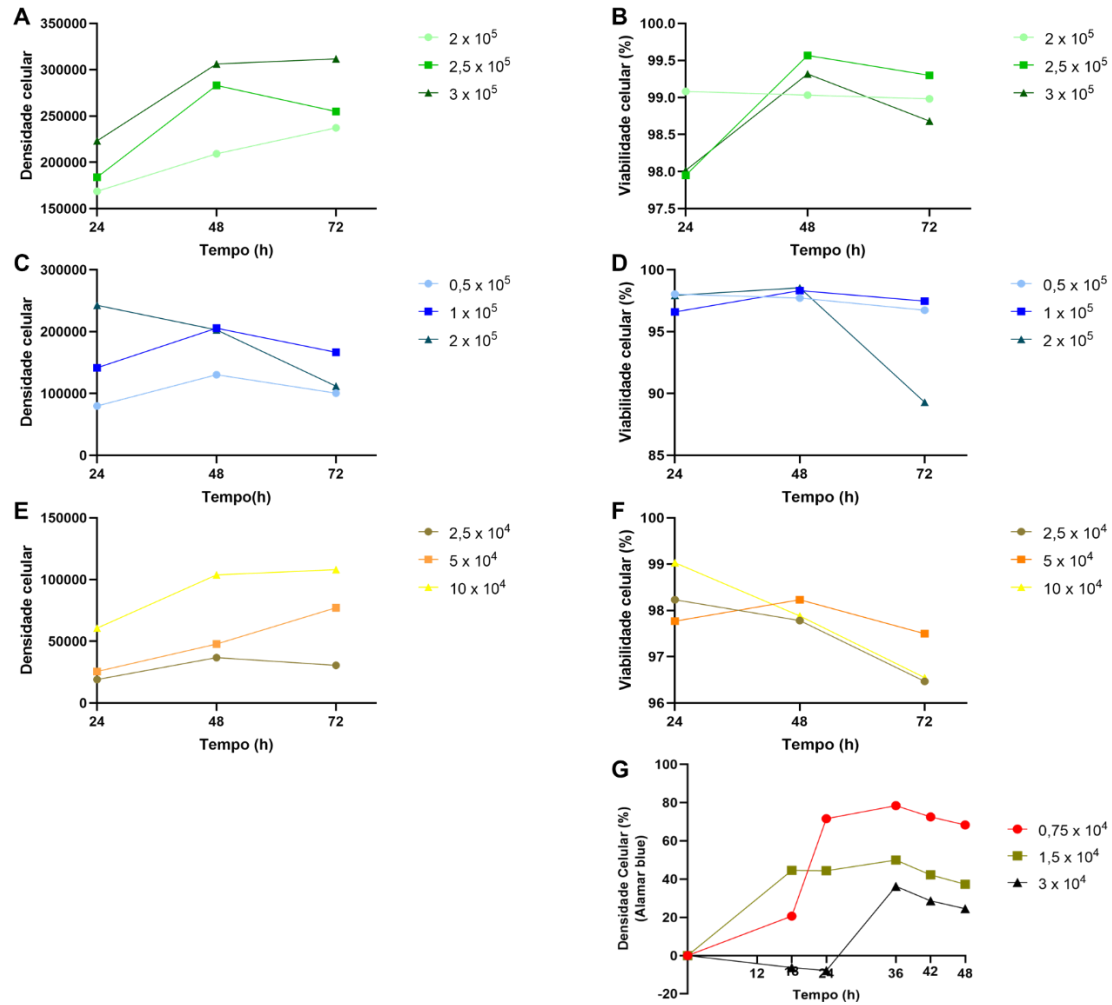


Figura suplementar 3- Gráficos para otimização da densidade celular ideal para a placa de 6, 12 e 24 poços, às 24, 48 e 72 horas. A e B: Densidade celular e viabilidade celular para a placa de 6 poços; C e D: Densidade celular e viabilidade celular para a placa de 12 poços; E e F: Densidade celular e viabilidade celular para a placa de 24 poços; G: viabilidade celular para a placa de 96 poços, utilizando o ensaio do *alamar blue*.