

**Tumores do córtex da supra-renal:
Avaliação do papel dos marcadores imunocitoquímicos
em tumores do córtex da supra-renal**

Sofia Daniela da Silva Pereira

Dissertação do Mestrado em Oncologia

Sofia Daniela da Silva Pereira

Tumores do córtex da supra-renal:

Avaliação do papel dos marcadores imunocitoquímicos em tumores do córtex da supra-renal

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professora Doutora Mariana Monteiro.

Categoria – Professora Associada

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Co-orientador – Professor Doutor Duarte Pignatelli

Categoria – Professor Afiliado

Afiliação – Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Aos meus pais

Agradecimentos

Começo por agradecer à Professora Mariana Monteiro, por me ter dado a oportunidade de trabalhar consigo, pelo seu apoio e disponibilidade. Agradeço também por tudo o que me ensinou e a motivação que sempre me transmitiu. Obrigada Professora.

Ao Professor Duarte Pignatelli por ser meu co-orientador e apesar da sua pouca disponibilidade perdeu muito do seu tempo a ensinar-me sobre a morfometria da supra-renal e em muitas reuniões connosco. Obrigada.

Ao Professor Artur Águas por me ter permitido, a realização deste trabalho no departamento de Anatomia e pelos seus conselhos sempre úteis.

À Madalena, por me ter ensinado muito da técnica de imunohistoquímica, a técnica base do meu trabalho e acima de tudo por me ter ajudado e apoiado em tudo o que precisei.

À Ana porque tudo é mais fácil quando se ouve o teu sorriso no piso -1, quando tu estás no terceiro piso. Obrigada por todo o apoio.

Ao Tiago, que me acompanhou ao longo deste trabalho, que sempre me ajudou em tudo e a sua companhia fez com que os tempos de espera fossem bem mais curtos.

Obrigado a estes 3 “sócios” pela vossa amizade e disponibilidade que sempre demonstraram.

Ao Sr. Duarte pela sua disponibilidade e ajuda que desde o início do meu trabalho teve comigo, e principalmente nesta fase final agradeço pela paciência e pela ajuda na encadernação desta tese.

Aos restantes elementos da Anatomia, com quem sempre foi agradável e um prazer trabalhar: Técnicos, Investigadores e Professores. Obrigada

Agradeço também ao meu namorado que sempre entendeu a minha ausência e apesar de não estar ligado à investigação científica e não entender nada sobre este assunto, sempre me ouviu desabafar por mais aborrecido que fosse o assunto. O meu muito Obrigada pelo apoio e carinho.

E claro que não podia deixar de agradecer aos meus pais que em nenhum momento me deixaram de apoiar, nunca me persuadiram a não continuar a minha vida académica e sempre me incentivaram a fazer o que mais gostava. Agradeço também porque apesar da ausência nunca me julgaram. O meu muito Obrigada e é a vós que devo tudo.

Resumo

Os tumores adrenocorticais malignos são raros mas altamente agressivos, enquanto os tumores benignos são comuns e frequentemente achados incidentais. O diagnóstico destes tumores baseia-se apenas em características histológicas, uma vez que não são conhecidos marcadores moleculares que possam contribuir para o diagnóstico diferencial.

O objetivo do presente estudo foi analisar o perfil molecular de diferentes tumores adrenocorticais com a finalidade de identificar marcadores que pudessem ser úteis no diagnóstico diferencial.

Os tumores adrenocorticais estudados (n=31) foram, adenomas não funcionantes/incidentalomas (n=13), adenomas funcionantes com síndrome de Cushing (n=7) e carcinomas (n=11), supra-renais (n=12) normais foram utilizadas como controle. Em cada amostra foi quantificada a percentagem de área marcada e o *score* de QIC (quantitative immunocytochemical score) por imunohistoquímica para StAR, IGF2, p53, Mdm2, p21, p27, ciclina D1, Ki-67, β -catenina e E-caderina, utilizando uma ferramenta de análise morfométrica computadorizada.

Dos marcadores estudados, o IGF2, o p27, a ciclina D1 e o Ki-67 foram os marcadores cuja percentagem de área marcada e *score* de QIC foi significativamente maior nos carcinomas quando comparados com todos os adenomas. Comparando os carcinomas com os adenomas funcionantes com síndrome de Cushing, foram observadas diferenças significativas na percentagem de área marcada e *score* de QIC para o p27 e Ki-67, cuja marcação foi maior e para a StAR cuja marcação foi menor nos carcinomas. Comparando os carcinomas com os incidentalomas, a marcação para o IGF2, p27, ciclina D1 e Ki-67 foi significativamente maior nos carcinomas. O p27 e o Ki-67 foram os marcadores que demonstraram maior poder discriminativo no diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas, enquanto o IGF2 e a StAR apenas demonstraram ser úteis no diagnóstico diferencial entre carcinomas vs adenomas não funcionantes e carcinomas vs adenomas com Síndrome de Cushing, respetivamente.

O uso dos marcadores imunohistoquímicos StAR, IGF2, p27, ciclina D1 e Ki-67, e o recurso a uma ferramenta de análise morfométrica computadorizada para quantificar a sua expressão, podem ser um importante método auxiliar no diagnóstico diferencial dos tumores adrenocorticais.

Abstract

Malign adrenocortical tumors are rare and highly aggressive, conversely benign tumors are more common and frequently found incidentally. The diagnosis of these tumors is based only on histological characteristics, since there are no known molecular markers that can be used for differential diagnosis.

The aim of the present study was to analyze the molecular profile of different adrenocortical tumors with the purpose of identifying markers that could be useful for the differential diagnosis.

The adrenocortical tumors studied (n=31) were, non-functioning adenomas/incidentalomas (n=13), functioning adenomas with Cushing syndrome (n=7), and carcinomas (n=11); normal adrenal glands (n=12) were used as controls. For each sample, the percentage of the stained area and the QIC score (Quantitative immunocytochemical score) by immunohistochemistry were quantified for StAR, IGF2, p53, Mdm2, p21, p27, cyclin D1, Ki-67, β -catenin and E-cadherin, using a morphometric computerized analysis tool.

Of the studied markers, IGF2, p27, cyclin D1 and Ki-67 were the markers whose percentage of marked area and QIC score was significantly higher on carcinomas when compared with all the adenomas. Comparing the carcinomas with the functioning Cushing syndrome adenomas, we observed significant differences in the percentage of the stained area and QIC score for p27 and Ki-67, which was increased and for StAR that was decreased on carcinomas. Comparing the carcinomas with incidentalomas, the marked area for IGF2, p27, cyclin D1 and Ki-67 was significantly higher on carcinomas. The p27 and the Ki-67 were the markers that showed the highest discriminative power on the differential diagnosis between carcinomas and adenomas, while the IGF2 and StAR only demonstrated to be useful for the differential diagnosis between carcinomas vs non-functioning adenomas and carcinomas vs adenomas with Cushing syndrome, respectively.

The use of the immunohistochemistry markers StAR, IGF2, p27, cyclin D1 and Ki-67, and the employ of a computerized morphometric analysis tool to quantify its expression could be an important auxiliary means on the differential diagnosis of adrenocortical tumors.

Índices

Índice de Conteúdos

Capítulo 1 – Introdução	22
1.1 - Caracterização da glândula adrenal	23
1.2 - Caracterização dos tumores da supra-renal	23
1.3 - Potenciais marcadores tumorais envolvidos na esteroidogénese	25
1.3.1 - Recetor de ACTH	25
1.3.2 – SF1	25
1.3.3 – StAR	26
1.4 - Fatores de crescimento	26
1.4.1 - IGF1 e IGF2	26
1.4.2 - Recetor do IGF1	27
1.5 - Marcadores tumorais envolvidos no ciclo celular	27
1.5.1 - p53	27
1.5.2 – MDM2	28
1.5.3 - p21	28
1.5.4 - p27	29
1.5.5 - Ciclina D1	29
1.6 - Proliferação celular	30
1.6.1 - Ki-67	30
1.7 - Adesão celular	30
1.7.1 - E-caderina	30
1.7.2 - β -catenina	30
Capítulo 2 – Objetivo	32
Capítulo 3 – Material e métodos	34

3.1 – Amostras	35
3.2 - Imunohistoquímica para as proteínas IGF2, StAR e MDM2	35
3.3 - Imunohistoquímica para as proteínas p53, p21, p27, ciclina D1, ki-67, β-catenina e E-caderina	37
3.4 - Avaliação da marcação	38
3.4.1 - Obtenção de imagens	38
3.4.2 - Processamento e análise das imagens obtidas	39
3.4.3 - Análise estatística	39
Capítulo 4- Resultados	40
4.1 - Imunohistoquímica para a StAR	41
4.2 - Imunohistoquímica para o IGF2	47
4.3 - Imunohistoquímica para o p53	53
4.4 - Imunohistoquímica para o MDM2	57
4.5 - Imunohistoquímica para o p21	61
4.6 - Imunohistoquímica para o p27	65
4.7 - Imunohistoquímica para a ciclina D1	71
4.8 - Imunohistoquímica para o Ki-67	76
4.9 - Imunohistoquímica para a E-caderina	82
4.10 - Imunohistoquímica para a β-catenina	83
Capítulo 5 – Discussão geral e conclusões	85
Referências bibliográficas	93

Índice de Figuras

Figura 1 - Fotografias de cortes histológicos de carcinoma adrenocortical (A), adenoma funcionante com Síndrome de Cushing (B), adenoma não funcionante incidentaloma (C) e supra-renal normal (D), utilizando o marcador StAR (400x)	41
Figura 2 - Representação gráfica da curva ROC para o marcador StAR, entre adenomas com síndrome de Cushing e carcinomas e respetiva tabela de resultados	46
Figura 3 - Fotografias de imunohistoquímica realizadas em carcinoma adrenocortical (A), adenomas com síndrome de Cushing (B), adenomas incidentalmomas (C) e supra-renal normal (D) utilizando o marcador IGF2 (400x).....	47
Figura 4 - Representação gráfica da curva ROC para o marcador IGF2, entre adenomas (adenomas- síndrome de Cushing e adenomas – incidentalmomas) e carcinomas e respetiva tabela de resultados	51
Figura 5 - Representação gráfica da curva ROC para o marcador IGF2, entre adenomas incidentalmomas e carcinomas e respetiva tabela de resultados	52
Figura 6 - Fotografias de carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) utilizando o marcador imunohistoquímico p53 (400x)	53
Figura 7 - Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador MDM2 de carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x)	57
Figura 8 - Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador p21 realizadas em carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x)	61
Figura 9 - Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador p27 realizadas em carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x)	65
Figura 10 - Representação gráfica da curva ROC, entre adenomas e carcinomas e respetiva tabela de resultados, para o marcador p27	69
Figura 11 - Representação gráfica da curva ROC para o marcador p27, entre adenomas - incidentalmomas e carcinomas e respetiva tabela de resultados	69

Figura 12 - Representação gráfica da curva ROC para o marcador p27, entre adenomas com síndrome de Cushing e carcinomas e respetiva tabela de resultados.....	70
Figura 13 - Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador ciclina D1 realizadas em carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x).....	71
Figura 14 - Representação gráfica da curva ROC para o marcador ciclina D1, entre adenomas e carcinomas e respetiva tabela de resultados	75
Figura 15 - Representação gráfica da curva ROC para o marcador ciclina D1, entre adenomas incidentalomas e carcinomas e respetiva tabela de resultados	75
Figura 16 - Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador KI-67 de carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x)	76
Figura 17 - Representação gráfica da curva ROC para o marcador KI-67, entre adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) e carcinomas e respetiva tabela de resultados	80
Figura 18 - Representação gráfica da curva ROC para o marcador KI-67, entre adenomas incidentalomas e carcinomas e respetiva tabela de resultados	80
Figura 19 - Representação gráfica da curva ROC para o marcador KI-67, entre adenomas com síndrome de Cushing e carcinomas e respetiva tabela de resultados	81
Figura 20 - Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador E-caderina realizadas em carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x)	82
Figura 21 - Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador β -catenina realizadas em carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x).....	83

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Percentagem de área marcada por imunocitoquímica para a StAR. (ANOVA ** $p < 0.01$ entre carcinomas e supra-renal normal; *** $p < 0.001$ entre adenomas – incidentalomas e supra-renal normal	42
Gráfico 2 - <i>Score</i> de QIC das amostras marcadas por imunocitoquímica para a StAR (ANOVA ** $p < 0.01$ entre carcinomas e supra-renais normais; *** $p < 0.001$ entre adenomas incidentalomas e supra-renais normais)	43
Gráficos 3A - Percentagem de área marcada com StAR nos dois tipos de adenomas. (** $p < 0.01$ entre adenomas com síndrome de Cushing e adenomas incidentalomas)	44
Gráfico 3B - QIC <i>score</i> nos dois tipos de adenomas marcados com StAR (* $p < 0.05$ entre adenomas com síndrome de Cushing e adenomas incidentalomas)	44
Gráfico 4A - Percentagem de área marcada para a StAR em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas	44
Gráfico 4B - QIC <i>score</i> , em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com StAR	44
Gráfico 5A - Percentagem de área marcada para StAR em carcinomas e adenomas incidentalomas	45
Gráfico 5B - <i>Score</i> de QIC em carcinomas e adenomas incidentalomas marcados pela StAR	45
Gráfico 6A - Percentagem de área marcada pela StAR em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing (t-Student * $p < 0.05$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing)	45
Gráfico 6B - <i>Score</i> de QIC em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados pela StAR. (t-Student * $p < 0.05$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing)	45
Gráfico 7 - Percentagem de área marcada com IGF2 nos diferentes grupos (ANOVA ** $p < 0.01$ entre adenomas com síndrome de Cushing e adenomas incidentalomas e entre adenomas com síndrome de Cushing e supra-renais normais; *** $p < 0.001$ entre carcinomas e adenomas incidentalomas e entre carcinomas e supra-renais normais)	48

Gráfico 8 - QIC score nas amostras marcadas com IGF2 (ANOVA ** $p < 0.01$ entre adenomas com síndrome de Cushing e adenomas incidentomas e carcinomas e adenomas incidentomas; *** $p < 0.001$ entre carcinomas e supra-renais normais e entre adenomas com síndrome de Cushing e supra-renais normais)	49
Gráfico 9A - Percentagem de área marcada com IGF2 nos carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentomas) (t-Student ** $p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas)	50
Gráfico 9B - Score de QIC nos carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentomas) marcados com IGF2 (t-Student * $p < 0.05$ entre carcinomas e adenomas)	50
Gráfico 10A - Percentagem de área marcada com IGF2 em carcinomas e adenomas/incidentomas (t-Student; *** $p < 0.001$ entre carcinomas e adenomas incidentomas)	50
Gráfico 10B - Score QIC em carcinomas e adenomas incidentomas marcados com IGF2 (t-Student; *** $p < 0.001$ entre carcinomas e adenomas incidentomas)	50
Gráfico 11A - Percentagem de área marcada com IGF2 em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing	47
Gráfico 11B - Score de QIC em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados com IGF2	51
Gráfico 12 - Percentagem de área marcada com p53 nas amostras dos diferentes grupos	54
Gráfico 13 - QIC score nas amostras marcadas com p53	54
Gráficos 14A - Percentagem de área marcada em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentomas)	55
Gráfico 14B - QIC score em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentomas) marcados com p53	55
Gráfico 15A - Percentagem de área marcada com p53 em carcinomas e adenomas incidentomas	55

Gráfico 15B - Score de QIC em carcinomas e adenomas incidentalomas marcados com p53	55
Gráfico 16A - Percentagem de área marcada com p53 em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing	56
Gráfico 16B - Score de QIC nos carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados com p53	56
Gráfico 17 - Percentagem de área marcada com MDM2 nas diferentes amostras (ANOVA * $p < 0.05$ entre adenomas incidentalomas e supra-renais normais; ** $p < 0.01$ entre carcinomas e supra-renais normais)	58
Gráfico 18 - Score de QIC dos diferentes grupos de amostras marcadas com MDM2 (ANOVA * $p < 0.05$ entre adenomas incidentalomas e supra-renais normais e entre carcinomas e supra-renais normais)	58
Gráfico 19A - Percentagem de área marcada com MDM2, em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas)	59
Gráfico 19B - Score de QIC em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com MDM2	59
Gráfico 20A - Percentagem de área marcada com MDM2 em carcinomas e adenomas incidentalomas	59
Gráfico 20B - Score de QIC em carcinomas e adenomas incidentalomas marcados com MDM2	59
Gráfico 21A - Percentagem de área marcada com MDM2 em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing	60
Gráfico 21B - Score de QIC em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados com MDM2	60
Gráfico 22 - Percentagem de área marcada com p21 nas amostras dos diferentes grupos em estudo	62
Gráfico 23 - QIC score nas amostras marcadas com p21	62
Gráficos 24A - Percentagem de área marcada com p21 em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas)	63

Gráfico 24B - <i>Score</i> de QIC em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com p21	63
Gráfico 25A - Percentagem de área marcada com p21 em carcinomas e adenomas incidentalomas	66
Gráfico 25B - QIC score em carcinomas e adenomas incidentalomas marcados com p21	63
Gráficos 26A - % de área marcada, nos carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcadas com p21	64
Gráfico 26B - <i>Score</i> de QIC nos carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcadas com p21	64
Gráfico 27 - Percentagem de área marcada com p27, nas amostras dos diferentes grupos em estudo (ANOVA * $p < 0.05$ entre carcinomas e adenomas incidentalomas e entre carcinomas e supra-renais normais ; ** $p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing)	66
Gráfico 28 - <i>Score</i> de QIC nas amostras dos diferentes grupos marcadas com p27 (ANOVA * $p < 0.05$ entre carcinomas e adenomas incidentalomas e carcinomas e supra-renais normais)	66
Gráfico 29A - Percentagem de área marcada com p27 em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas). (t-Student *** $p < 0.001$ entre carcinomas e adenomas)	67
Gráfico 29B - <i>Score</i> de QIC em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com p27 (t-Student ** $p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas)	67
Gráficos 30A - Percentagem de área marcada com p27 em carcinomas e adenomas incidentaloma (t-Student ** $p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas incidentalomas)	68
Gráfico 30B - <i>Score</i> de QIC em carcinomas e adenomas incidentalomas marcados com p27 (t-Student ** $p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas incidentalomas) ..	68
Gráfico 31A - Percentagem de área marcada com p27 em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing (t-Student ** $p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing)	68

Gráfico 31B - Score de QIC em carcinomas e adenomas marcados com p27 (t-Student **p<0.01 entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing)	68
Gráfico 32 - Percentagem de área marcada com ciclina D1, nas amostras dos diferentes grupos	72
Gráfico 33 - Score de QIC nas amostras marcadas com ciclina D1	72
Gráfico 34A - Percentagem de área marcada em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com ciclina D1 (t-Student **p<0.01 entre carcinomas e adenomas)	73
Gráfico 34B - Score de QIC em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com ciclina D1 (t-Student **p<0.01 entre carcinomas e adenomas)	73
Gráfico 35A - Percentagem de área marcada em carcinomas e adenomas incidentalomas marcados com ciclina D1 (t-Student *p<0.05 entre carcinomas e adenomas incidentalomas)	74
Gráfico 35B - Score de QIC em carcinomas e adenomas incidentalomas marcados com ciclina D1 (t-Student **p<0.05 entre carcinomas e adenomas incidentalomas)	74
Gráficos 36A - Percentagem de área marcada, em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados com ciclina D1	74
Gráfico 36 B - Score de QIC em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados com ciclina D1	74
Gráfico 37 - Percentagem de área marcada com KI-67, nas amostras dos diferentes grupos em estudo (ANOVA ***p<0.001 entre carcinomas e adenomas incidentalomas e carcinomas e supra-renais normais).....	77
Gráfico 38 - Score de QIC nas amostras marcadas com KI-67 dos diferentes grupos em estudo (ANOVA **p<0.01; ***P<0.001, entre carcinomas e adenomas incidentalomas e entre carcinomas e supra-renais normais)	77
Gráfico 39A - Percentagem de área marcada com KI-67 em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) (t-Student ***p<0.001 entre carcinomas e adenomas).....	78

Gráfico 39B - <i>Score</i> de QIC em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com KI-67 (t-Student *** $p < 0.001$ entre carcinomas e adenomas).....	78
Gráfico 40A - Percentagem de área marcada com KI-67, em carcinomas e adenomas incidentalomas (t-Student *** $p < 0.001$).....	78
Gráfico 40B - <i>Score</i> de QIC em carcinomas e adenomas incidentalomas marcados com KI-67 (t-Student *** $p < 0.001$)	78
Gráfico 41A - Percentagem de área marcada com KI-67 em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing (t-Student ** $p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing)	79
Gráfico 41B - <i>Score</i> de QIC em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados com KI-67 (t-Student ** $p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing)	79

Índice de tabelas

Tabela 1 - Anticorpos, proveniência e diluição utilizada	36
Tabela 2 – Anticorpos, proveniência e diluição utilizada	38
Tabela 3 - Distribuição das amostras de acordo com a localização da β -catenina.....	84

Lista de abreviaturas

ABC	Complexo avidina-biotina-peroxidase
ACTH	Hormona adrenocorticotropina
BSA	Albumina de soro bovino
CDK	Cinase dependente de ciclina
DAB	Diaminobenzidina
DHEA-S	Dehidroepiandrostenediona sulfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
H DAB	Hematoxilina e diaminobenzidina
IGF	Insulin-like growth factor
IGF1-R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IGF2	Insulin-like growth factor 2
MC2R	Recetor da melanocortina 2
MDM2	Murine doble minute 2
NIH	National Institutes of Health
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	Tampão fosfato salino com Tween 20
QIC	Quantitative immunocytochemical
RGB	Sistema de cores Red Green Blue
ROC	Receiver operating characteristic
SF-1	Steroidogenic factor 1
StAR	Steroidogenic acute regulatory
TCF/Lef	T-cell factor/Lymphoid enhancer factor

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Caracterização da glândula supra-renal

A glândula supra-renal é composta por dois tipos de tecido endócrinos distintos, ambos com potencial para o desenvolvimento de neoplasias. O córtex adrenal tem origem mesodérmica e é caracterizado pela capacidade de processar o colesterol em várias subcategorias de hormonas esteróides; apresenta três camadas denominadas, da superfície para a profundidade, glomerulosa, fasciculada e reticular, responsáveis pela produção predominante de aldosterona, cortisol e androgénios, respetivamente. A medula da supra-renal é composta por células cromafins derivadas do tecido da crista neural e que sintetizam catecolaminas (Gartner and Hiatt 2007).

1.2. Caracterização dos tumores do córtex da supra-renal

Os tumores que derivam do córtex adrenal podem ser incluídos em duas categorias, de acordo com a funcionalidade: tumores funcionantes ou não funcionantes, sendo que os tumores funcionantes secretam hormonas esteróides de um modo autónomo, cujos níveis circulantes inapropriados causam sintomas relacionados com esse excesso hormonal; e de acordo com o comportamento biológico, em benignos ou malignos, denominando-se adenomas ou carcinomas da supra-renal, respetivamente. Os tumores da medula adrenal são denominados feocromocitomas, produzem catecolaminas e seus subprodutos, podendo ser benignos ou mais raramente malignos (Allolio and Fassnacht 2006).

Os tumores funcionantes do córtex da supra-renal podem produzir sintomas variáveis dependendo do tipo de esteróides que secretados. No caso de produzirem aldosterona de modo autónomo, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de síndrome de Conn, cujos principais sintomas e sinais são a hipertensão arterial e a diminuição dos níveis de potássio no sangue (Bornstein, Stratakis et al. 1999; Allolio and Fassnacht 2006). Os tumores que produzem cortisol, são responsáveis pelo desenvolvimento de síndrome de Cushing, cujas principais manifestações são obesidade central, atrofia muscular proximal, estrias vinosas, hipertensão arterial e diabetes mellitus. Os tumores produtores de androgénios da supra-renal, produzem principalmente dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) e androstenediona que posteriormente são convertidos em testosterona, um androgénio mais potente capaz de produzir síndromes virilizantes caracterizados pelo aparecimento de características fenotípicas masculinas no

sexo feminino (Alloio and Fassnacht 2006; DeVita, Lawrence et al. 2008; Lahera Vargas and da Costa 2009). Os carcinomas adrenocorticais caracterizam-se pelo crescimento rápido, capacidade de invasão local ou metastização à distancia e, quando funcionantes, pela capacidade de produzir múltiplas hormonas esteróides simultaneamente, incluindo os seus precursores pelo que podem cursar com sintomas das várias síndromes. Devido à sua capacidade de proliferação caracterizam-se pela curta sobrevida (DeVita, Lawrence et al. 2008).

Os incidentalomas adrenais, são definidos como massas adrenais descobertas incidentalmente durante exames radiológicos realizados por outras razões que não a suspeita de doenças adrenais. A sua prevalência em tomografia computadorizada abdominal e torácica varia entre 2,5 e 4,2%, respetivamente (Davenport, Liew et al. 2011). Este tipo de tumores pode ser não secretor ou produzir hormonas esteróides em baixos níveis e produzir síndromes subclínicos, ou seja, manifestações frustradas das patologias em causa e não valorizadas até à data da sua descoberta.

Apesar dos tumores adrenocorticais incidentais serem relativamente frequentes, a incidência dos tumores adrenais malignos é rara, sendo de apenas de 0,5 a 2 casos por milhão de habitantes por ano (Tissier 2010). O principal pico de incidência ocorre entre os 40 e os 50 anos de idade, sendo a incidência ligeiramente superior no sexo feminino (F:M ratio, 1.2:1.0) (DeVita, Lawrence et al. 2008). A incidência dos feocromocitomas é de aproximadamente 2 a 8 casos por milhão sendo que apenas 10% dos casos são malignos (Kirschner 2006; Harari and Inabnet 2011).

A classificação dos diferentes tipos de tumores baseia-se nas características clínicas e anatomo-patológicas. Os marcadores imunocitoquímicos, são frequentemente utilizados como meios auxiliares para a classificação de tumores, embora nenhum marcador imunocitoquímico possa ser qualificado como “marcador ideal” quando utilizado isoladamente, uma vez que teria de ter simultaneamente elevada especificidade e sensibilidade, forte relação entre os seus valores e o tipo de tumor, ser de fácil determinação e económico. Por esse motivo, recorre-se frequentemente ao uso de vários marcadores associados com a malignidade do tumor, para obter informações sobre o seu potencial comportamento biológico.

No caso dos tumores da supra-renal, a malignidade é primariamente avaliada através de sistemas multi-paramétricos baseados nas características histológicas. O sistema mais usado é o sistema de Weiss cujos critérios utilizados para definir a malignidade são: o desarranjo da arquitetura celular, as mitoses frequentes, o pleomorfismo nuclear, a atipia nuclear, a infiltração da cápsula e a invasão venosa e sinusoidal (Jain, Kapoor et al. 2010; Tissier 2010).

No entanto, em alguns casos as características histológicas podem ser insuficientes para definir a malignidade, sendo necessário recorrer a marcadores tumorais moleculares para classificar o tumor.

1.3. Potenciais marcadores tumorais relacionados com a esteroidogénese

A esteroidogénese é a via bioquímica da produção de hormonas esteroides e ocorre em células esteroidogénicas da glândula adrenal, ovários, testículos, placenta e cérebro. Este tipo de hormonas é essencial para a função reprodutiva normal e para a homeostasia do corpo (Stocco, Wang et al. 2005).

1.3.1. Recetor de ACTH- MC2R

Sob condições fisiológicas, a esteroidogénese nas células adrenocorticais é iniciada pela ligação da hormona adrenocorticotropina (ACTH), secretada pela hipófise anterior, ao seu recetor, que é um recetor membranal pertencente à superfamília de recetores acoplados a proteínas G, o recetor da melanocortina 2 (MC2R) também conhecido como recetor da ACTH (Galac, Kool et al. 2010; Fassnacht, Libe et al. 2011).

Estudos verificaram que nos adenomas produtores de aldosterona e de cortisol havia resposta à ACTH *in vivo* e *in vitro*, sugerindo a expressão de MC2R funcionais nestes adenomas (Beuschlein, Fassnacht et al. 2001). A expressão de MC2R foi avaliada por *Northern Blot* e por hibridização *in situ* tendo sido verificado que esta está aumentada em adenomas produtores de aldosterona e de cortisol, enquanto em adenomas não funcionantes e carcinomas, a expressão estava diminuída ou mesmo ausente (Beuschlein, Fassnacht et al. 2001; Fassnacht, Libe et al. 2011).

1.3.2. Fator esteroidogénico 1SF1

O fator esteroidogénico 1 (SF-1) é um recetor nuclear também conhecido como Ad4BP. É um fator de transcrição expresso primariamente no hipotálamo, hipófise e órgãos esteroidogénicos, tais como, glândulas adrenais, testículos e ovários que regula a expressão de enzimas hidroxilases envolvidas da esteroidogénese (Lala, Rice et al. 1992).

Estudos demonstraram que este pode ser um marcador imunohistoquímico muito sensível e específico na determinação da origem adrenocortical de lesões adrenais, uma vez que num estudo onde avaliaram a expressão deste marcador em tumores esteroidogénicos e não esteroidogénicos, verificaram que apenas 2% dos tumores

adrenocorticais foram negativos para este marcador enquanto todos os tumores não adrenocorticais foram negativos (Sbiera, Schmull et al. 2010).

1.3.3. StAR

A StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) é uma proteína envolvida na regulação da produção de esteróides responsável pelo transporte do colesterol do citoplasma para dentro das mitocôndrias através da membrana da mitocôndria, um passo limitante para a biossíntese de esteróides (Pollack, Furth et al. 1997; Zenkert, Schubert et al. 2000).

Assim, esta proteína poderá ser um dos fatores que influencia a capacidade esteroidogénica das neoplasias adrenocorticais e como tal ter a sua expressão aumentada em tumores funcionantes, sendo esta hipótese apoiada pelos resultados da determinação da presença da StAR por Northern Blot em tecidos adrenocorticais (Liu, Heikkila et al. 1996). No entanto, estes achados não têm sido consensuais (Zenkert, Schubert et al. 2000; Stigliano, Caiola et al. 2002).

Estudos revelam que mutações no gene que codifica a proteína StAR estão associadas com alterações profundas da glândula adrenal, como acontece no caso das hiperplasias adrenais congénitas lipoides (Sahakitrungruang, Soccio et al. 2010).

1.4. Fatores de crescimento - Potenciais marcadores tumorais

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (insulin-like growth factors IGFs) são fatores de crescimento com múltiplas funções endócrinas, autócrinas e parácrinas, com sequências muito similares à insulina. Diversos estudos sugerem que poderão estar envolvidos na transformação e proliferação de células neoplásicas (Gicquel, Boulle et al. 2001; Ewing and Goff 2010).

1.4.1. IGF1 e IGF2

O IGF 1 e o IGF 2 e os seus respetivos recetores foram identificados no córtex adrenal e parecem estar envolvidos no crescimento e diferenciação adrenal (Kamio, Shigematsu et al. 1991; Boulle, Logie et al. 1998). Kamio et al, estudou a expressão do IGF-1, em tumores adrenocorticais, tendo verificado que era significativamente maior em carcinomas do que em adenomas (Kamio, Shigematsu et al. 1991).

Quanto ao IGF-2, a expressão deste fator de crescimento aparece aumentada nos carcinomas, de forma ainda mais significativa e numa percentagem superior a 90% dos

casos, ao contrário do que acontece nos adenomas, sendo que quando utilizado em combinação com o Ki-67, se verificou que a especificidade e a sensibilidade da combinação destes dois marcadores foi superior a 95% no diagnóstico de carcinomas adrenocorticais (Schmitt, Saremaslani et al. 2006; Soon, Gill et al. 2009).

1.4.2. IGF1-R

Ambos os IGF-1 e 2 sinalizam principalmente através da ligação ao recetor do IGF-1 (IGF1-R), que tal como o recetor da insulina, possui atividade de tirosina cinase (Kaneda, Wang et al. 2007; Fassnacht, Libe et al. 2011).

Estudos que avaliaram a expressão do IGF-1R em tecidos adrenocorticais sugerem que uma expressão aumentada deste parece estar associada à malignidade adrenocortical, podendo assim estar relacionada com um pior prognóstico (Kamio, Shigematsu et al. 1991; Boulle, Logie et al. 1998).

1.5. Marcadores tumorais envolvidos no ciclo celular

As células eucarióticas respondem a danos no DNA através da paragem da progressão do ciclo celular na fase G1, S e/ou G2. Isto resulta da ativação de pontos de controlo (*checkpoints*) do ciclo celular que produzem sinais que inibem reguladores do ciclo celular, especialmente, as cinases dependentes de ciclina (CDKs) que dirigem a progressão do ciclo celular (He, Siddik et al. 2005).

Em situações de danos no DNA causadas por diferentes agentes, haveria a ativação de vários *checkpoints* do ciclo celular e inibição da atividade das CDKs (He, Siddik et al. 2005). No entanto, em vários tumores, as CDKs podem não ser inibidas nesta situação, havendo de igual modo a progressão do ciclo celular.

Tal poderia ser devido à regulação diminuída de ciclinas, inibição da formação do complexo entre CDKs e a respetiva ciclina, inibição da fosforilação ativadora das CDKs ou indução de inibidores de CDKs, como é exemplo o p27 e p21, sendo este último induzido pelo p53 (He, Siddik et al. 2005).

1.5.1. p53

A p53 é uma proteína supressora tumoral, que em caso de danos no DNA, é fosforilada e acumula-se no núcleo ativando genes que determinam a paragem do ciclo celular na fase G1 até à reparação do DNA ou à apoptose. Um desses genes é o p21, cuja proteína sintetizada, a p21, inibe a atividade das CDKs impedindo assim que as

células passem para a fase S. Em caso dos danos não serem reparados, a p53 ativa genes envolvidos na apoptose (He, Siddik et al. 2005).

Uma das alterações mais frequentes em tumores é a inativação da proteína p53, nomeadamente através de mutações no respetivo gene, impedindo a sua atividade de supressor tumoral, permitindo que o ciclo celular progrida mesmo que haja danos no DNA. Este gene, quando mutado, possui um tempo de semi-vida elevado ao contrário do tipo selvagem, cujo tempo de semi-vida vai de 5-30 minutos, podendo assim, ser facilmente detetado por imunohistoquímica (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002; Moll and Petrenko 2003; Stojadinovic, Brennan et al. 2003; Fassnacht, Libe et al. 2011).

Estudos encontraram uma expressão aumentada deste gene em carcinomas adrenocorticais em comparação com adenomas, independente da funcionalidade (Reincke, Karl et al. 1994; Bernini, Moretti et al. 2002), no entanto outros não verificaram qualquer diferença entre carcinomas e adenomas e carcinomas e supra-renal normal (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002; Stojadinovic, Brennan et al. 2003).

1.5.2. MDM2

Outro mecanismo de inativação da p53, além das mutações, é através da proteína MDM2 (murine double minute 2) uma vez que esta proteína estimula a sua degradação, bloqueia a sua atividade transcricional e promove a exportação do núcleo (Moll and Petrenko 2003).

A expressão desta proteína parece estar diminuída (50% como valor de corte, *cut-off*) em tumores adrenocorticais quando comparados com tecido normal (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002). Num outro estudo, onde a comparação foi efetuada entre adenomas e carcinomas, apesar da expressão de MDM2 aparecer aumentada num maior número de adenomas do que carcinomas, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Stojadinovic, Brennan et al. 2003).

1.5.3. p21

Na presença de danos no DNA, a proteína p53 ativa a proteína p21, que sendo um inibidor de CDKs, impede a ligação de algumas das ciclinas às respetivas CDKs permitindo assim a paragem do ciclo celular. Esta proteína regula a passagem da fase G1 para a fase S (He, Siddik et al. 2005).

Em tumores humanos, onde a proteína p53 está inativa, a expressão da p21 está diminuída (Abukhdeir and Park 2008).

Em casos onde a expressão da proteína p21 está aumentada, isto pode levar à paragem do ciclo celular em células tumorais em proliferação. Em estudos em tumores da supra-renal, esta apareceu aumentada em carcinomas adrenocorticais quando comparados com o tecido normal (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002). No entanto, quando a expressão desta proteína foi avaliada em adenomas e comparada com carcinomas, apesar da expressão ser maior em carcinomas, esta diferença não foi significativa (Stojadinovic, Brennan et al. 2003).

1.5.4. p27

A proteína p27 é tal como a p21, um inibidor de CDKs, regulador da passagem da fase G1 para a fase S estando o aumento da sua expressão associada à paragem do ciclo celular e apoptose.

Consistente com o papel de supressor tumoral da proteína p27, a perda da expressão desta proteína é frequente em tumores humanos e parece estar associado com um pior prognóstico dos tumores (Alkarain and Slingerland 2004; Serres, Kossatz et al. 2012). No entanto, ao contrário do que acontece com o supressor tumoral p53, a perda de expressão ou funcionalidade da proteína p27 não acontece predominantemente por mutações genéticas mas principalmente por degradação proteolítica ou repressão transcricional (Serres, Kossatz et al. 2012).

Stojadinov *et al* também estudou a expressão desta proteína em tecido adrenocortical normal, adenomas e carcinomas e não encontrou diferenças significativas entre o tecido normal e carcinomas e entre adenomas e carcinomas (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002; Stojadinovic, Brennan et al. 2003).

1.5.5. Ciclina D1

As ciclinas são um grupo de proteínas que se ligam às CDKs formando um complexo que controla o progresso do ciclo celular. Uma dessas proteínas é a ciclina D1 (regula a transição da fase G1 para a S), esta regula o ciclo celular ligando-se à proteína CDK4 e a CDK6, permitindo o seu progresso (Ewen and Lamb 2004).

A expressão desta proteína aparece aumentada em alguns tipos de tumores humanos onde na sua maioria este aumento foi associado à amplificação do gene que codifica esta proteína (Ewen and Lamb 2004).

Assim, a sua expressão poderia estar aumentada em tumores da supra-renal justificando portanto, a maior proliferação celular. No entanto, segundo os estudos de imunohistoquímica efetuados na supra-renal, esta proteína não aparece expressa nem

em tecido normal nem tumoral (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002; Stojadinovic, Brennan et al. 2003).

1.6. Proliferação celular

1.6.1. Ki-67

Um dos marcadores tumorais mais estudados é o marcador da proliferação celular, Ki-67. Esta proteína nuclear encontra-se associada a todas as fases do ciclo celular, exceto à fase G0 (Scholzen and Gerdes 2000).

Em estudos em tecidos adrenocorticais, a expressão desta proteína apresentou-se aumentada em carcinomas quando comparados com adenomas e com tecido normal (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002; Stojadinovic, Brennan et al. 2003; Soon, Gill et al. 2009; Tissier 2010).

1.7. Adesão celular

1.7.1. E-caderina

O controlo da adesão celular é um dos mecanismos cruciais responsáveis pela iniciação e progressão tumoral. A E-caderina é uma importante proteína de adesão celular cálcio dependente, localizada nas regiões de contacto célula-célula, as junções celulares. A supressão da expressão desta proteína provoca uma disfunção na adesão celular e portanto anormal arquitetura celular e perda da integridade dos tecidos, etapas importantes no desenvolvimento e progressão de tumores (Khorram-Manesh, Ahlman et al. 2002; Pecina-Slaus 2003).

No entanto, estudos realizados em tumores adrenocorticais, não encontraram em geral nenhuma alteração na expressão desta proteína (Gupta, Shidham et al. 2001; Khorram-Manesh, Ahlman et al. 2002).

1.7.2. β -catenina

A β -catenina desempenha um papel estrutural nas junções aderentes ligada à E-caderina e além disso é um membro importante na via de sinalização Wnt uma vez que funciona como cofator transcricional quando ligado a fatores de transcrição da família TCF/Lef (T-cell factor/Lymphoid enhancer factor) (Kikuchi 2003; Tissier, Cavard et al. 2005).

Quando a beta-catenina não se encontra ligada à E-caderina, a β -catenina é rapidamente degradada por ubiquitinação e portanto, os níveis desta proteína no citoplasma são baixos (Kikuchi 2003; Tissier, Cavard et al. 2005).

Quando a via de sinalização Wnt está ativa, a beta catenina não é degradada e portanto acumula-se no citoplasma, sendo depois translocada para o núcleo onde se liga aos fatores de transcrição TCF/Lef, induzindo a transcrição de genes importantes para o crescimento, proliferação, diferenciação, apoptose, estabilidade genética, migração e angiogénese (Kikuchi 2003; Tissier, Cavard et al. 2005).

Estudos demonstraram que a via Wnt aparece ativada em mais de um terço dos adenomas adrenocorticais e na maioria dos carcinomas adrenocorticais (Tissier 2010).

Estudos de imunohistoquímica demonstraram que em adenomas a acumulação desta proteína é menos difusa do que em carcinomas, uma vez que nos adenomas, a marcação concentra-se principalmente na membrana (Tissier, Cavard et al. 2005; Tissier 2010; Fassnacht, Libe et al. 2011).

Capítulo 2

Objetivo

Capítulo 2 – Objetivo

Avaliar a importância dos marcadores imunohistoquímicos, relacionados com a esteroidogénese, o ciclo celular, a proliferação celular ou a adesão celular, na classificação e diagnóstico diferencial dos tumores do córtex da supra-renal.

Capítulo 3

Material e Métodos

Capítulo 3 – Material e Métodos

3.1 - Amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram provenientes de carcinomas adrenocorticais (n=11), adenomas não funcionantes/incidentalomas (n=13), adenomas funcionantes com síndrome de Cushing (n=7) e supra-renais normais (n=12). As amostras tumorais e os controlos utilizados foram obtidos a partir dos arquivos pessoais dos orientadores.

As amostras tumorais foram obtidas cirurgicamente durante a remoção dos tumores e as amostras de supra-renal normal foram obtidas aquando de nefrectomias em que a supra-renal foi removida em bloco com o rim e não estava atingida pela doença renal. Os tumores foram classificados de acordo com os critérios de Weiss tendo os tumores benignos um *score* ≤ 2 e os malignos um *score* > 4 . Não utilizamos amostras de tumores com *score*=3 atendendo à dúvida que existe se esse valor já reflete malignidade ou não.

3.2 - Imunohistoquímica para as proteínas IGF2, StAR e MDM2

A presença das proteínas IGF2, StAR e MDM2 foi avaliada, individualmente, através de estudos imunohistoquímicos.

Os controlos positivos utilizados foram o carcinoma da mama para o marcador MDM2; placenta para IGF2 e supra-renal normal para o StAR.

Como controlos negativos, foram utilizados os mesmos tecidos sem a incubação com anticorpo primário, sendo este substituído por BSA 5%.

Foram realizados cortes de 5 μ m para lâminas adesivadas (Histobond). Em seguida, os cortes foram desparafinados em xilol e re-hidratados utilizando álcoois de graduação decrescente (100, 95 e 70%) até à água seguida da realização da recuperação antigénica. Para o marcador StAR, a recuperação antigénica, foi realizada na panela de pressão em solução tampão citrato 0,01M (pH 6,0) com Tween 20 a 0.05%, durante 3 minutos depois de ferver; para o MDM2 no micro-ondas a 900W durante 15 minutos, em solução tampão citrato 0,01M (pH 6,0) com Tween 20 a 0.05%; para o IGF2, no micro-ondas a 900W durante 9 minutos, em solução tampão citrato 0,01M (pH 6,0) com Tween 20 a 0.05%.

Seguidamente e após arrefecimento, os cortes foram lavados, 2 vezes, em PBS (pH 7,4) com Tween 20 a 0.05% (PBS-T), durante 5 minutos. A peroxidase endógena foi neutralizada com peróxido de hidrogénio (Merck), a 3% em metanol, durante 15 minutos e de seguida foram realizadas 3 lavagens com PBS-T.

As lâminas foram montadas no aparelho “Sequenza Immunostaining Center” (Thermo Scientific Shandon) e os cortes foram incubados com soro de porco (Swine Serum, Dako Denmark - diluição 1:5 em BSA 10%), de modo a bloquear marcação inespecífica, durante 30 minutos.

Em seguida foi realizada a incubação com os respectivos anticorpos primários, durante a noite a 4°C, nas seguintes diluições:

Tabela 1- Anticorpos e respetiva marca, referência e diluição utilizada

Anticorpo	Anti-StAR	Anti-IGF2	Anti- MDM2
Marca e referência	Atlas Antibodies ref:HPA023644	Abcam ref:ab9574	Abcam ref:ab15471
Diluição em BSA 5%	1:100	1:100	1:100

Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com PBS-T e os cortes foram incubados com anticorpo secundário (Polyclonal swine anti-rabbit, Dako Denmark - diluição 1:200 em BSA 5%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Findo o tempo de incubação os cortes foram lavados 3 vezes com PBS-T durante 5 minutos e em seguida realizou-se a incubação durante 30 minutos com o complexo ABC (Vector - A e B numa diluição de 1:100 em BSA 5%) à temperatura ambiente, seguida de 3 lavagens de 5 minutos com PBS-T.

A revelação das lâminas foi realizada utilizando o substrato DAB (Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Dako) que foi deixado atuar durante 2 minutos. A revelação foi terminada com água e procedeu-se à contrastação nuclear com Hematoxilina Harris durante 1 minuto e de seguida fez-se uma contrastação regressiva durante 10 minutos em água corrente. As lâminas foram desidratadas numa graduação crescente de álcoois, seguida da montagem em Entellan para observação em microscopia ótica.

3.3 - Imunohistoquímica para as proteínas p53, p21, p27, Ciclina D1, ki-67, β -catenina e E-caderina

A presença das proteínas p53, p21, p27, Ciclina D1, ki-67, β -catenina e E-caderina foi avaliada, individualmente, através do Kit Novolink Polymer Detection System (Leica) para imunohistoquímica.

Os controlos positivos utilizados foram carcinoma do cólon para o p53 e ki-67; amígdala para os marcadores p21 e p27; o carcinoma da mama para os marcadores ciclina D1 e β -catenina; e adenocarcinoma do pulmão para a E-caderina.

Como controlo negativo, foram utilizados os mesmos tecidos sem a incubação com anticorpo primário, sendo este substituído por BSA 5%.

Da mesma forma, foram realizados cortes de 5 μ m para lâminas adesivadas (Histobond). Depois os cortes foram desparafinados em xilol e re-hidratados utilizando álcoois de graduação decrescente (100, 95 e 70%) até à água, seguida da realização da recuperação antigénica.

A recuperação antigénica para os marcadores p53, p27 e E-caderina, foi efetuada na panela de pressão em solução tampão citrato 0,01M (pH 6,0) com 0.05% de Tween 20, durante 5 minutos depois de ferver; para o p21, foi realizada no micro-ondas a 900W durante 15 minutos, em solução tampão citrato 0,01M (pH 6,0) com 0.05% de Tween 20; e para a ciclinaD1, ki-67 e β -catenina, foi executada na panela de pressão em solução tampão citrato 0,01M (pH 6,0) com 0.05% de Tween 20, durante 3 minutos depois de ferver;

Seguidamente e após arrefecimento, os cortes foram lavados, 2 vezes, em PBS (pH 7,4) com Tween a 0.05% (PBS-T), durante 5 minutos.

A peroxidase endógena foi neutralizada com peróxido de hidrogénio (Merck), a 3% em metanol, durante 15 minutos e de seguida foram realizadas 2 lavagens com PBS-T.

As lâminas foram montadas no aparelho “Sequenza Immunostaining Center” (Thermo Scientific Shandon) e os cortes foram incubados com a solução de protein block do Kit Novolink Polymer Detection System (Leica), de modo a bloquear marcação inespecífica, durante 5 minutos e foram realizadas, de seguida 2 lavagens de 5 minutos com PBS-T.

Em seguida foi realizada a incubação com os respetivos anticorpos primários, durante a noite a 4°C, nas seguintes diluições:

Tabela 2- Anticorpos e respetiva marca, referência e diluição utilizada

Anticorpo	Anti-p53	Anti-p21	Anti- p27	Anti- Ciclina D1	Anti-Ki- 67	Anti-β- catenina	Anti- E- Caderina
Marca e referência	Cell Marque ref:453M- 94	Cell Marque ref:421M- 14	Cell Marque ref:427M- 94	Cell Marque ref:275R- 14	Cell Marque ref:275R- 14	Cell Marque ref:424A- 14	Cell Marque ref:246R- 14
Diluição em BSA 5%	1:100	1:50	1:500	1:500	1:100	1:500	1:200

Seguidamente, foram realizadas 2 lavagens de 5 minutos com PBS-T e os cortes foram incubados com a solução Post Primary Block, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Findo o tempo de incubação os cortes foram lavados 2 vezes com PBS-T durante 5 minutos e em seguida realizou-se a incubação com a solução Polimer durante 30 minutos, à temperatura ambiente, seguida de 2 lavagens de 5 minutos com PBS-T.

A revelação das lâminas foi efetuada utilizando o substrato DAB (Diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAKO) e deixou-se atuar durante 2 minutos. A revelação foi terminada com água. Procedeu-se à contrastação nuclear com hematoxilina (Hematoxilina Harris) durante 1 minuto e de seguida fez-se uma contrastação regressiva durante 10 minutos em água corrente. As lâminas foram desidratadas numa graduação crescente de álcoois, seguida da montagem em Entellan para observação em microscopia ótica.

3.4 - Avaliação da marcação

3.4.1 - Obtenção de imagens

Foram realizadas um mínimo de 10 fotografias por cada caso, para cada anticorpo numa ampliação de 400x utilizando a câmara AxioCam MRC Zeiss e o software de aquisição de imagens AxioVs40 v4.8.2.0 Zeiss para Windows. Para cada anticorpo, foi utilizada sempre a mesma ampliação, iluminação e as fotografias foram capturadas sempre pelo mesmo utilizador.

3.4.2 - Processamento e análise das Imagens obtidas

As imagens foram preparadas para análise utilizando um software de processamento de imagens, o ImageJ. Este é um software em formato Java desenvolvido pelo U. S. National Institutes of Health (NIH) e pode ser obtido gratuitamente em <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>.

Inicialmente foi selecionada a marcação de interesse através do módulo de extensão (*pluggin*) – Color Deconvolution. Este *pluggin* decompõe a imagem de acordo com o sistema RGB (Red, Green e Blue). Neste estudo foi usada uma das opções do *pluggin*, a “H DAB” que isola a marcação do DAB, que representa a marcação de interesse – cor castanha. Cada imagem foi convertida a 16 bits (tons de cinzento) e duplicada. Usando apenas uma das imagens a área de interesse foi selecionada através da opção “threshold”, transformando a imagem num sistema binário de preto e branco.

Foi utilizada a opção “Set measurement” e foram selecionados os parâmetros a avaliar (“Area fraction” e “Mean gray value”) e além disso, usou-se o comando “Redirect to”, para selecionar a imagem a tons cinzento onde não foi executado o processo de “threshold”, para que o valor médio dos níveis de cinza seja obtidos na imagem em tons de cinzento e não na imagem a preto e branco. Selecionou-se, por fim, a opção “Analyze Particles” para que a apresentação dos resultados – a percentagem de área marcada na imagem e o valor médio dos níveis de cinza (entre 0 e 255 que correspondem à escala de cinzentos, sendo que 0 corresponde à cor preta e 255 à cor branca). Os resultados obtidos foram usados para avaliar a intensidade da marcação. Este parâmetro foi utilizado para o cálculo do *Quantitative Immunocytochemical Score* (QIC) sendo que este foi calculado com a seguinte fórmula: $QIC\ score = \% \text{área marcada} \times \text{mediana da intensidade da marcação} \times 0.1$.

3.4.3 - Análise estatística

A comparação de dois grupos independentes face a uma variável quantitativa foi realizada através do teste de t-Student. O teste de ANOVA (Análise de variância) a 1 fator foi utilizado na comparação de três ou mais grupos independentes face a uma variável quantitativa, após a verificação das hipóteses de normalidade e de homogeneidade de variâncias. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism (versão 5) para o Windows. A distribuição da marcação da β -catenina foi analisada através do teste Qui-quadrado usando o software SigmaPlot (versão 10) para o Windows.

4

Capítulo

Resultados

Capítulo 4 – Resultados

4.1 – Imunohistoquímica para a proteína StAR

A expressão da proteína StAR foi avaliada, por imunohistoquímica, em todas as amostras e foi calculada a percentagem de área marcada e a intensidade de marcação nessa área utilizando o software ImageJ (Figura 1).

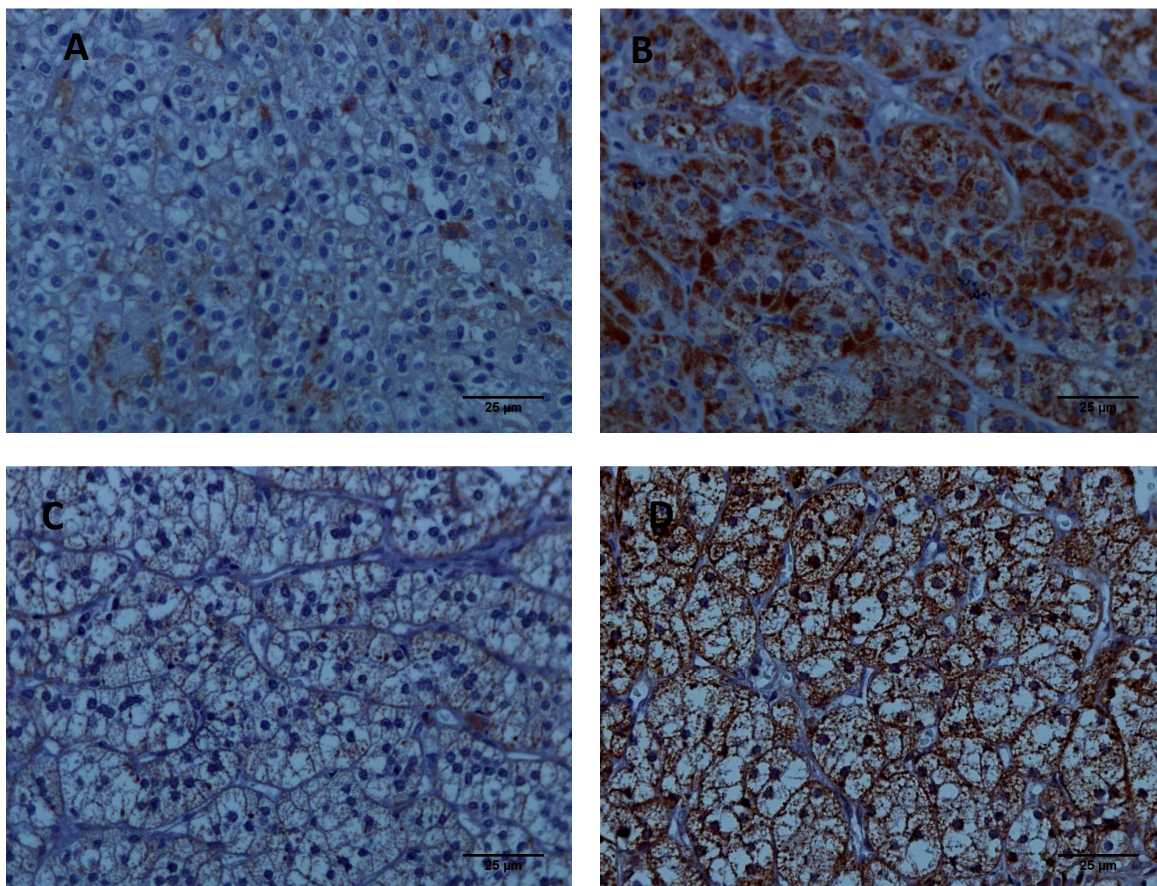


Figura 1 – Fotografias de cortes histológicos de carcinoma adrenocortical (A), adenoma funcional com síndrome de Cushing (B), adenoma não funcional incidentaloma (C) e supra-renal normal (D), corados por imunohistoquímica utilizando o marcador StAR (400x)

Para o marcador StAR, a % de área marcada foi significativamente maior no grupo das supra-renais normais (25.21 ± 3.21 %), quando comparado com os grupos dos carcinomas (7.11 ± 1.90 %) ($p < 0.01$) e adenomas incidentalomas (6.02 ± 1.40 %) ($p < 0.001$) (Gráfico 1). Não se encontraram diferenças significativas entre nenhum dos restantes grupos ($p > 0.05$).

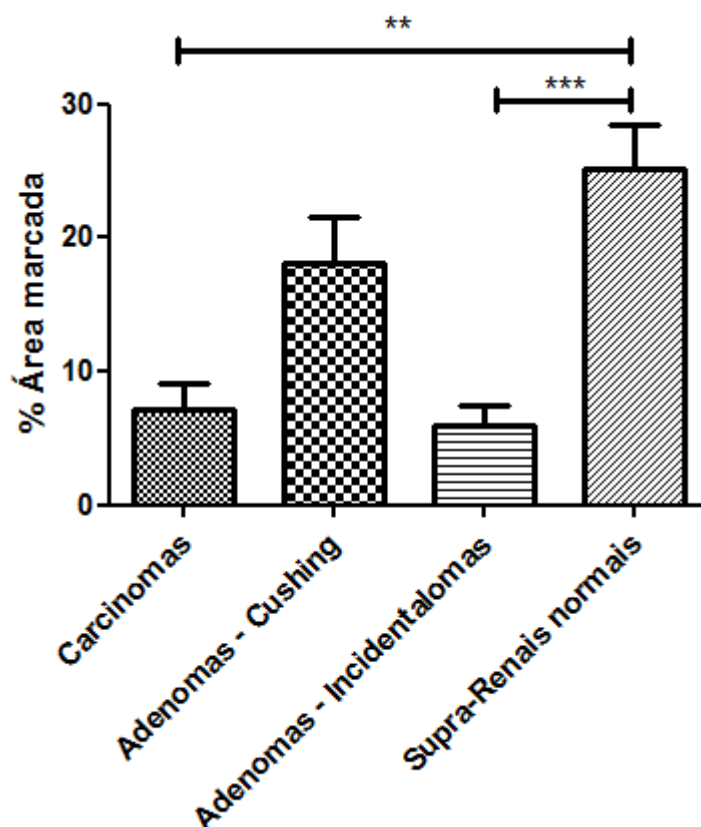


Gráfico 1 – Percentagem de área marcada por imunocitoquímica para a StAR. (ANOVA ** $p < 0.01$ entre carcinomas e supra-renal normal; *** $p < 0.001$ entre adenomas – incidentalomas e supra-renal normal).

Além da % de área marcada, para comparar a marcação nos diferentes grupos, foi também utilizado o score de QIC, que permite relacionar a % de área marcada com a intensidade da marcação, podendo por isso ser mais informativo.

Quando avaliado o score de QIC, observaram-se as mesmas diferenças estatisticamente significativas já observadas para a % de área marcada. Este score foi significativamente maior no grupo das supra-renais normais quando comparado com o grupo dos carcinomas (64.76 ± 2.31 vs 42.36 ± 4.55 , $p < 0.001$) e com o grupo dos adenomas incidentalomas (64.76 ± 2.31 vs 43.09 ± 1.72 , $p < 0.01$). Não se encontraram diferenças significativas de scores de QIC entre os outros grupos ($p > 0.05$).

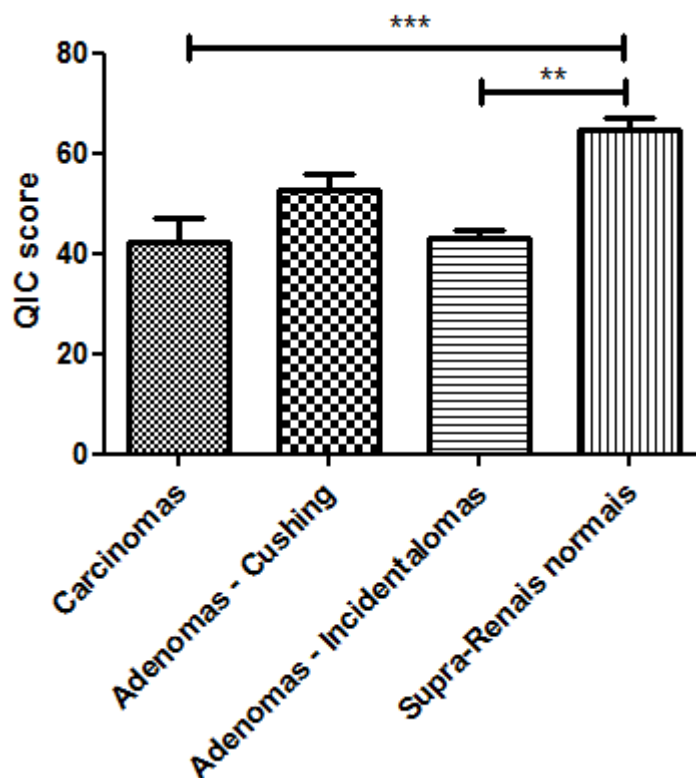
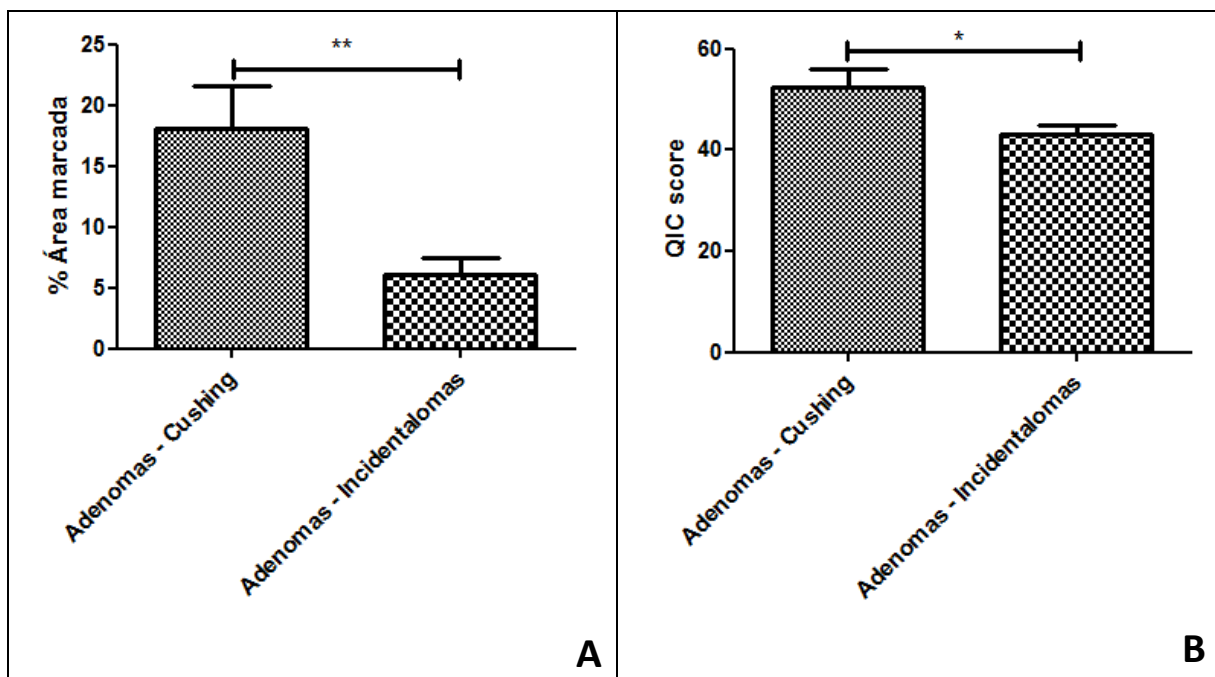


Gráfico 2 - Score de QIC das amostras marcadas por imunocitoquímica para a StAR (ANOVA ** $p < 0.01$ entre carcinomas e supra-renais normais; *** $p < 0.001$ entre adenomas incidentomas e supra-renais normais).

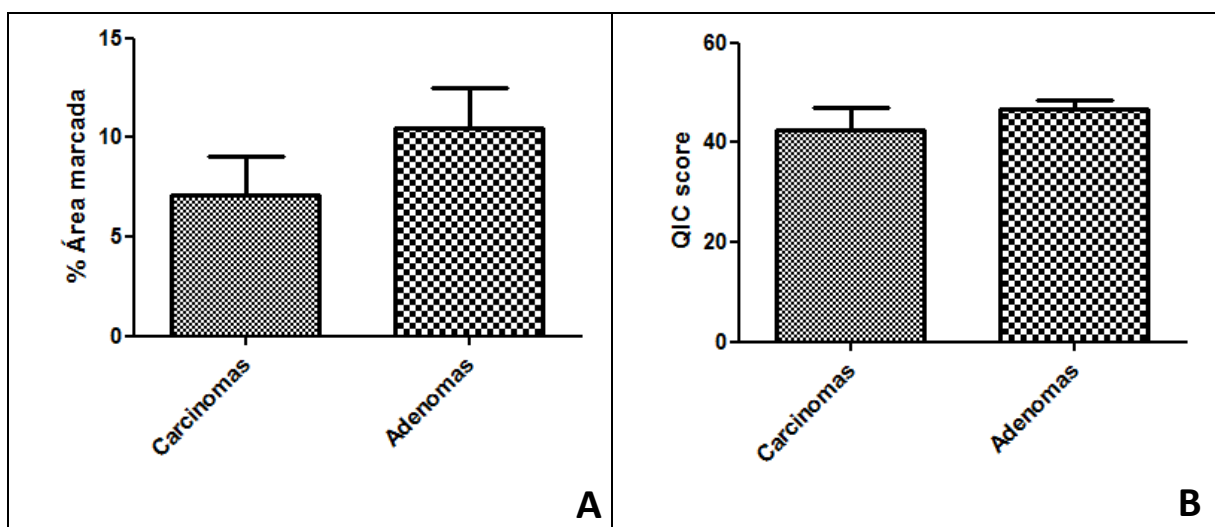
Uma vez que a proteína StAR está associada à produção de esteroides, a marcação para esta proteína foi comparada entre os adenomas produtores de esteroides (síndrome de Cushing) com os não produtores (incidentomas), através do teste de t-Student, e verificamos que a % de área marcada é foi estatisticamente maior nos adenomas com síndrome de Cushing em comparação com os incidentomas ($18.12 \pm 3.48\%$ vs $6.02 \pm 1.40\%$, $p < 0.01$), assim como quanto ao score de QIC, no qual também os adenomas com síndrome de Cushing apresentaram um score significativamente maior do que os adenomas incidentomas (52.51 ± 3.38 vs 43.09 ± 1.72 , $p < 0.05$) (Gráficos 3A e 3B).



Gráficos: 3A – Percentagem de área marcada com StAR nos dois tipos de adenomas. (** $p < 0.01$ entre adenomas com síndrome de Cushing e adenomas Incidentais); **3B** – Score de QIC nos dois tipos de adenomas marcados com StAR (* $p < 0.05$ entre adenomas com síndrome de Cushing e adenomas incidentais).

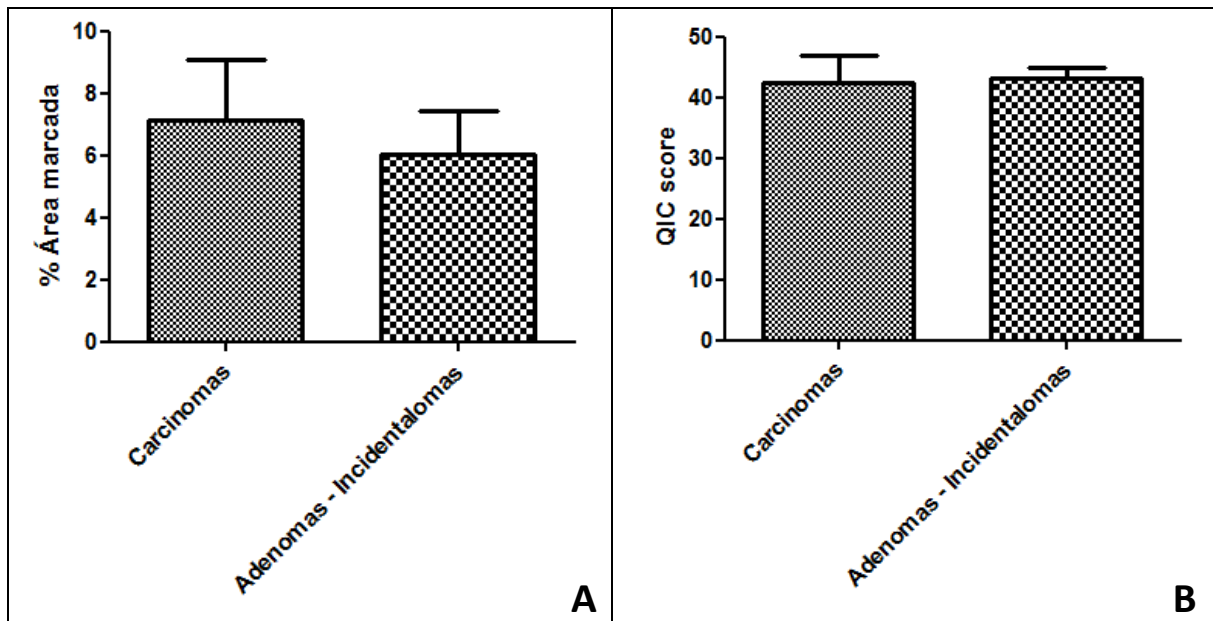
Sendo, o principal objetivo do trabalho o diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas da supra-renal, foi efetuada uma comparação entre estes grupos utilizando o teste de t-Student. Sendo que, o grupo dos adenomas engloba os adenomas funcionantes (síndrome de Cushing) e não funcionantes (incidentais).

Quando comparados quanto à área de marcação e ao score de QIC, não se verificaram diferenças significativas entre carcinomas e adenomas da supra-renal ($p > 0.05$) (Gráfico 4A e 4B).



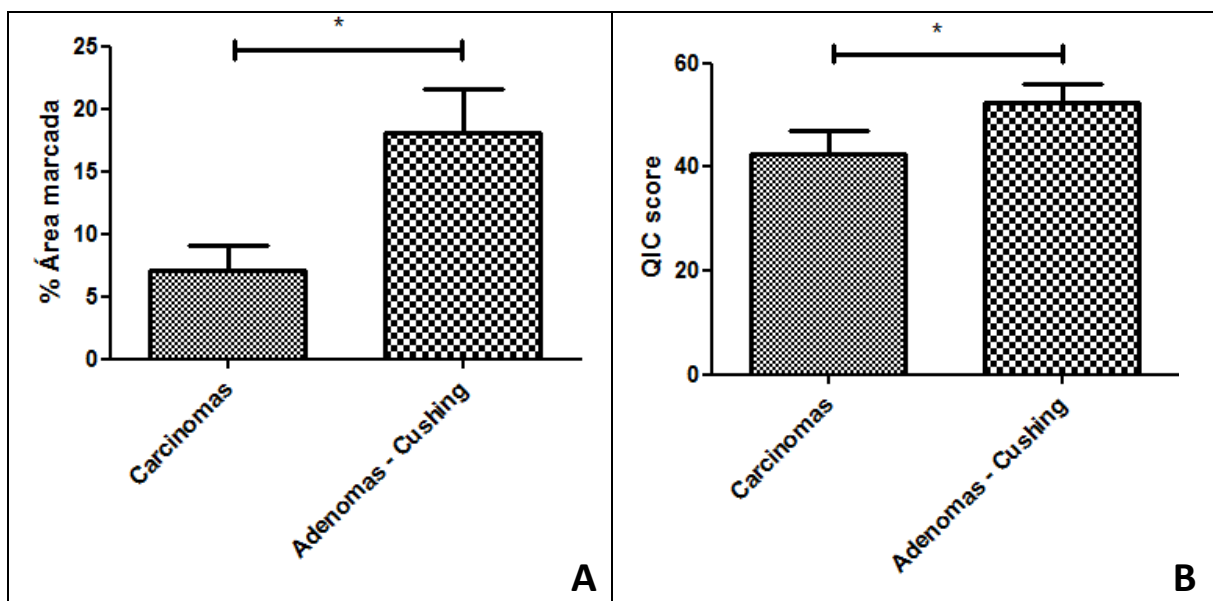
Gráficos: 4A - Percentagem de área marcada para a StAR em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentais). **4B** – QIC score, em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentais) marcados com StAR

Assim como, quando comparados os carcinomas apenas com os adenomas incidentais, não se verificaram diferenças significativas nem quanto à percentagem de área marcada nem quanto ao score de QIC ($p>0.05$) (Gráfico 5A e 5B).



Gráficos: 5A – Percentagem de área marcada para StAR em carcinomas e adenomas incidentais; **5B** – Score de QIC em carcinomas e adenomas incidentais marcados pela StAR.

Comparando carcinomas e adenomas funcionantes com síndrome de Cushing, verificaram-se diferenças significativas na percentagem de área (carcinomas: 7.11 ± 1.95 % vs adenomas – síndrome de Cushing: 10.48 ± 2.03 %, $p<0.05$), e para o score de QIC (carcinomas: 42.36 ± 4.55 ; adenomas com síndrome de Cushing: 52.51 ± 3.38 , $p<0.05$) (Gráfico 6A e 6B).



Gráficos: 6A - Percentagem de área marcada pela StAR em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing (t-Student $*p<0.05$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing); **6B** – Score de QIC em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados pela StAR (t-Student $*p<0.05$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing).

A utilidade do marcador StAR por imunohistoquímica no diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas funcionantes com síndrome de Cushing foi avaliada através de uma curva ROC. Assim, observou-se uma área sob a curva ROC de 0.86 para distinção entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing usando a % de área marcada e de 0.8052 usando o QIC score ($p < 0.05$) (Figura 2).

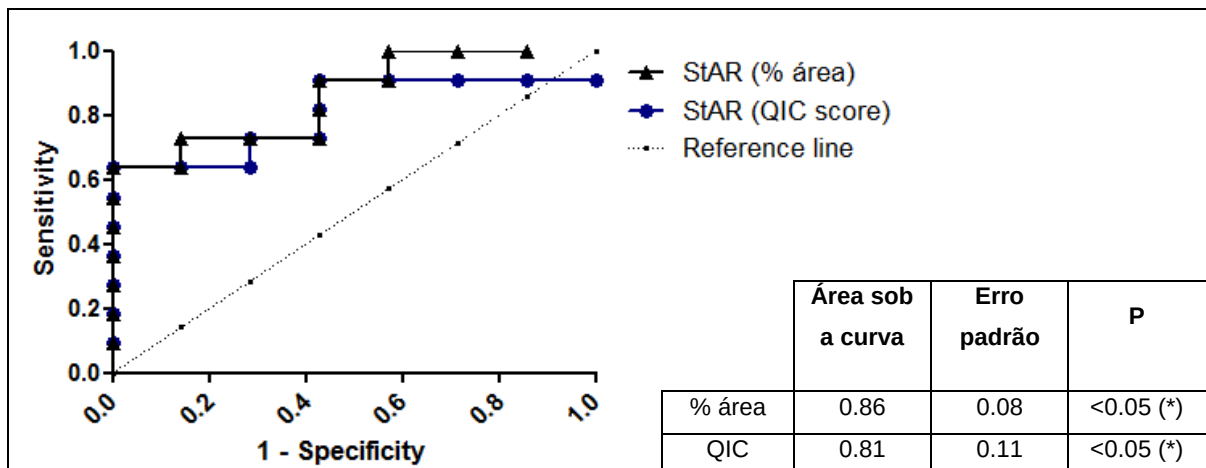


Figura 2 – Representação gráfica da curva ROC para o marcador StAR., entre adenomas com síndrome de Cushing e carcinomas e respectiva tabela de resultados.

4.2 - Imunohistoquímica para o IGF2

A expressão de IGF2 foi avaliada por imunohistoquímica, em todas as amostras e foi avaliada a percentagem de área marcada e a intensidade de marcação nessa área utilizando o software ImageJ.

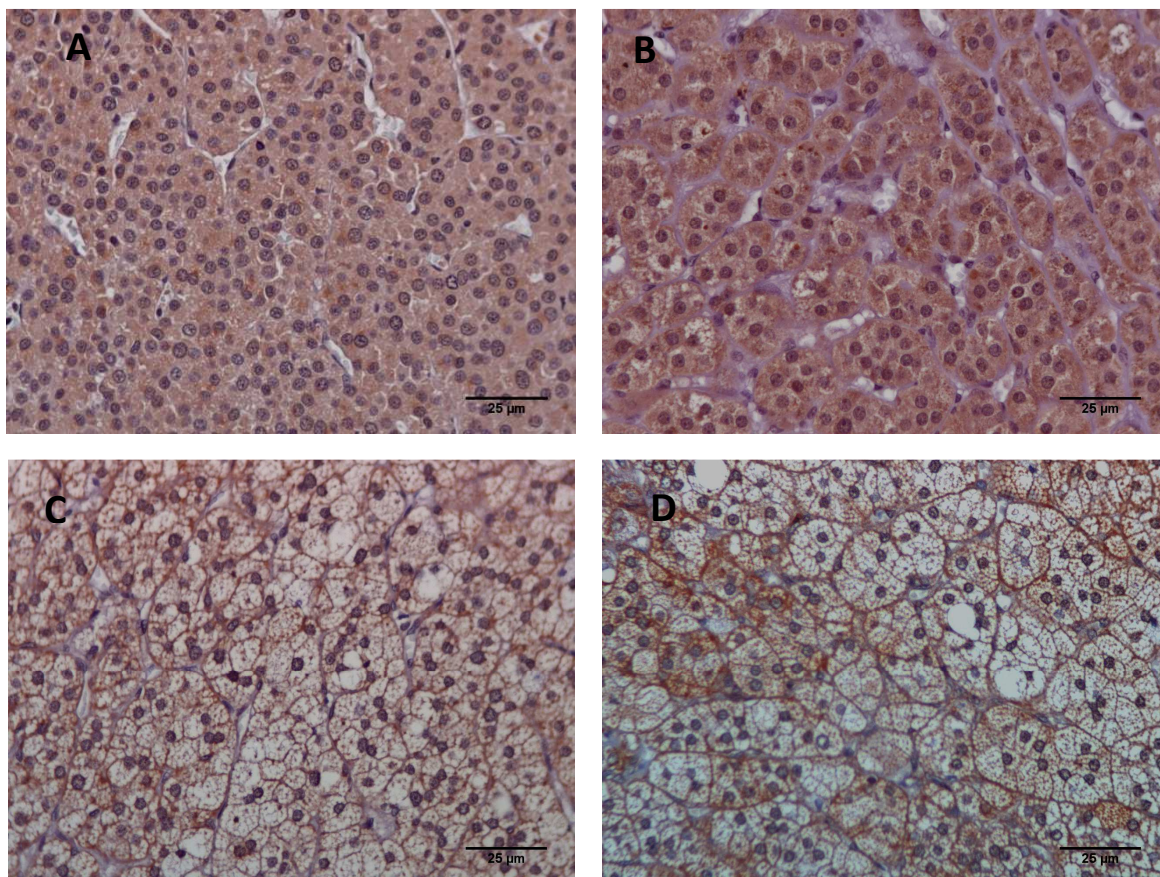


Figura 3 – Fotografias de imunohistoquímica realizadas em carcinoma adrenocortical (A), adenomas com síndrome de Cushing (B), adenomas incidentais (C) e supra-renal normal (D) utilizando o marcador IGF2 (400x)

Para o marcador IGF2, a percentagem de área marcada, nos carcinomas e nos adenomas funcionantes com síndrome de Cushing, foi significativamente maior quando comparada com os restantes grupos (carcinomas (35.31 ± 1.33 %) vs adenomas incidentais (17.67 ± 2.17 %), $p < 0.001$; carcinomas (35.31 ± 1.33 %) vs supra-renais normais (17.54 ± 1.80 %), $p < 0.001$; adenomas com síndrome de Cushing (35.73 ± 1.75 %) vs incidentais (17.67 ± 2.17 %), $p < 0.01$ e adenomas com síndrome de Cushing (35.73 ± 1.76 %) vs supra-renais normais (17.54 ± 1.80 %), $p < 0.01$) (Gráfico 7).

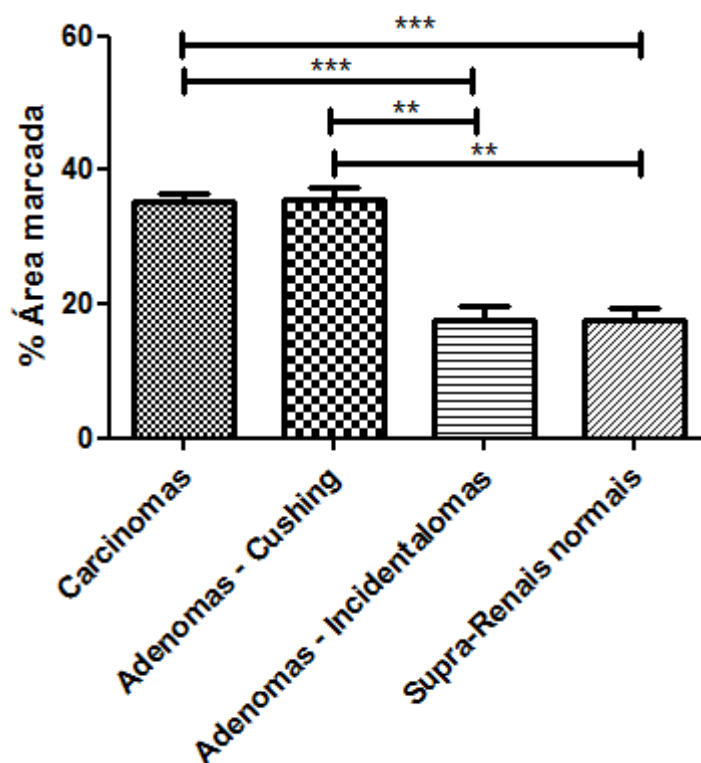


Gráfico 7 – Percentagem de área marcada com IGF2 nos diferentes grupos (ANOVA ** $p < 0.01$ entre adenomas com síndrome de Cushing e adenomas incidentomas e entre adenomas com síndrome de Cushing e supra-renais normais; *** $p < 0.001$ entre carcinomas e adenomas incidentomas e entre carcinomas e supra-renais normais).

O score de QIC foi significativamente maior nos carcinomas (292.82 ± 13.16) e nos adenomas funcionantes com síndrome de Cushing (316.32 ± 18.43), quando comparados com os restantes grupos (carcinomas (292.82 ± 13.16) vs adenomas incidentomas (146.85 ± 18.39), $p < 0.01$; carcinomas (292.82 ± 13.16) vs supra-renais normais (126.47 ± 16.49), $p < 0.001$; adenomas com síndrome de Cushing (316.32 ± 18.43) vs incidentomas (146.9 ± 18.39), $p < 0.01$ e adenomas com síndrome de Cushing (316.32 ± 18.43) vs supra-renais normais (126.47 ± 16.49), $p < 0.001$).

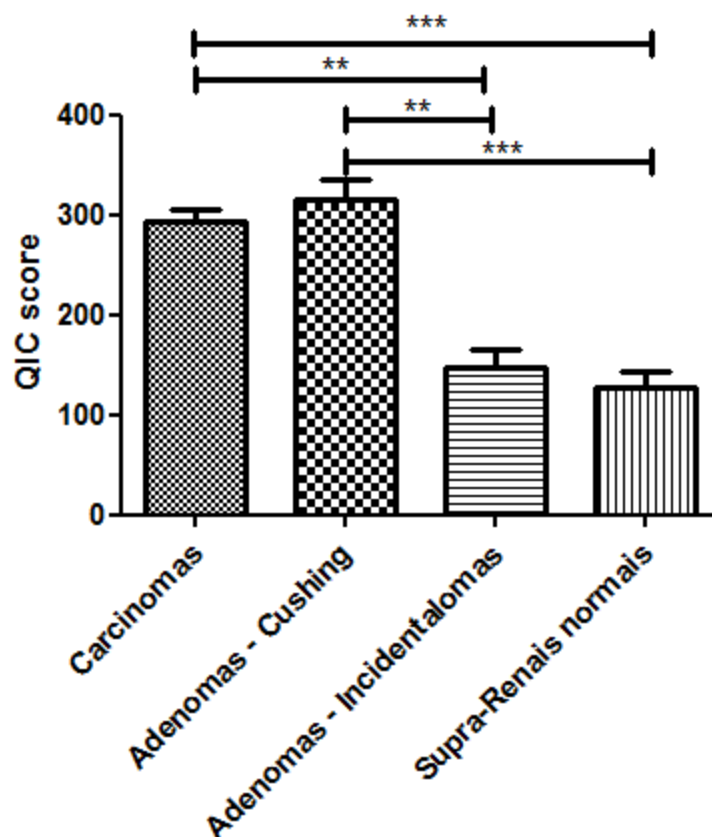
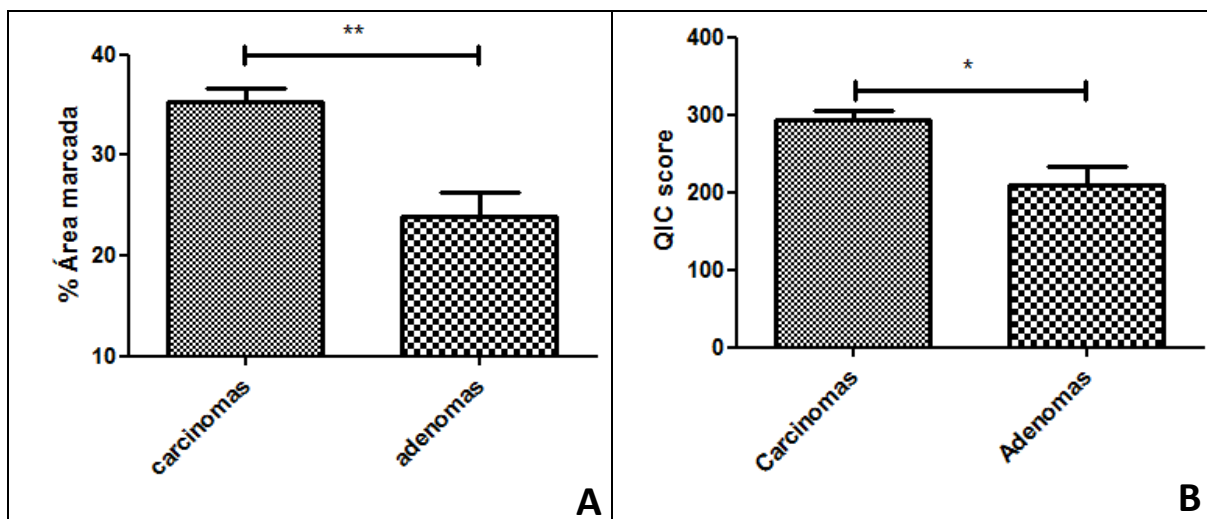


Gráfico 8 – QIC score nas amostras marcadas com IGF2 (ANOVA ** $p < 0.01$ entre adenomas com síndrome de Cushing e adenomas incidentalomas e carcinomas e adenomas incidentalomas; *** $p < 0.001$ entre carcinomas e supra-renais normais e entre adenomas com síndrome de Cushing e supra-renais normais).

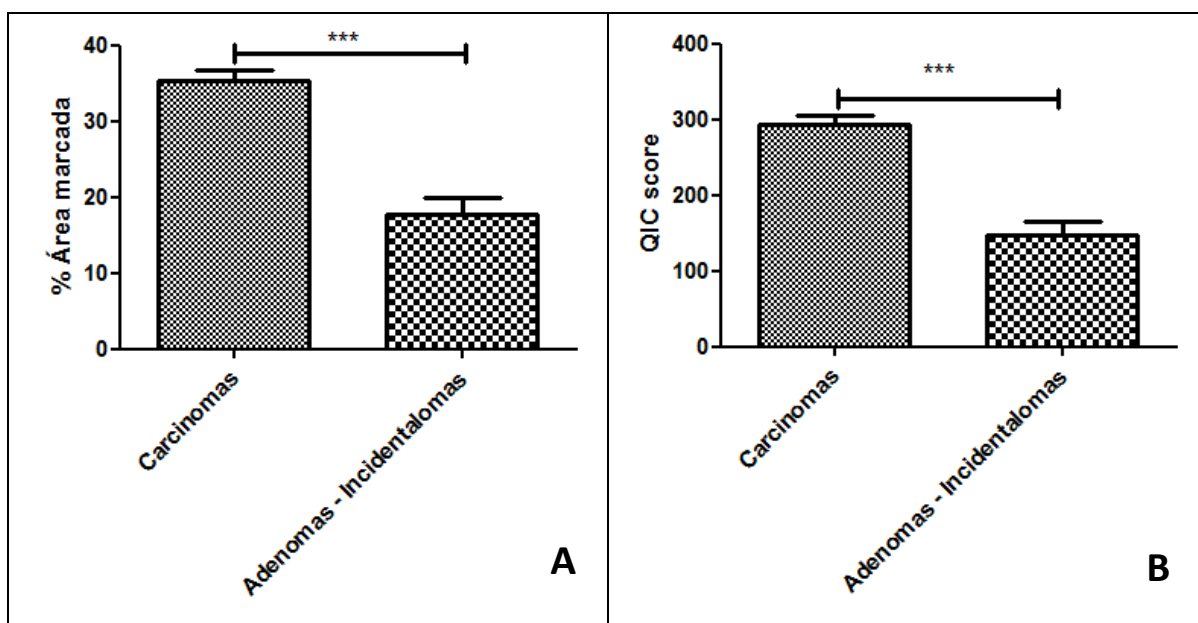
Sendo, o principal objetivo do trabalho o diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas estes grupos foram comparados utilizando o teste de t-Student. O grupo dos adenomas engloba os adenomas funcionantes (síndrome de Cushing) e não funcionantes (incidentalomas).

Quando comparados os carcinomas e os adenomas quanto à percentagem de área marcada verificou-se que esta era significativamente maior nos carcinomas do que nos adenomas ($31.74 \pm 3.419\%$ vs $23.90 \pm 2.441\%$, $p < 0.01$) (Gráfico 9A), assim como o score de QIC também foi significativamente maior nos carcinomas quando comparados com os adenomas (292.82 ± 13.16 vs 209.29 ± 23.31 , $p < 0.05$) (Gráfico 9B).



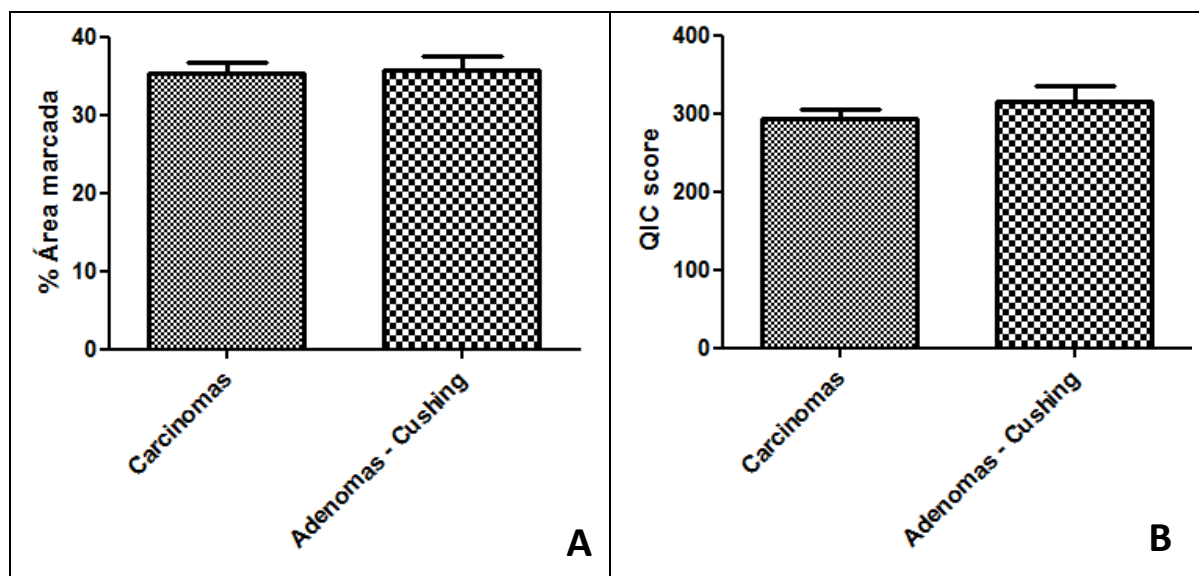
Gráficos: 9A – Percentagem de área marcada com IGF2 nos carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentomas) (t-Student ** $p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas); **9B** – Score de QIC nos carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentomas) marcados com IGF2 (t-Student * $p < 0.05$ entre carcinomas e adenomas).

Comparando apenas os carcinomas e os adenomas não funcionantes /incidentomas, verificou-se que a percentagem de área marcada foi significativamente maior nos carcinomas do que neste tipo de adenomas ($35.31 \pm 1.33\%$ vs $17.67 \pm 2.17\%$, $p < 0.001$) (Gráfico 10A). O mesmo se observou para o score de QIC, uma vez que os carcinomas apresentam um score significativamente maior do que os adenomas – incidentomas (292.82 ± 13.16 vs 146.85 ± 18.39 , $p < 0.001$) (Gráfico 10B).



Gráficos: 10A – Percentagem de área marcada com IGF2 em carcinomas e adenomas/ incidentomas (t-Student; *** $p < 0.001$ entre carcinomas e adenomas incidentomas). **10B** – Score QIC em carcinomas e adenomas incidentomas marcados com IGF2 (t-Student; *** $p < 0.001$ entre carcinomas e ade

Comparando apenas os carcinomas e os adenomas com síndrome de Cushing, não se verificaram diferenças significativas nem quanto à percentagem de área marcada (Gráfico 10A) nem quanto ao *score* de QIC ($p>0.05$) (Gráfico 10B).



Gráficos: 11A – Percentagem de área marcada com em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing. **11B** – *Score* de QIC em carcinomas e adenomas Síndrome de Cushing marcados com IGF2.

A utilidade do marcador IGF2 por imunohistoquímica no diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing, foi avaliada através de uma curva ROC.

Assim, verificou-se uma área sob a curva ROC de 0.74 para distinção de carcinomas e adenomas através da percentagem de área marcada com um $p < 0.05$ (Figura 5), e de 0.75 através do *score* de QIC com um $p < 0.05$ (Figura 4).

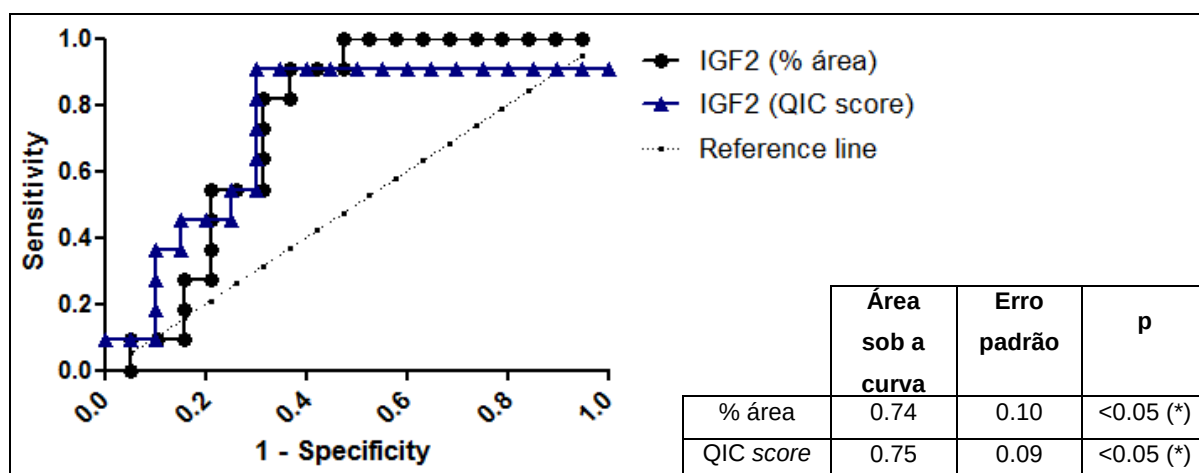


Figura 4 – Representação gráfica da curva ROC para o marcador IGF2, entre adenomas (adenomas-síndrome de Cushing e adenomas – incidentalomas) e carcinomas e respetiva tabela de resultados.

Quando a curva ROC foi realizada para distinguir carcinomas e adenomas incidentalomas, verificamos uma área sob a curva de 1.00 com um $p < 0.001$ quando foi usada a percentagem de área como parâmetro de distinção e de 0.98 quando foi usado o score de QIC ($p < 0.001$) (Figura 5).

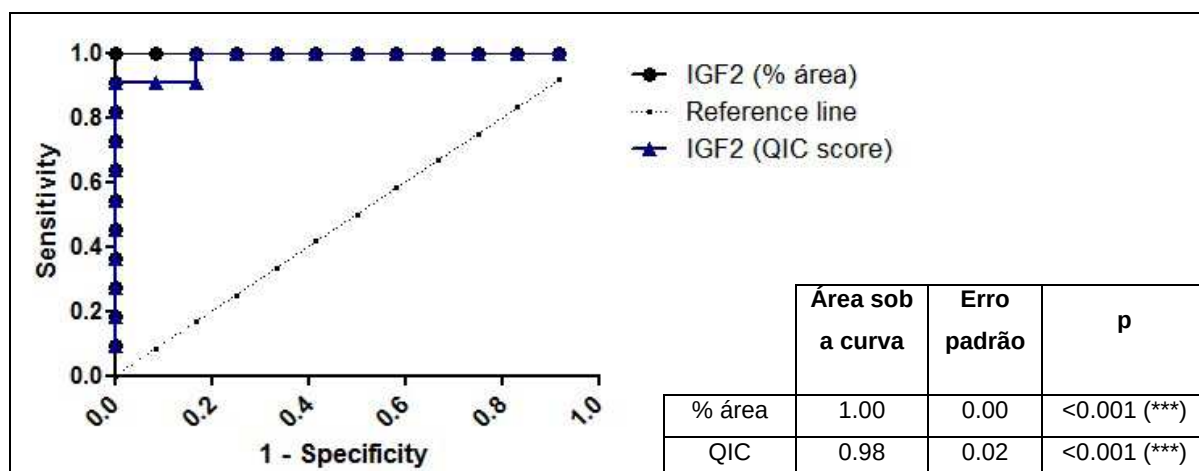


Figura 5 – Representação gráfica da curva ROC para o marcador IGF2, entre adenomas incidentalomas e carcinomas e respetiva tabela de resultados.

4.3 - Imunohistoquímica para o p53

A expressão da proteína p53 foi avaliada por imunohistoquímica, em todas as amostras e foi avaliada a percentagem de área marcada e a intensidade de marcação nessa área utilizando o software ImageJ (Figura 6).

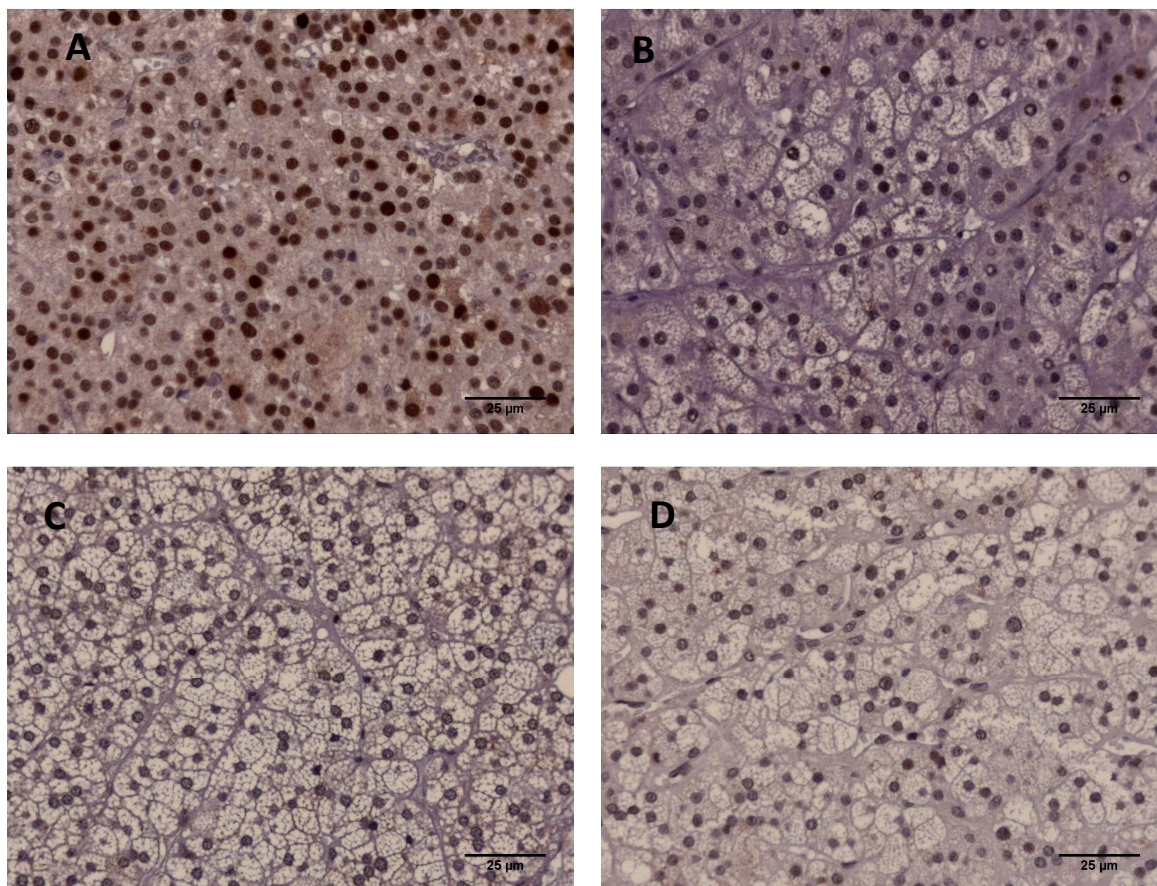


Figura 6 – Fotografias de carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) utilizando o marcador imunohistoquímico p53 (400x).

Para o marcador p53, a percentagem de área marcada não apresentou diferenças significativas entre os diferentes grupos ($p>0.05$). Embora o valor absoluto nos carcinomas seja superior aos restantes grupos, o grau de variação encontrado impediu que fosse atingida a significância estatística (Gráfico 12).

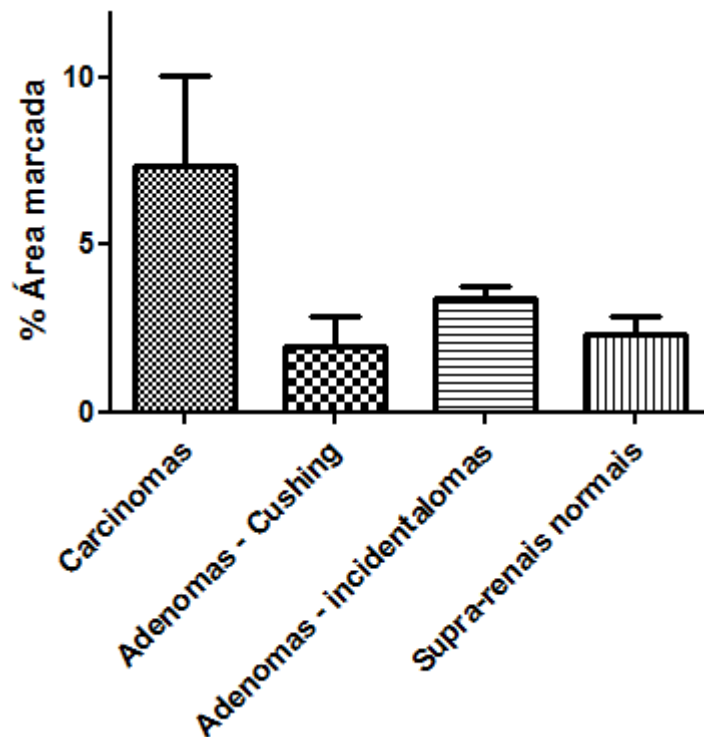


Gráfico 12 – Percentagem de área marcada com p53 nas amostras dos diferentes grupos.

Também não se verificaram diferenças significativas quanto ao score de QIC entre os grupos ($p > 0.05$) (Gráfico 13).

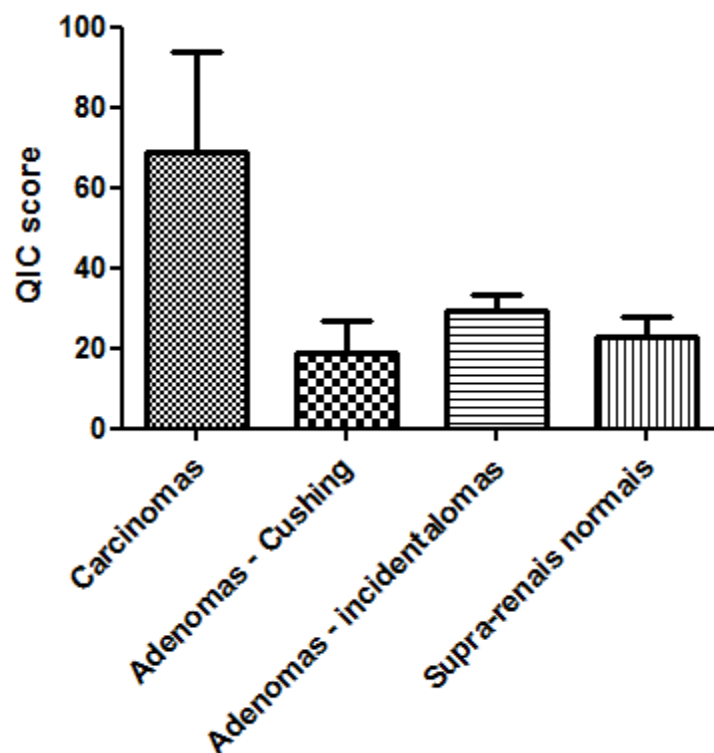
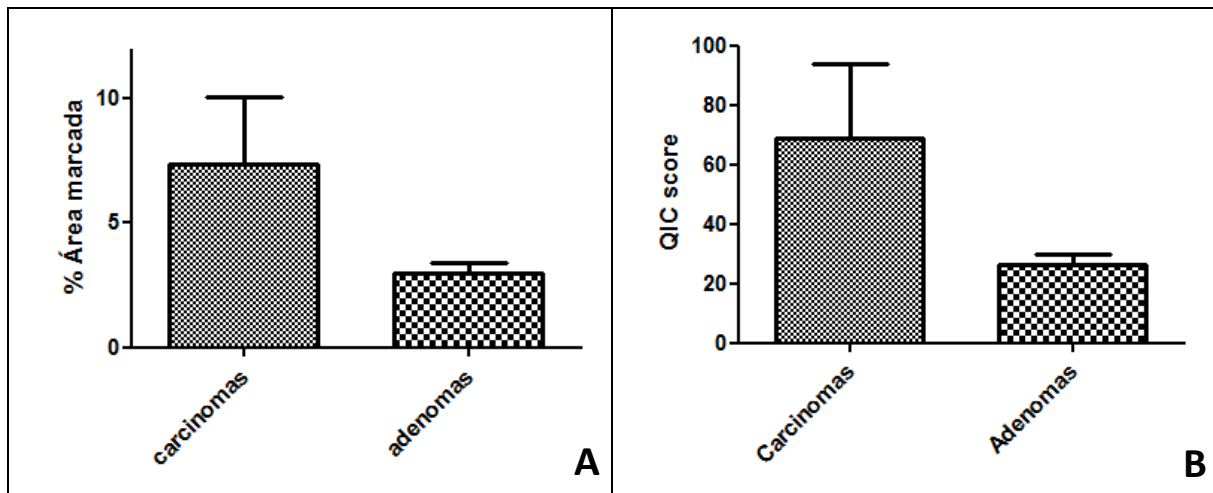


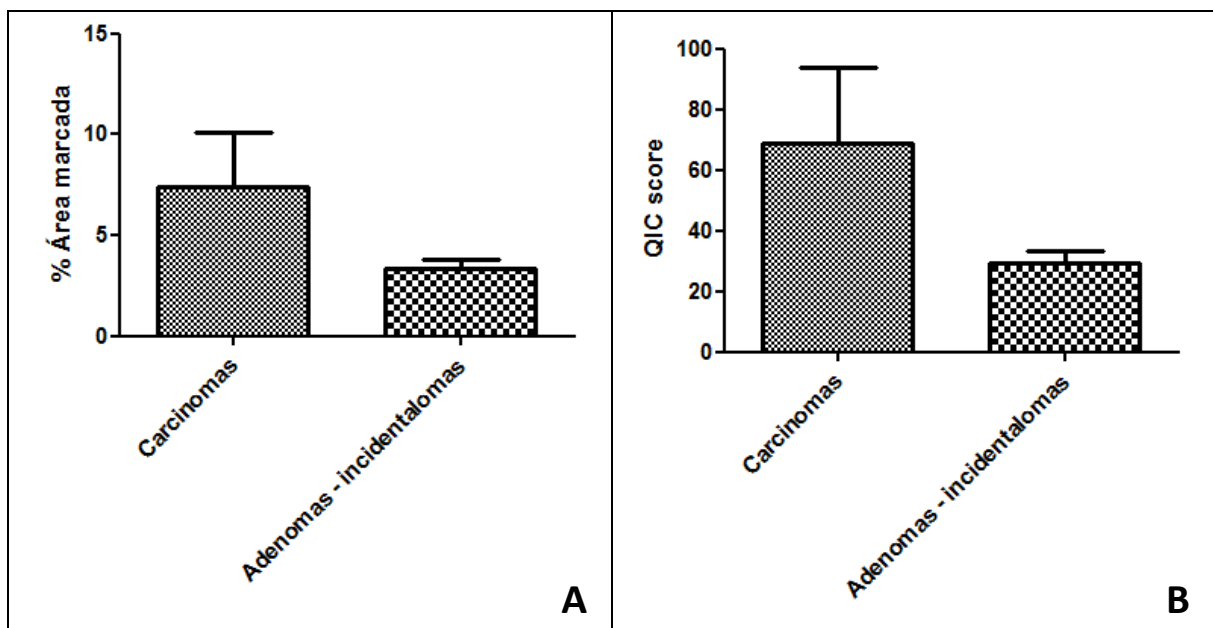
Gráfico 13 – QIC score nas amostras marcadas com p53.

Procedeu-se também à comparação entre a marcação dos carcinomas e adenomas quanto à percentagem de área marcada e ao score de QIC através do teste de t-Student mas igualmente neste caso não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes grupos para nenhum dos parâmetros (Gráfico 14A e 14B).



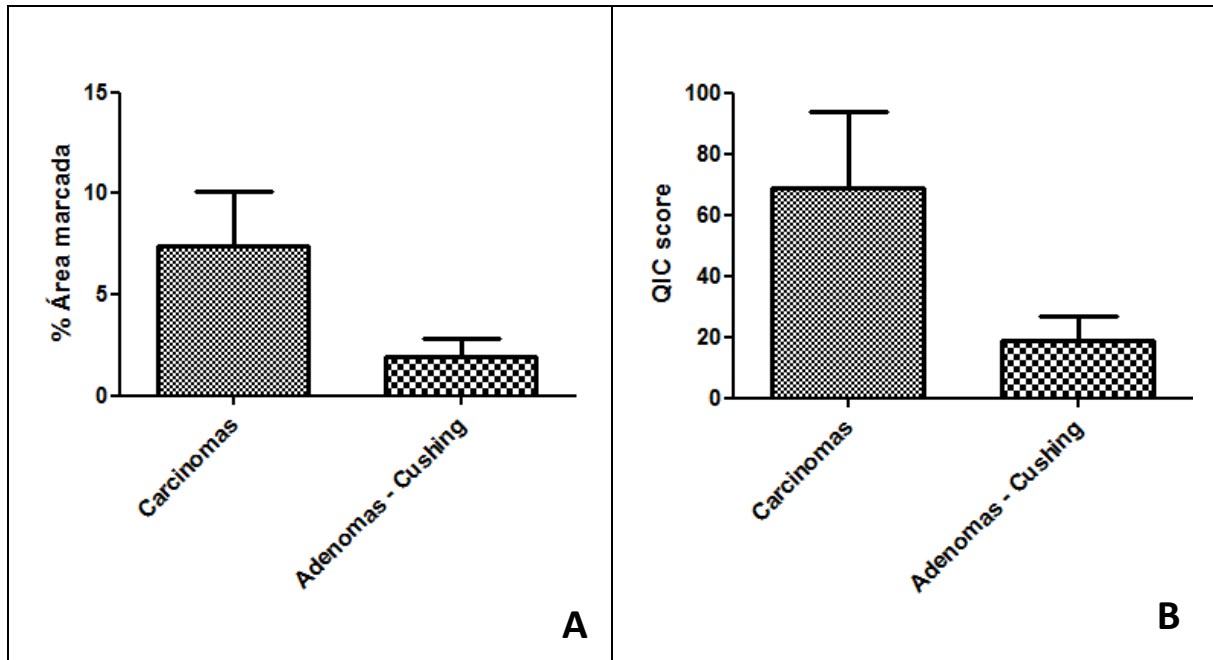
Gráficos: 14A – Percentagem de área marcada em carcinomas e adenomas (Síndrome de Cushing e incidentalomas). **14B** – QIC score em carcinomas e adenomas (Síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com p53

Comparando apenas os carcinomas com os adenomas incidentalomas, também não se verificaram diferenças significativas nem para a percentagem de área marcada nem para o score de QIC (Gráfico 15A e 15B).



Gráficos: 15A – Percentagem de área marcada com p53 em carcinomas e adenomas incidentalomas; **15B** – Score de QIC em carcinomas e adenomas incidentalomas marcados com p53.

E finalmente, comparando apenas os carcinomas com os adenomas funcionantes com síndrome de Cushing, também não se observaram diferenças significativas nem para a percentagem de área nem para o score de QIC ($p>0.05$) (Gráfico 16A e 16B).



Gráficos: 16A – Percentagem de área marcada com p53 em carcinomas e adenomas com Síndrome de Cushing marcadas; **16B** – Score de QIC nos carcinomas e adenomas Síndrome de Cushing marcados com p53.

4.4 - Imunohistoquímica para o MDM2

A expressão da proteína MDM2 foi avaliada por imunohistoquímica, em todas as amostras e foi quantificada a percentagem de área marcada e a intensidade de marcação nessa área utilizando o software ImageJ (Figura 7).

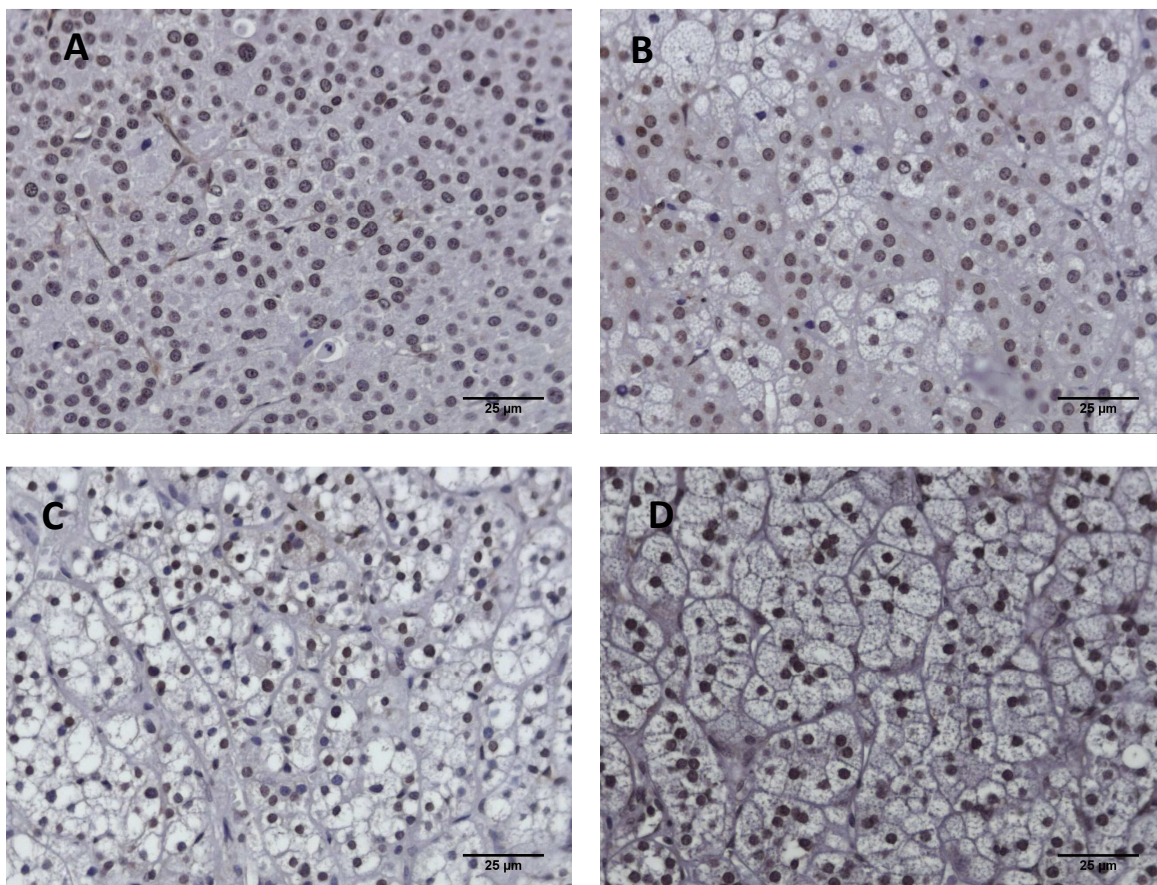


Figura 7 – Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador MDM2 de carcinoma adrenocortical (A), adenoma com Síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x).

Para o marcador MDM2, o grupo das supra-renais normais ($2.60 \pm 0.42 \%$), apresentou uma percentagem de área marcada significativamente maior do que o grupo dos adenomas - incidentalomas ($1.03 \pm 0.40 \%$) ($p < 0.05$) e dos carcinomas ($0.62 \pm 0.25 \%$) ($p < 0.01$) (Gráfico 17).

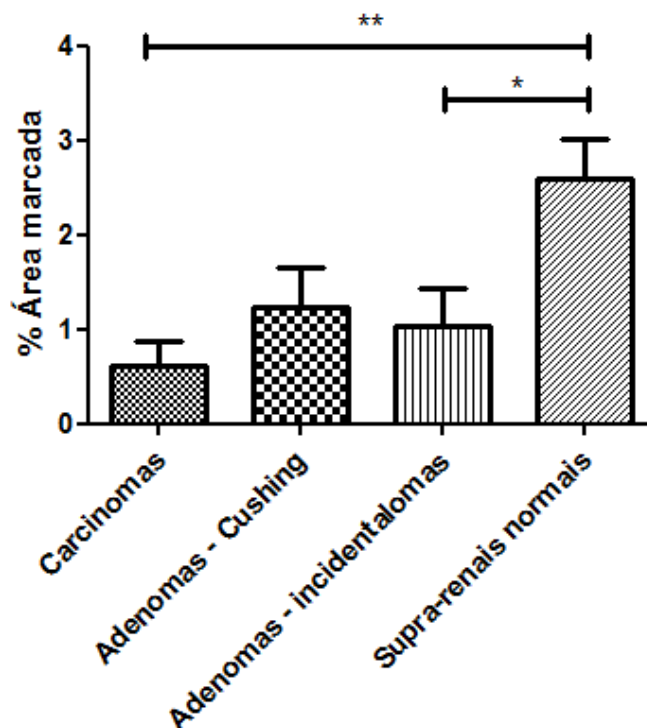


Gráfico 17 - Percentagem de área marcada com MDM2 nas diferentes amostras (ANOVA * $p < 0.05$ entre adenomas incidentais e supra-renais normais; ** $p < 0.01$ entre carcinomas e supra-renais normais).

Também quanto ao score de QIC, o grupo das supra-renais normais (22.11 ± 3.96), apresentou valores significativamente maiores do que os adenomas - incidentais (7.62 ± 2.77) ($p < 0.05$) e os carcinomas (4.92 ± 1.83) ($p < 0.05$) (Gráfico 18).

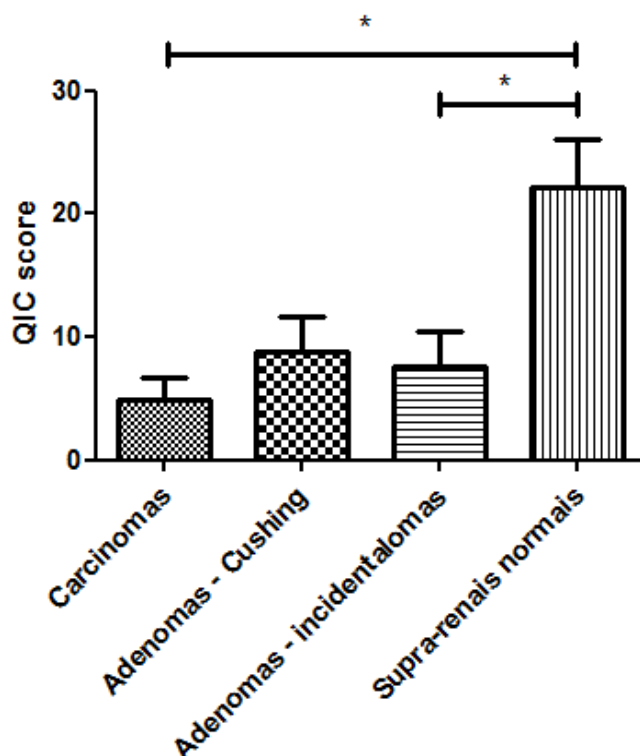
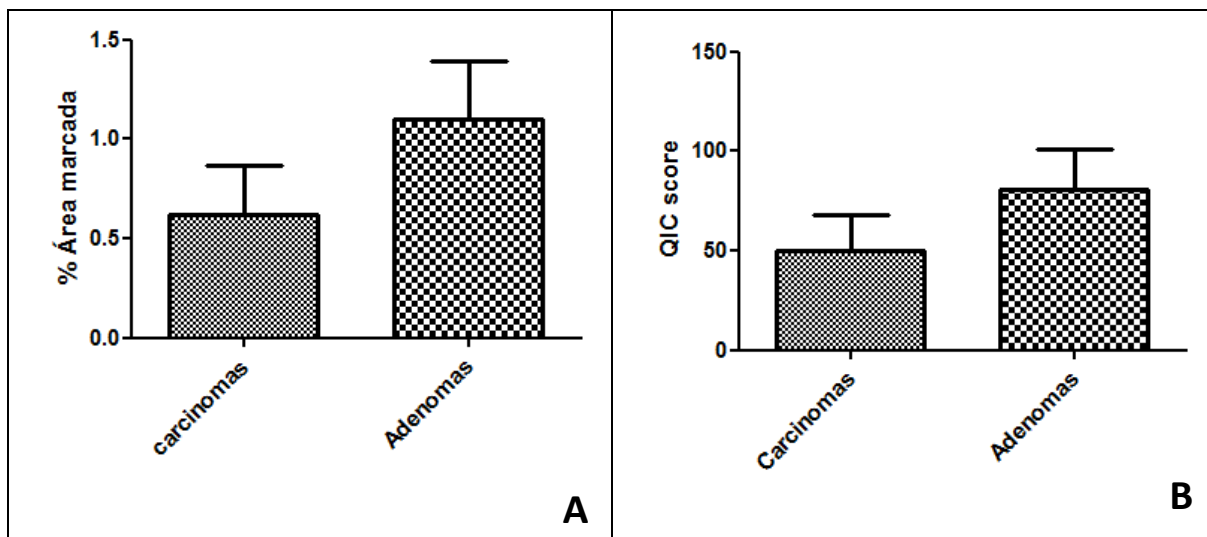


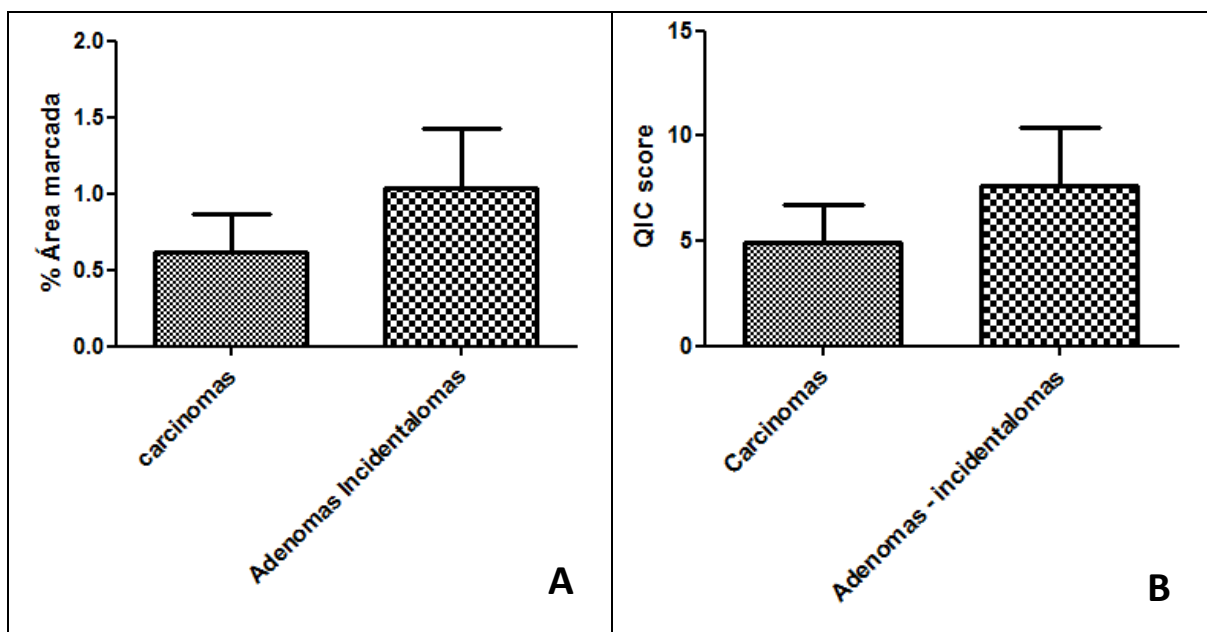
Gráfico 18 – Score de QIC dos diferentes grupos de amostras marcadas com MDM2 (ANOVA * $p < 0.05$ entre adenomas incidentais e supra-renais normais e entre carcinomas e supra-renais normais).

Procedeu-se também à comparação entre carcinomas e adenomas - totais quanto à percentagem de área marcada e ao score de QIC, através do teste de t-Student, porém não se encontraram diferenças significativas para nenhum dos parâmetros ($p>0.05$) (Gráficos 19A e 19B).



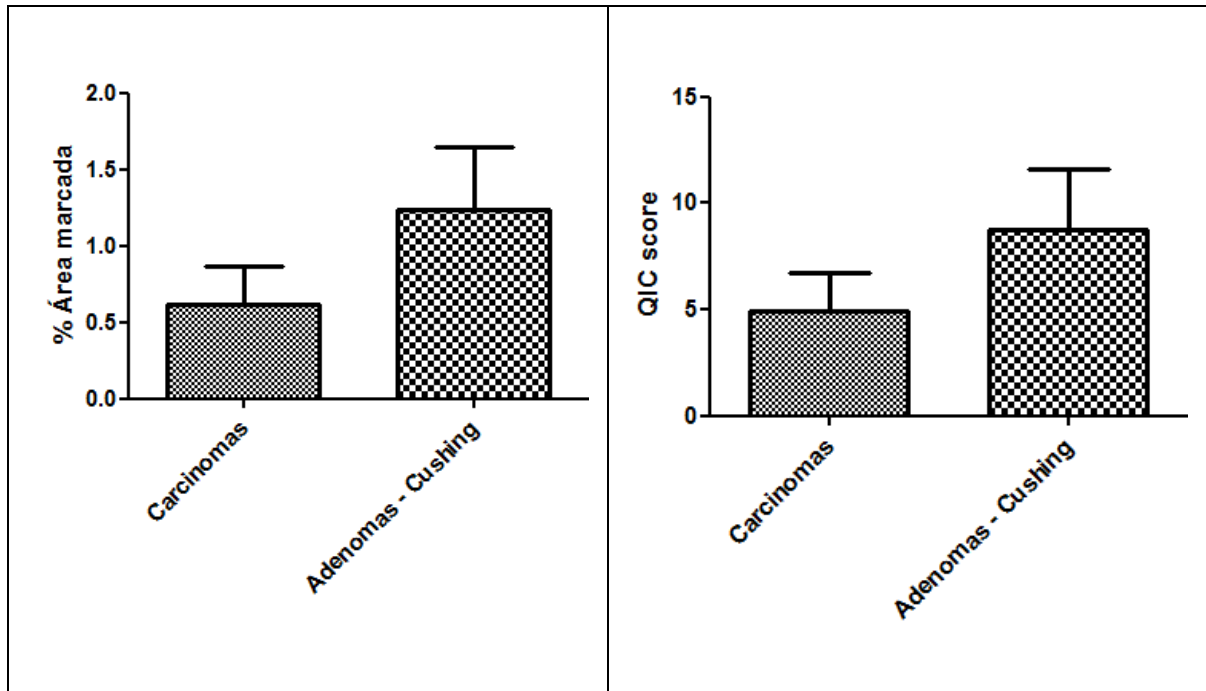
Gráficos: 19A – Percentagem de área marcada com MDM2, em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas). **19B** – Score de QIC em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com MDM2.

Comparando apenas os carcinomas com os adenomas incidentalomas, igualmente não se observaram diferenças significativas nem para a percentagem de área marcada nem para o Score de QIC ($p>0.05$) (Gráfico 20A e 20B).



Gráficos: 20A – Percentagem de área marcada com MDM2 em carcinomas e adenomas incidentalomas; **20B** – Score de QIC em carcinomas e adenomas incidentalomas marcados com MDM2

Finalmente, comparando os carcinomas e os adenomas funcionantes com síndrome de Cushing, também não se verificaram diferenças significativas nem quanto à percentagem de área marcada nem quanto ao score de QIC ($p>0.05$) (Gráfico 21A e 21B).



Gráficos: 21A – Percentagem de área marcada com MDM2 em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing ; **21B** – Score de QIC em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados com MDM2.

4.5 - Imunohistoquímica para o p21

A expressão da proteína p21 foi avaliada por imunohistoquímica nas diferentes amostras e foi quantificada a percentagem de área marcada e a intensidade de marcação nessa área utilizando o software ImageJ (Figura 8).

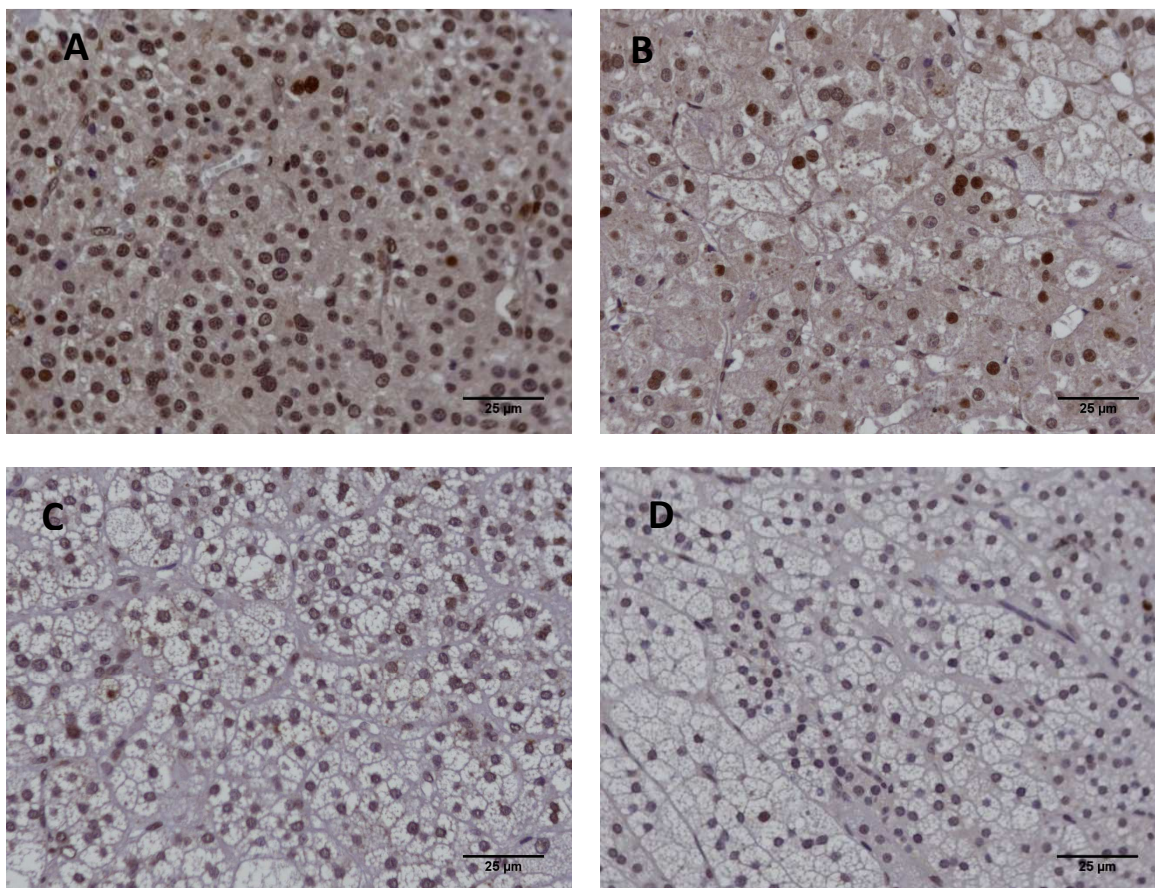


Figura 8 – Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador p21 realizadas em carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x)

Para o marcador p21, a percentagem de área marcada não se observaram diferenças significativas entre nenhum dos grupos (Gráfico 22).

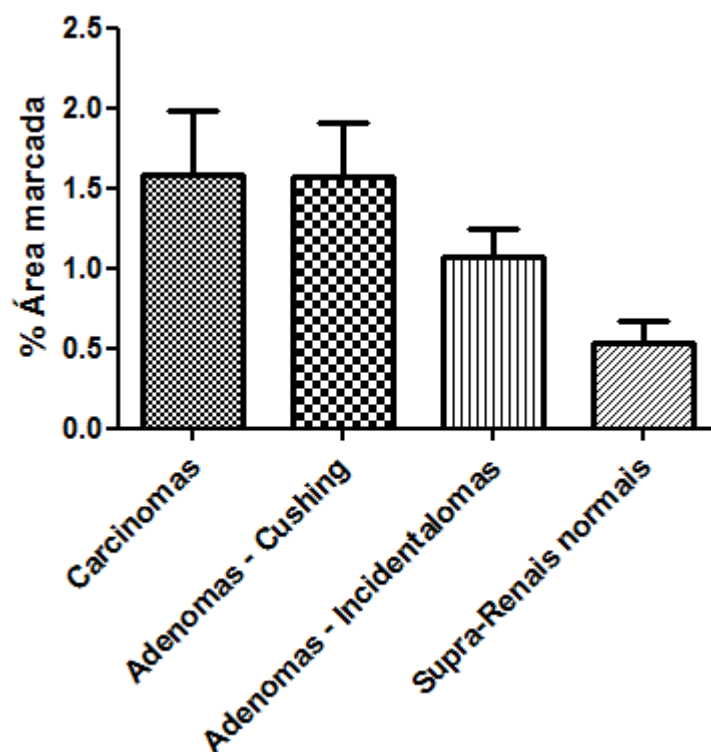


Gráfico 22 - Percentagem de área marcada com p21 nas amostras dos diferentes grupos em estudo.

Também quanto ao score de QIC, não se observaram diferenças significativas entre nenhum dos grupos em estudo ($p > 0.05$) (Gráfico 23).

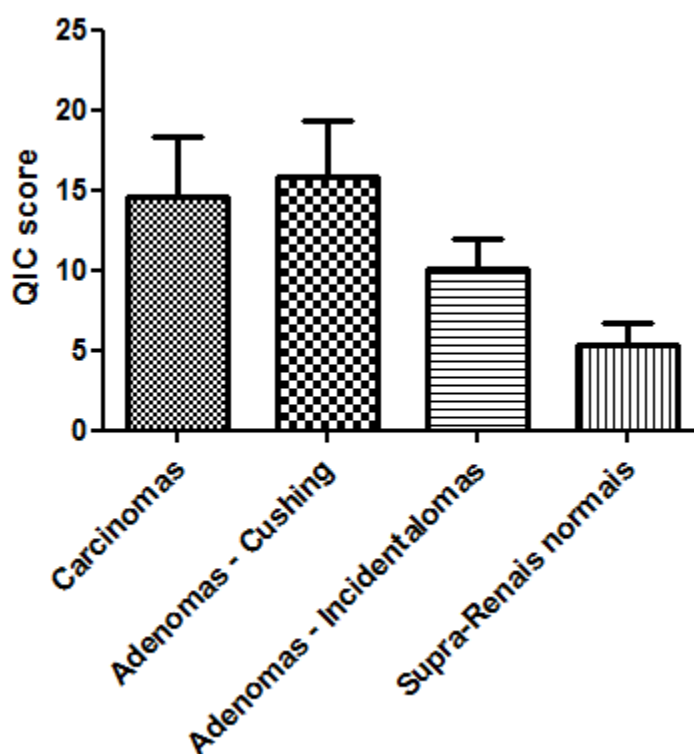
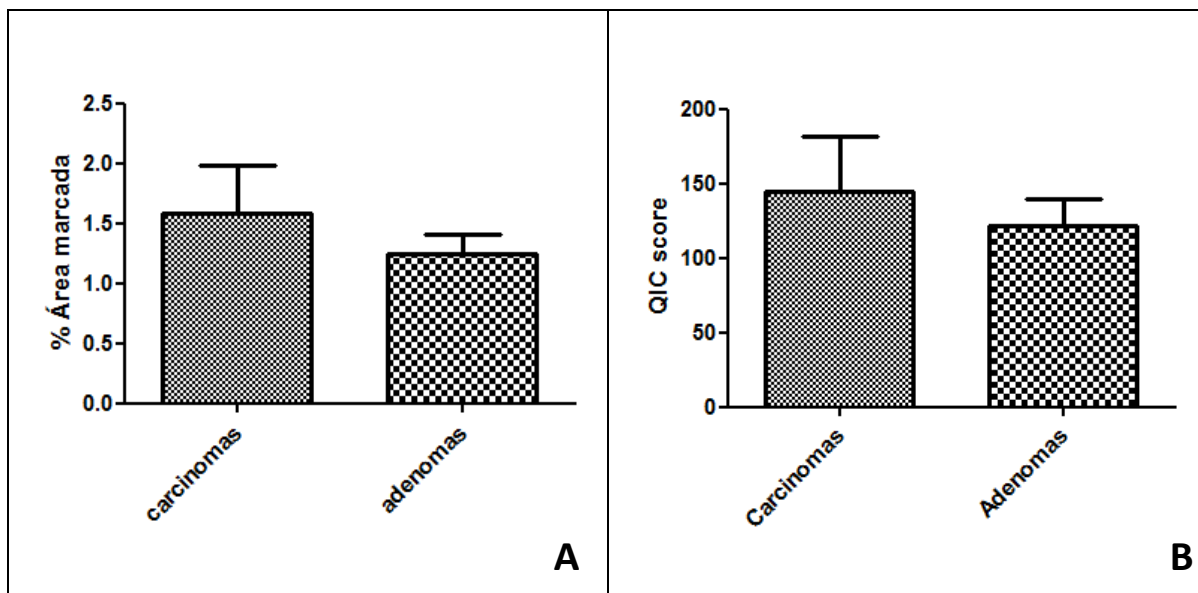


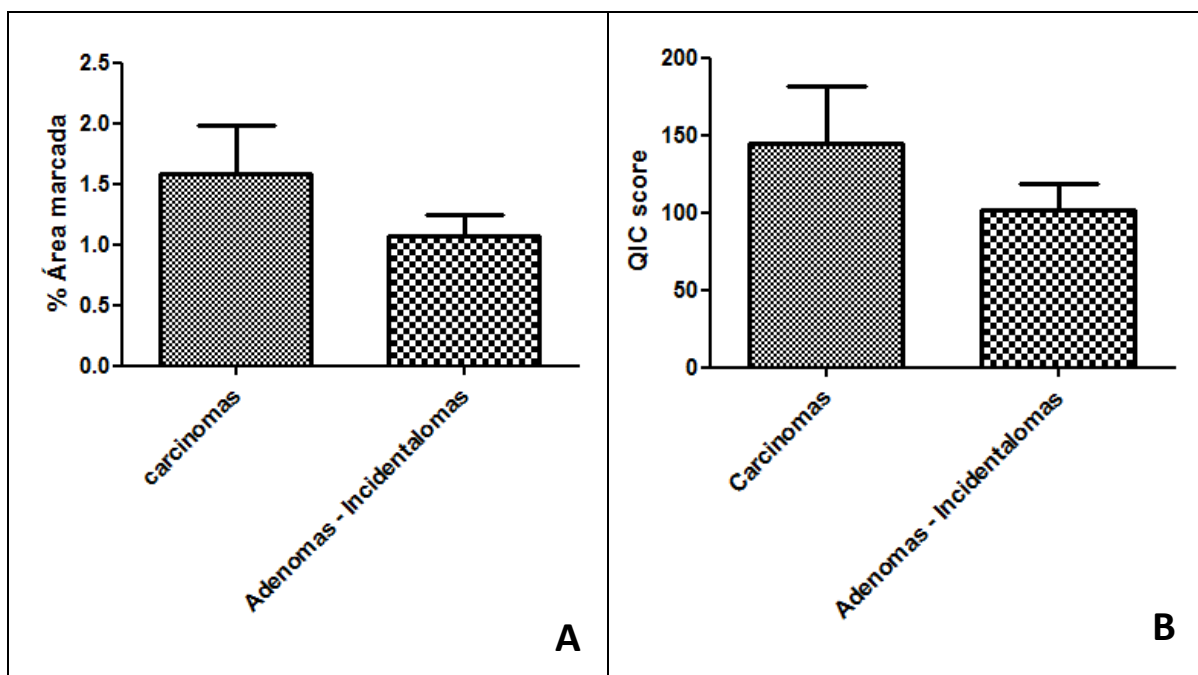
Gráfico 23 – QIC score nas amostras marcadas com p21.

Procedeu-se também à comparação entre carcinomas e adenomas - totais quanto à percentagem de área e ao score de QIC através do teste de t-Student, no entanto, não se observaram diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos parâmetros (Gráficos 24A e 24B).



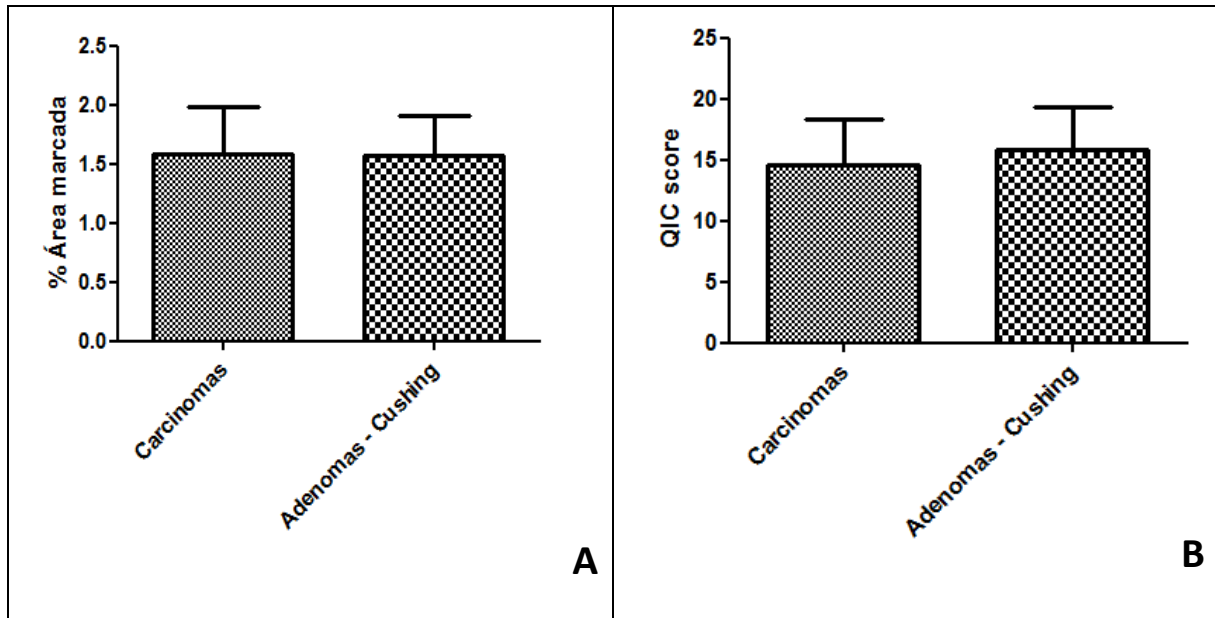
Gráficos: 24A – Percentagem de área marcada com p21 em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas). **24B** – Score de QIC em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com p21.

Comparando apenas os carcinomas com os adenomas incidentalomas, também não se observaram diferenças significativas nem quanto à percentagem de área nem quanto ao score de QIC ($p < 0.05$) (Gráfico 25A e 25B).



Gráficos: 25A - Percentagem de área marcada com p21 em carcinomas e adenomas incidentalomas; **25B** – QIC score em carcinomas e adenomas incidentalomas marcados com p21.

Comparando os carcinomas com os adenomas funcionantes com síndrome de Cushing, também não se observaram diferenças significativas nem quanto à percentagem de área marcada nem quanto ao score de QIC ($p>0.05$) (Gráfico 26A e 26B).



Gráficos: 26A - % de área marcada, nos carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados com p21; **26B** - Score de QIC nos carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados com p21.

4.6 - Imunohistoquímica para o p27

A expressão da proteína p27 foi avaliada por imunohistoquímica, em todas as amostras e foi quantificada a percentagem de área marcada e a intensidade de marcação nessa área utilizando o software ImageJ (Figura 9).

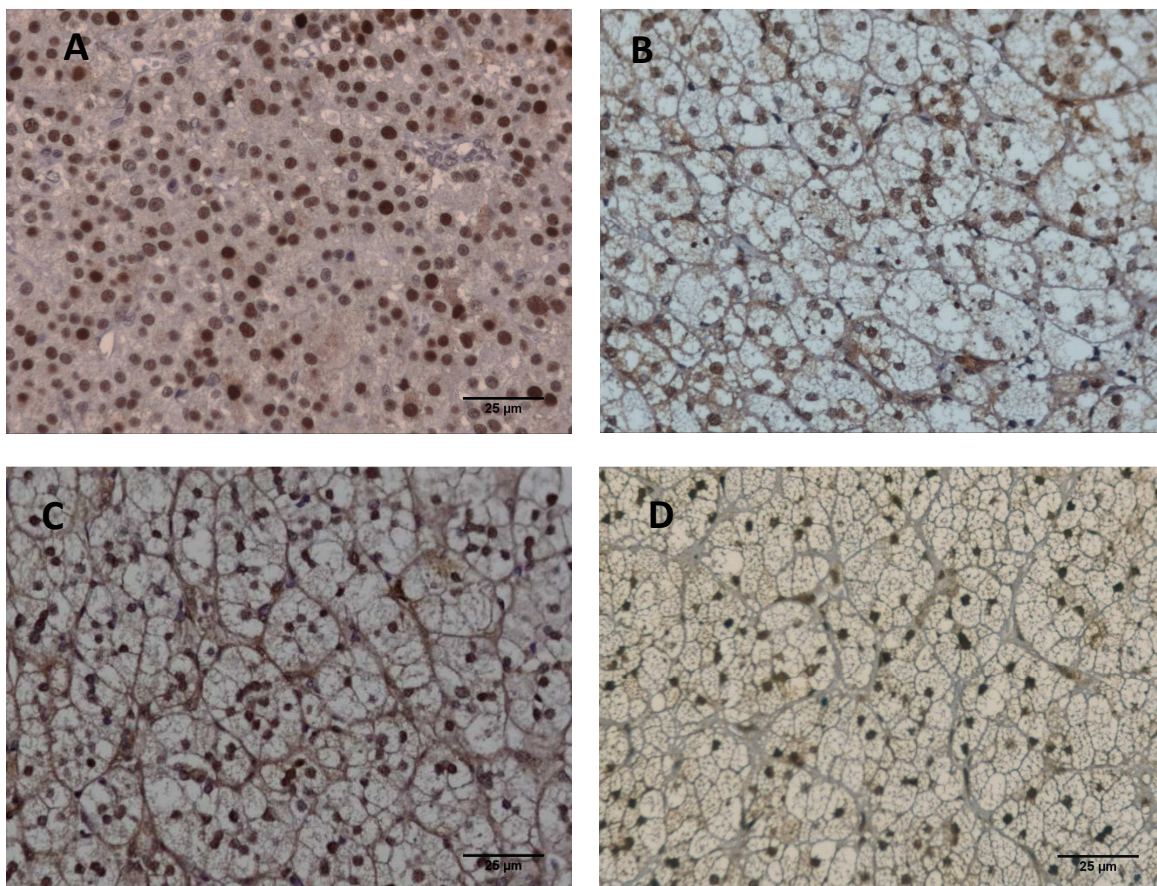


Figura 9 – Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador p27 realizadas em carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x)

Para o marcador p27, a percentagem de área marcada foi significativamente maior nos carcinomas quando comparados com os adenomas com síndrome de Cushing ($9.37 \pm 1.33 \%$ vs $3.93 \pm 0.56 \%$, $p < 0.01$), adenomas incidentalomas ($9.37 \pm 1.33 \%$ vs $3.86 \pm 0.29 \%$, $p < 0.05$) e supra-renais normais ($9.37 \pm 1.33 \%$ vs $3.46 \pm 0.29 \%$, $p < 0.05$) (Gráfico 27).

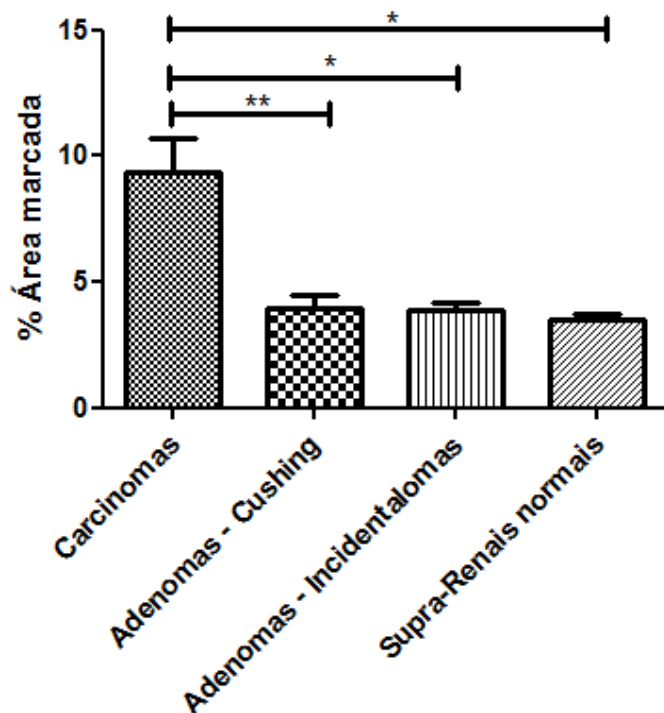


Gráfico 27 - Percentagem de área marcada com p27, nas amostras dos diferentes grupos em estudo (ANOVA * $P < 0.05$ entre carcinomas e adenomas incidentais e entre carcinomas e supra-renais normais ; ** $P < 0.01$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing).

Para o score de QIC, observaram-se diferenças significativas entre os grupos dos carcinomas e adenomas – incidentais (111.10 ± 15.75 vs 44.68 ± 4.08 , $p < 0.05$) e carcinomas e supra-renais normais (111.10 ± 15.75 vs 41.77 ± 3.69 , $p < 0.05$) (Gráfico 28).

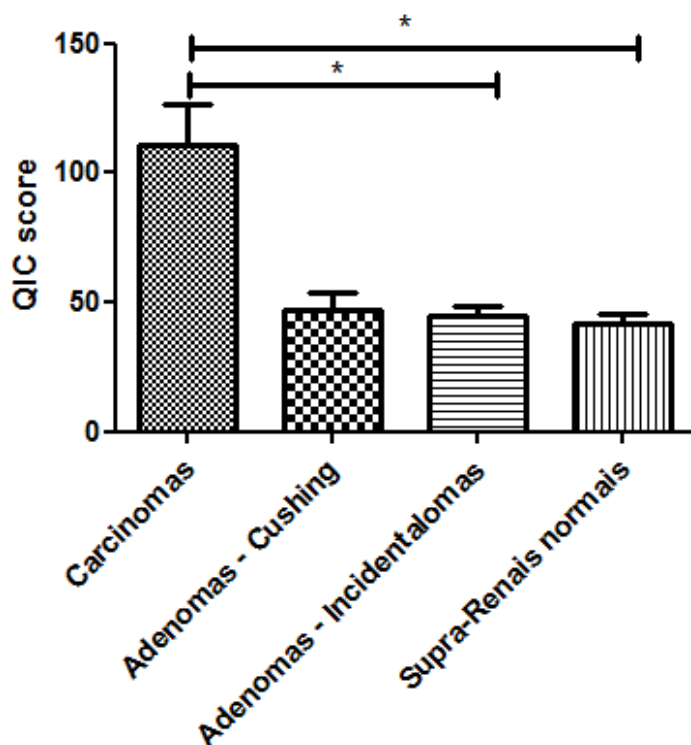
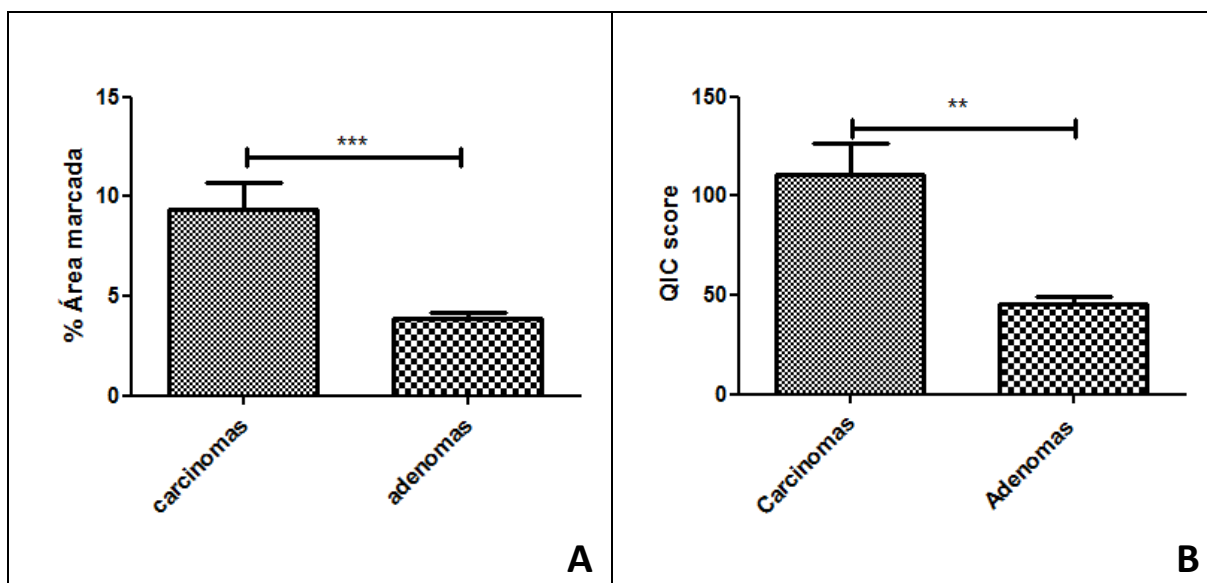


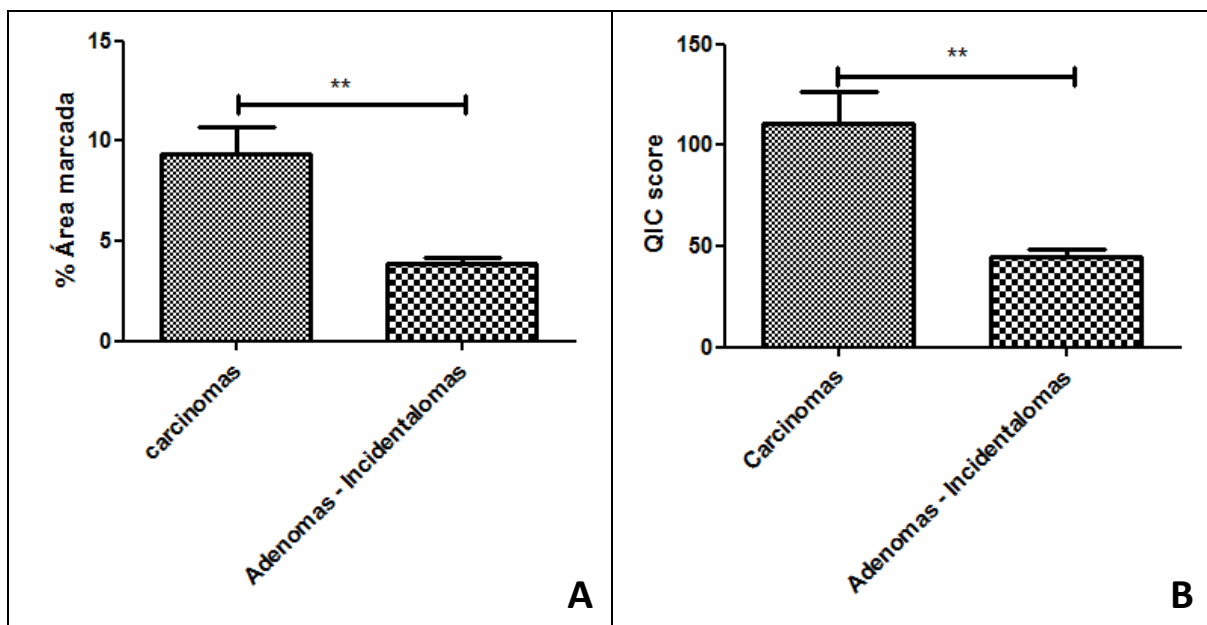
Gráfico 28 – Score de QIC nas amostras dos diferentes grupos marcadas com p27 (ANOVA * $p < 0.05$ entre carcinomas e adenomas incidentais e carcinomas e supra-renais normais).

Procedeu-se também à comparação entre carcinomas e adenomas através do teste de t-Student. Para a percentagem de área marcada, verificou-se que os carcinomas apresentam uma percentagem de área marcada significativamente maior do que os adenomas ($111.1 \pm 15.75 \%$ vs $3.888 \pm 0.2696 \%$, $p < 0.001$), o mesmo acontece quanto ao score de QIC em que também aqui que os carcinomas apresentam um score de QIC maior do que os adenomas (111.1 ± 15.72 vs 45.45 ± 3.565 , $p < 0.01$) (Gráficos 29A e 29B).



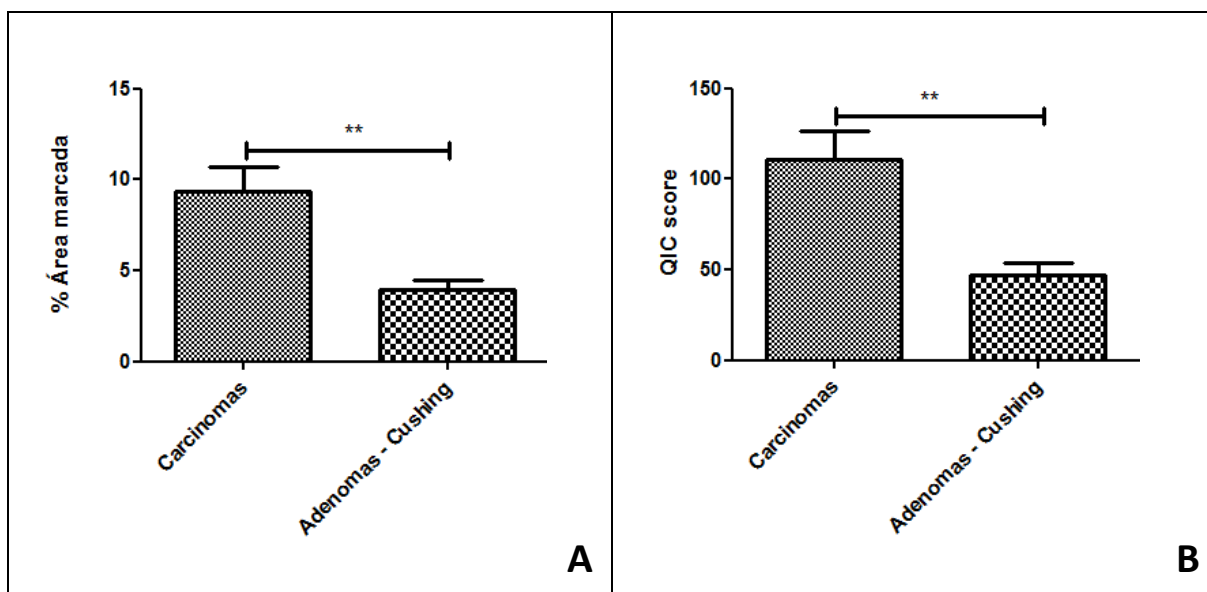
Gráficos: 29A - Percentagem de área marcada com p27 em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas). (t-Student *** $p < 0.001$ entre carcinomas e adenomas). **29B** - Score de QIC em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com p27 (t-Student ** $p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas).

Comparando apenas os carcinomas com os adenomas incidentalomas, também se observaram diferenças significativas quanto à percentagem de área marcada, sendo que os carcinomas apresentaram uma percentagem de área marcada superior à dos adenomas incidentalomas ($9.37 \pm 1.33 \%$ vs $3.86 \pm 0.29 \%$, $p < 0.01$) (Gráfico 30A) e quanto ao score de QIC, sendo que os carcinomas apresentaram uma percentagem de área marcada maior do que os adenomas incidentalomas (111.10 ± 15.72 vs 44.68 ± 4.08 , $p < 0.01$) (Gráfico 30B).



Gráficos: 30A - Percentagem de área marcada com p27 em carcinomas e adenomas incidentais (t-Student $**p<0.01$ entre carcinomas e adenomas incidentais).; **30B** - Score de QIC em carcinomas e adenomas incidentais marcados com p27 (t-Student $**p<0.01$ entre carcinomas e adenomas incidentais).

Comparando os carcinomas com os adenomas com síndrome de Cushing, observaram-se diferenças significativas para a percentagem de área marcada, sendo que os carcinomas apresentam uma percentagem de área marcada maior do que os adenomas com síndrome de Cushing ($9.37 \pm 1.33\%$ vs $3.89 \pm 0.27\%$, $p<0.01$) (Gráfico 31A) e para o QIC score, sendo que os carcinomas apresentam uma percentagem de área marcada maior do que os adenomas incidentais (111.10 ± 15.72 vs 46.78 ± 7.12 , $p<0.01$) (Gráfico 31B).



Gráficos: 31A - Percentagem de área marcada com p27 em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing (t-Student $**p<0.01$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing). **31B** - Score de QIC em carcinomas e adenomas marcados com p27 (t-Student $**p<0.01$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing).

A utilidade do marcador p27, para o diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas por imunohistoquímica, foi avaliada através de uma curva ROC.

Assim, verificou-se uma área sob a curva ROC de 0.92 para a percentagem de área marcada com um $p < 0.001$ e 0.91 para o score de QIC com um $p < 0.01$ para distinção de carcinomas e adenomas (Figura 10).

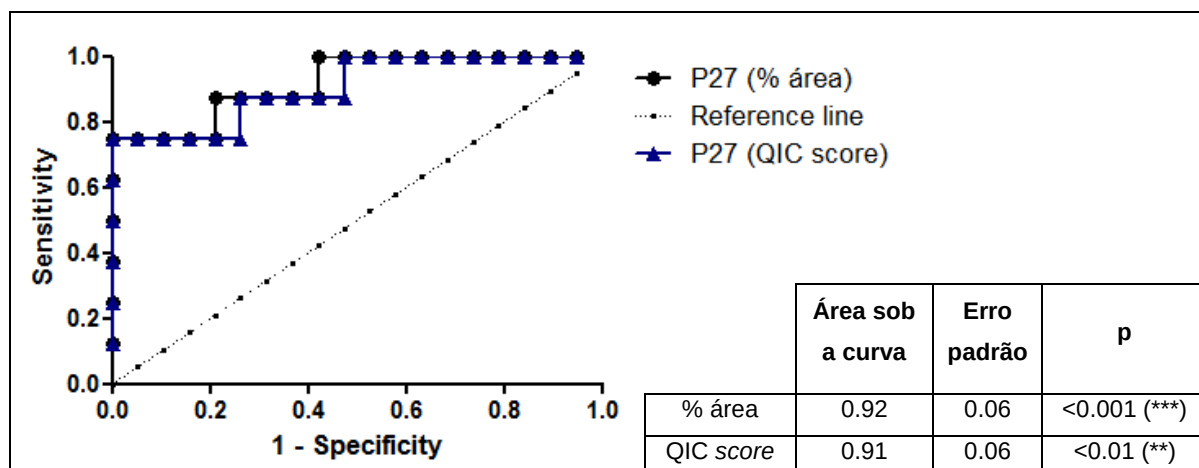


Figura 10 – Representação gráfica da curva ROC, entre adenomas e carcinomas e respetiva tabela de resultados, para o marcador p27.

Quando a curva ROC foi realizada entre carcinomas e adenomas incidentais, verificamos uma área sob a curva de 0.93 com um $p < 0.01$, para o parâmetro percentagem de área marcada e de 0.92 para o score de QIC. (Figura 11).

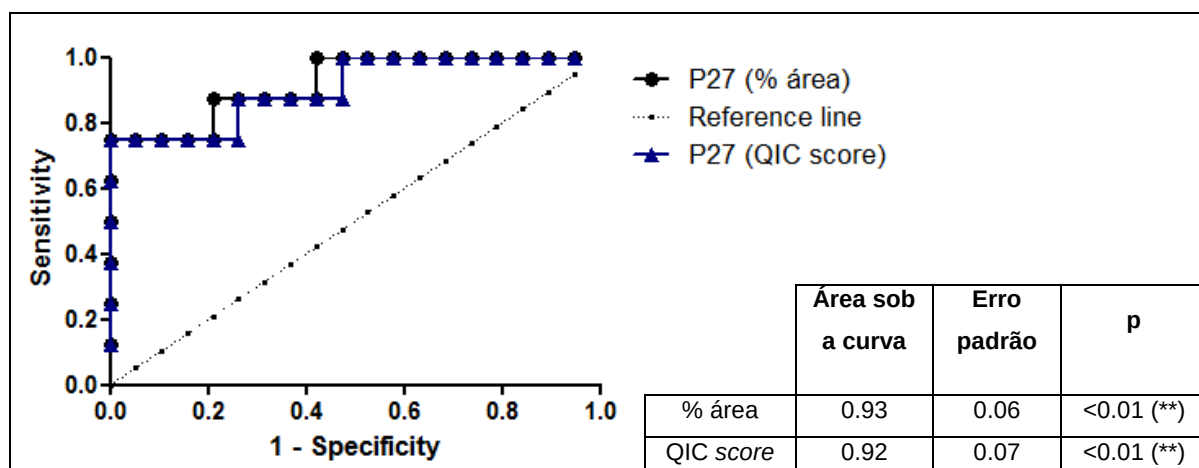


Figura 11 – Representação gráfica da curva ROC para o marcador p27, entre adenomas - incidentais e carcinomas e respetiva tabela de resultados.

Quando a curva ROC foi realizada entre carcinomas e adenomas funcionantes com síndrome de Cushing, observamos uma área sob a curva de 0.91 com um $p < 0.01$, para o parâmetro percentagem de área e de 0.89 com um $p < 0.05$ para o score de QIC. (Figura 13).

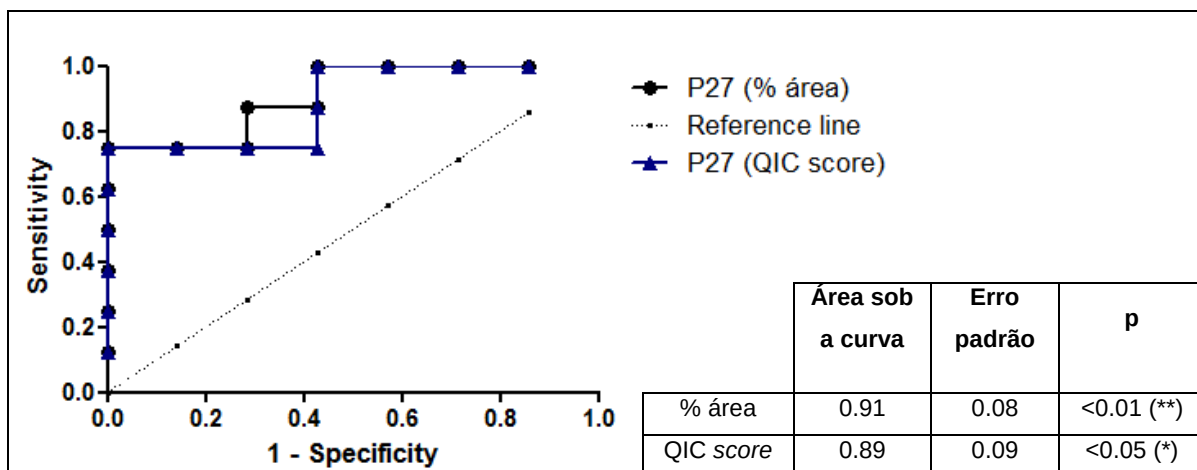


Figura 12 – Representação gráfica da curva ROC para o marcador p27, entre adenomas com síndrome de Cushing e carcinomas e respetiva tabela de resultados.

4.7 - Imunohistoquímica para a Ciclina D1

A expressão da proteína ciclina D1 foi avaliada por imunohistoquímica em todas as amostras e foi quantificada a percentagem de área marcada e a intensidade de marcação nessa área utilizando o software ImageJ (Figura 13).

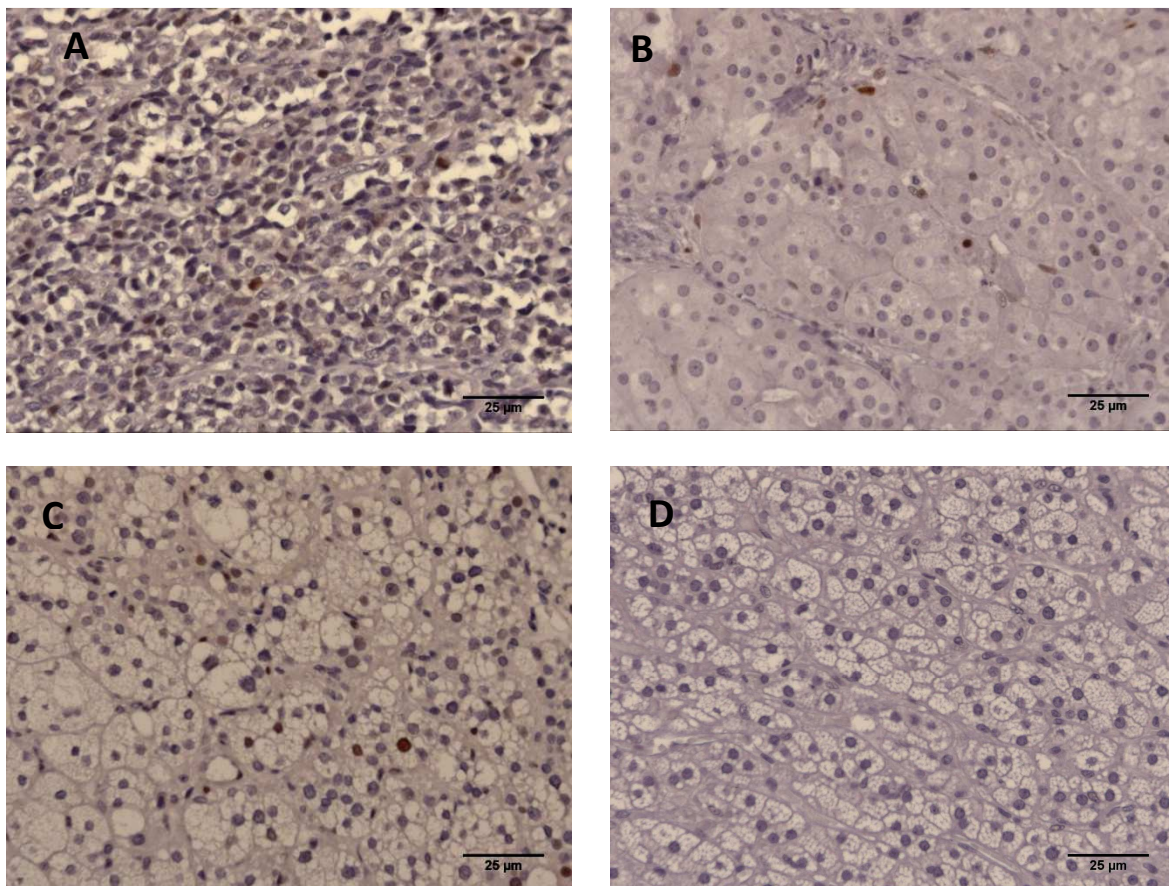


Figura 13 – Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador ciclina D1 realizadas em carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x)

Para o marcador ciclina D1, não obtivemos diferenças significativas, quanto à percentagem de área marcada (Gráfico 32).

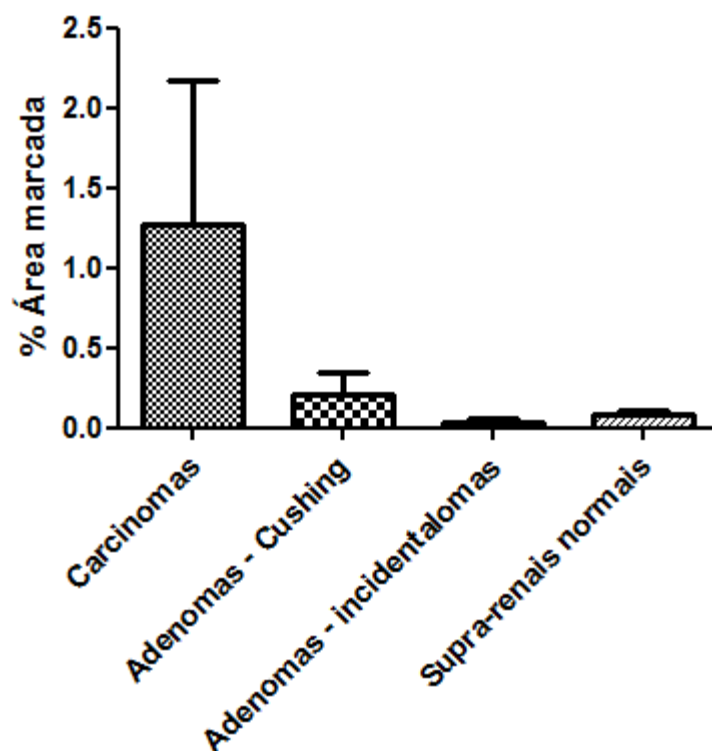


Gráfico 32 - Percentagem de área marcada com ciclina D1, nas amostras dos diferentes grupos.

Da mesma forma no que respeita ao *score* de QIC, também não se verificaram diferenças significativas entre nenhum dos grupos em estudo (Gráfico 33).

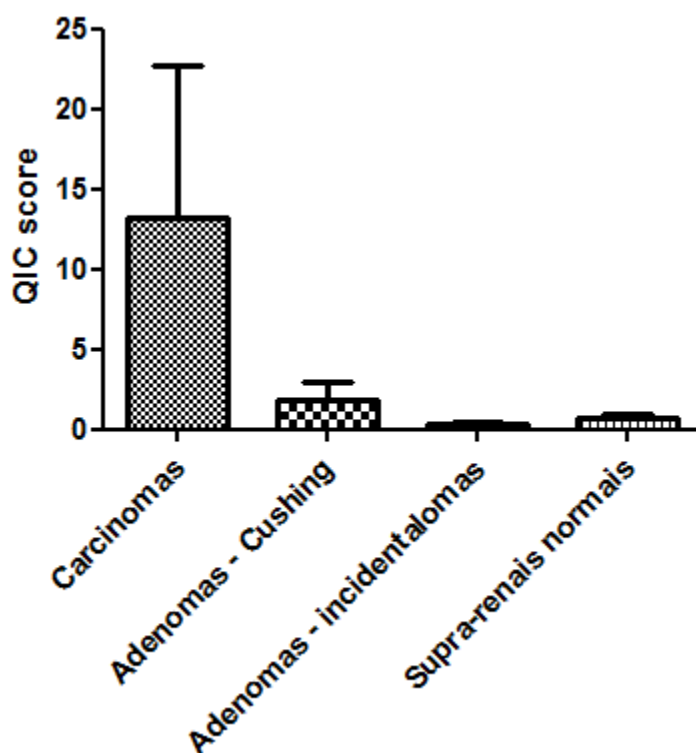
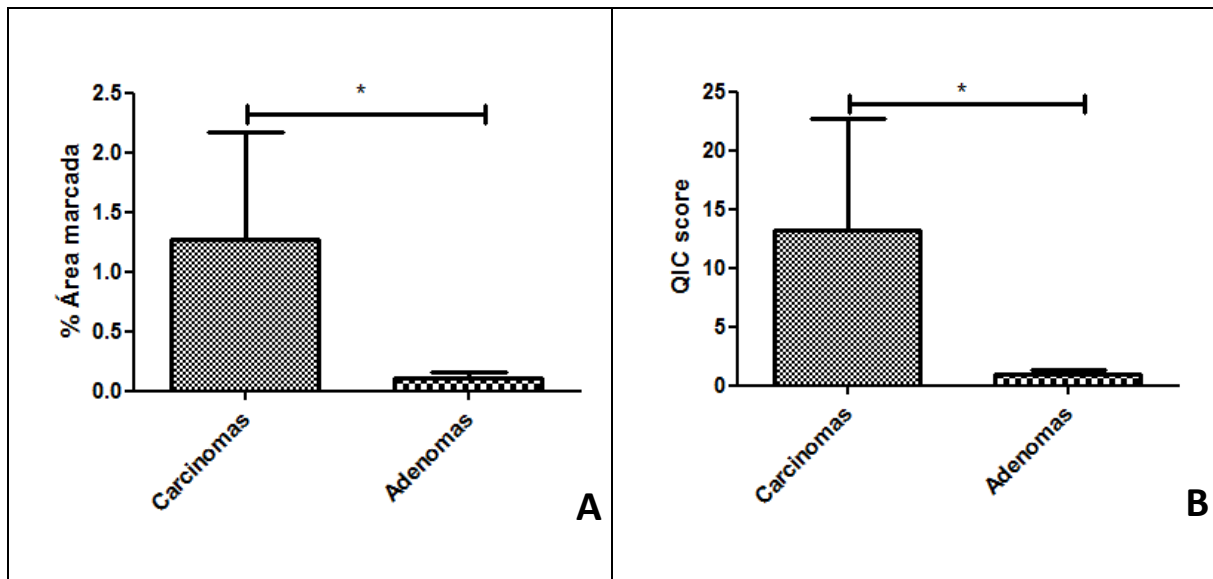


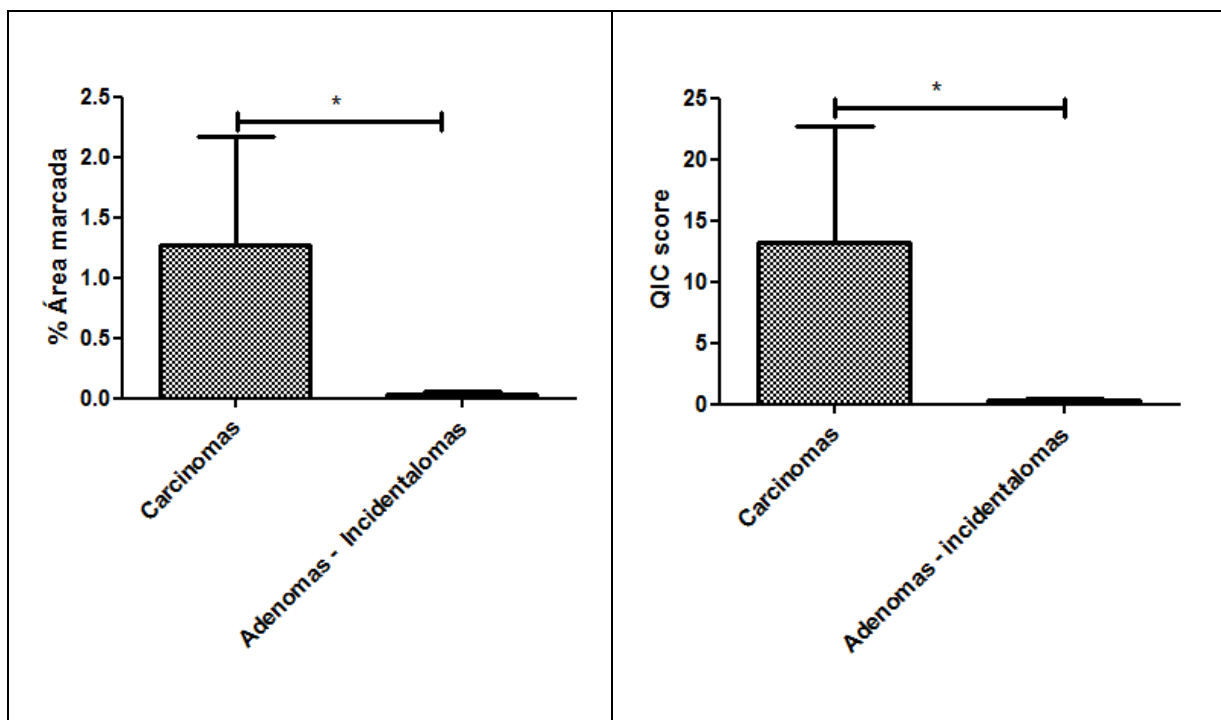
Gráfico 33 – *Score* de QIC nas amostras marcadas com ciclina D1.

Procedeu-se também à comparação entre carcinomas e adenomas quanto à percentagem de área marcada e ao score de QIC pelo teste de t-Student. Foi observada uma diferença significativa para a percentagem de área marcada, sendo que os carcinomas apresentaram uma percentagem de área marcada maior do que os adenomas (1.27 ± 0.91 % vs 0.10 ± 0.05 %, $p < 0.05$) e para o score de QIC, sendo que este foi significativamente maior nos carcinomas do que nos adenomas (13.21 ± 9.54 vs 0.90 ± 0.43 , $p < 0.05$) (Gráficos 34A e 34B).



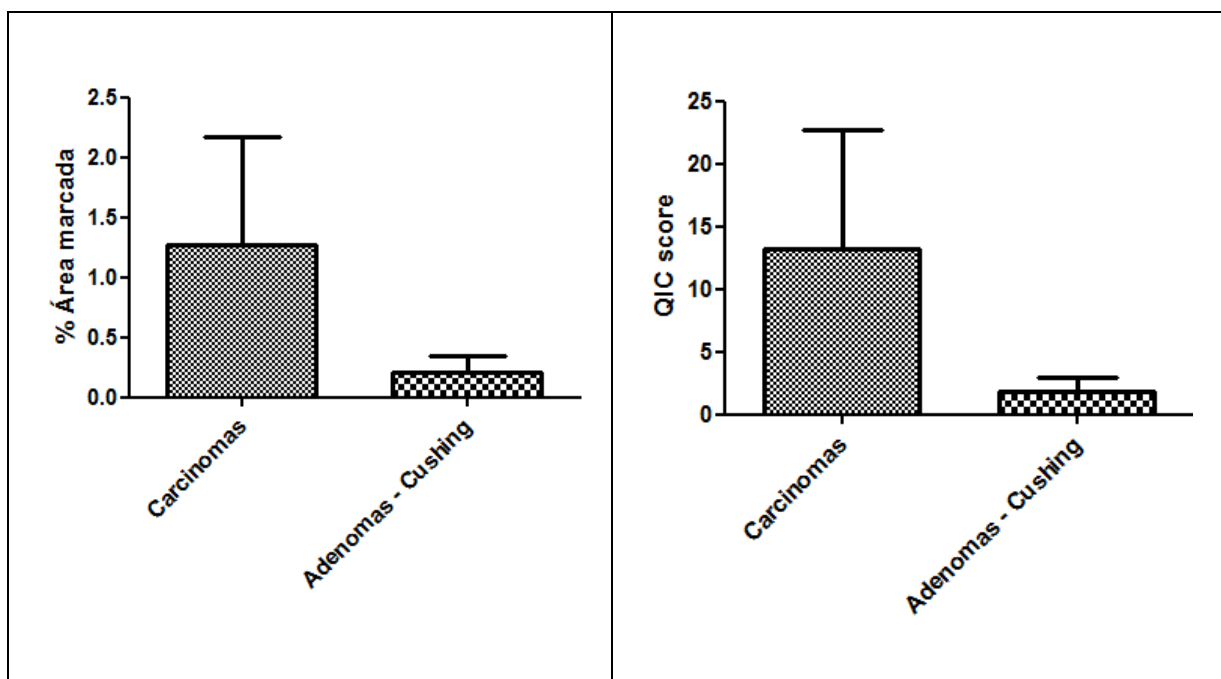
Gráficos: 34A - Percentagem de área marcada em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com ciclina D1 (t-Student ** $p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas). **34B** - Score de QIC em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com ciclina D1 (t-Student ** $p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas).

Comparando apenas os carcinomas com os adenomas incidentalomas, observou-se uma percentagem de área marcada significativamente maior nos carcinomas em comparação com os adenomas incidentalomas (1.27 ± 0.91 % vs 0.10 ± 0.05 %, $p < 0.05$). Quanto ao score de QIC, este também foi significativamente maior nos carcinomas do que nos adenomas (13.21 ± 9.54 vs 0.35 ± 0.12 , $p < 0.05$) (Gráfico 35A e 35B).



Gráficos: 35A - Percentagem de área marcada em carcinomas e adenomas incidentais marcados com ciclina D1 (t-Student $*p < 0.05$ entre carcinomas e adenomas incidentais); **35B** - Score de QIC em carcinomas e adenomas incidentais marcados com ciclina D1 (t-Student $**p < 0.05$ entre carcinomas e adenomas incidentais).

Comparando apenas os carcinomas com os adenomas com síndrome de Cushing, não se observaram diferenças significativas quanto à percentagem de área marcada nem quanto ao score de QIC ($p > 0.05$) (Gráfico 36A e 36B).



Gráficos: 36A - Percentagem de área marcada, em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados com ciclina D1; **36B** - Score de QIC em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados com ciclina D1.

A utilidade do marcador ciclina D1 por imunohistoquímica no diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas, foi estimada recorrendo a uma curva ROC. Assim, observou-se uma área sob a curva ROC de 0.75 ($p < 0.05$) usando a percentagem de área marcada e uma área sob a curva ROC de 0.74 ($p < 0.05$), usando o score de QIC para distinção entre carcinomas e adenomas (Figura 14).

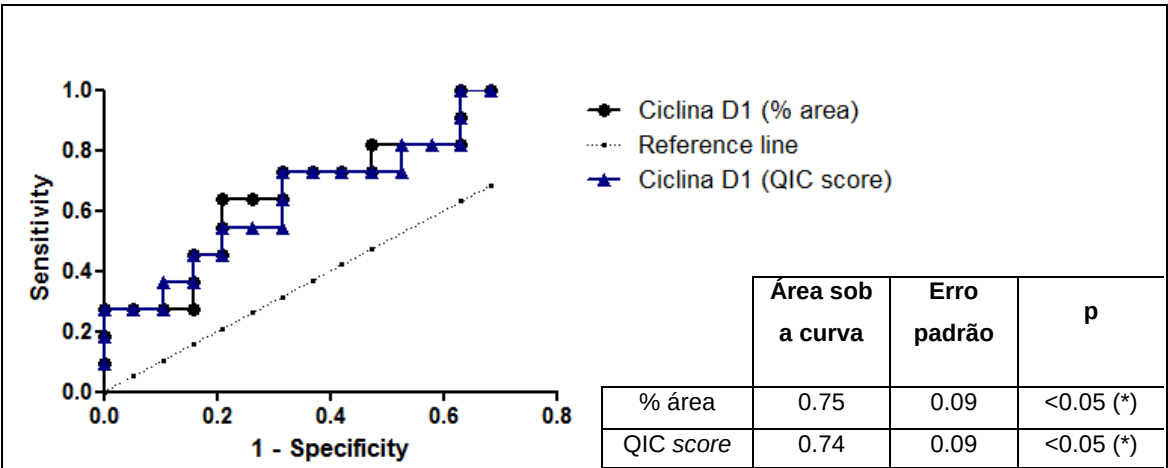


Figura 14 – Representação gráfica da curva ROC para o marcador ciclina D1, entre adenomas e carcinomas e respetiva tabela de resultados.

Quando a curva ROC foi realizada para comparar os carcinomas com os adenomas não funcionantes/incidentalomas, observamos uma área sob a curva ROC de 0.78 com um $p < 0.05$, utilizando a percentagem de área marcada como parâmetro de distinção, e uma área sob a curva ROC de 0.77 com um $p < 0.05$ utilizando o score de QIC (Figura 15).

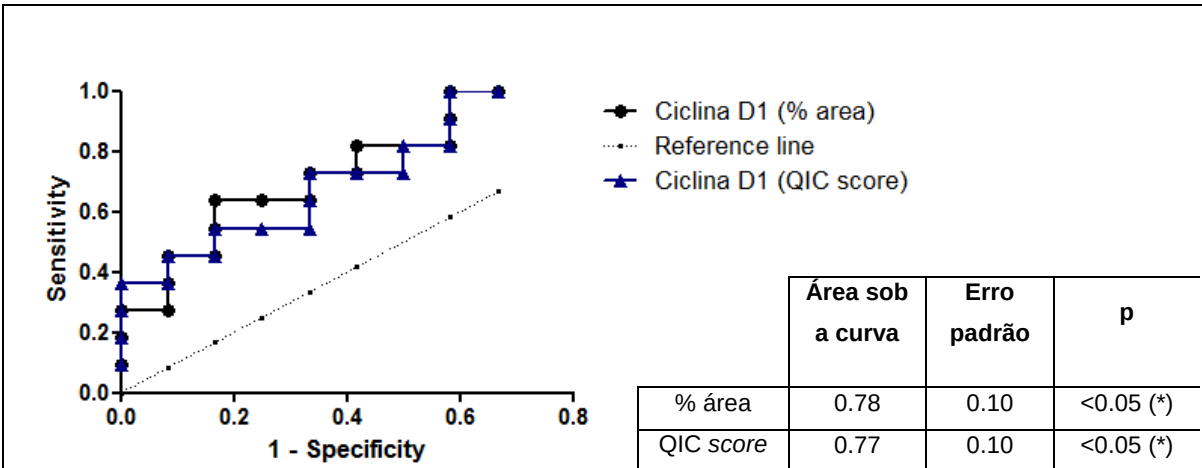


Figura 15 – Representação gráfica da curva ROC para o marcador ciclina D1, entre adenomas incidentais e carcinomas e respetiva tabela de resultados.

4.8 - Imunohistoquímica para o Ki-67

A expressão da proteína Ki-67 foi avaliada por imunohistoquímica, em todas as amostras e foi quantificada a percentagem de área marcada e a intensidade de marcação nessa área utilizando o software ImageJ (Figura 16).

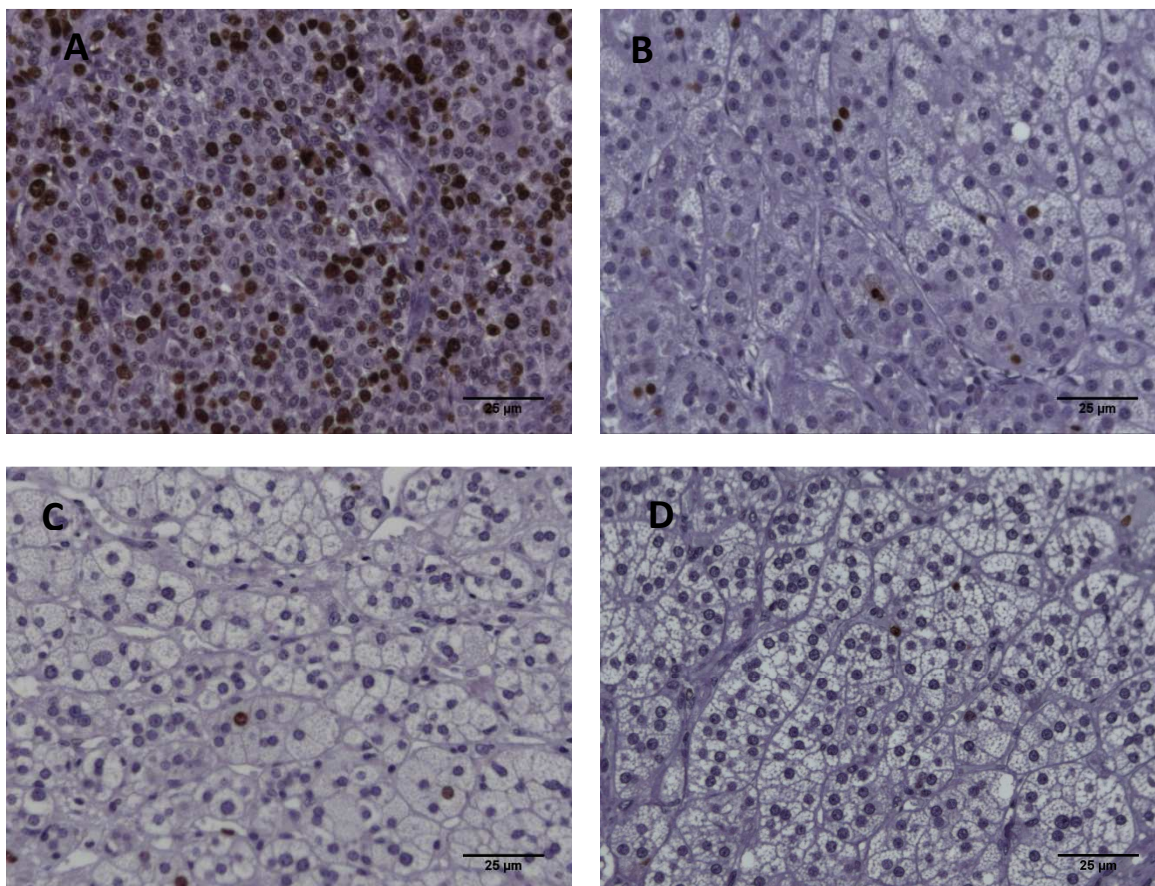


Figura 16 – Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador Ki-67 de carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x).

Para o marcador Ki-67, a percentagem de área marcada foi significativamente maior nos carcinomas quando comparados com os adenomas incidentalomas (2.53 ± 0.72 % vs 0.06 ± 0.03 %, $p < 0.001$) e supra-renal normal (2.52 ± 0.72 % vs 0.04 ± 0.02 %, $p < 0.001$) (Gráfico 37).

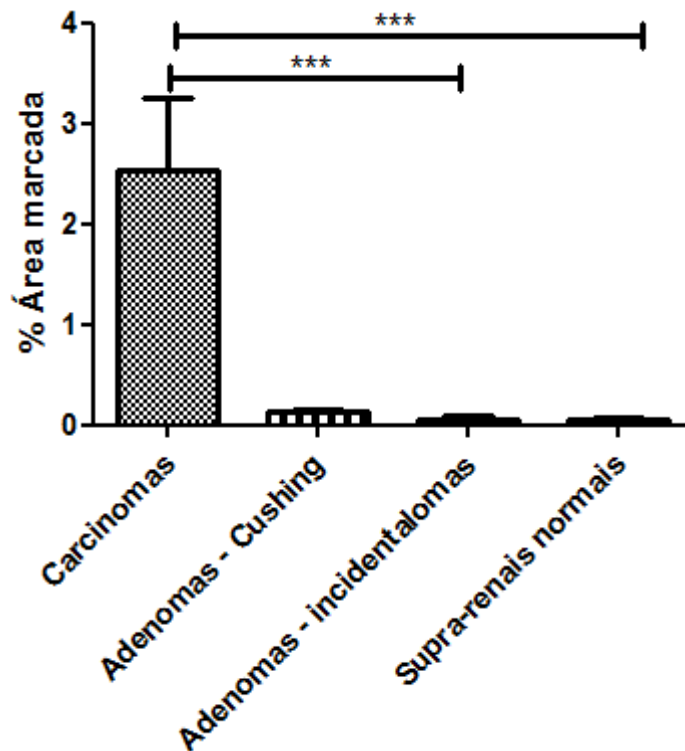


Gráfico 37 - Percentagem de área marcada com Ki-67, nas amostras dos diferentes grupos em estudo (ANOVA *** $p < 0.001$ entre carcinomas e adenomas incidentais e carcinomas e supra-renais normais).

Quanto ao score de QIC, este foi significativamente maior nos carcinomas quando comparado com os grupos dos adenomas incidentais (25.47 ± 7.68 vs 0.61 ± 0.30 , $p < 0.001$) e das supra-renais normais (25.47 ± 7.68 vs 0.86 ± 0.31 , $p < 0.01$) (Gráfico 38).

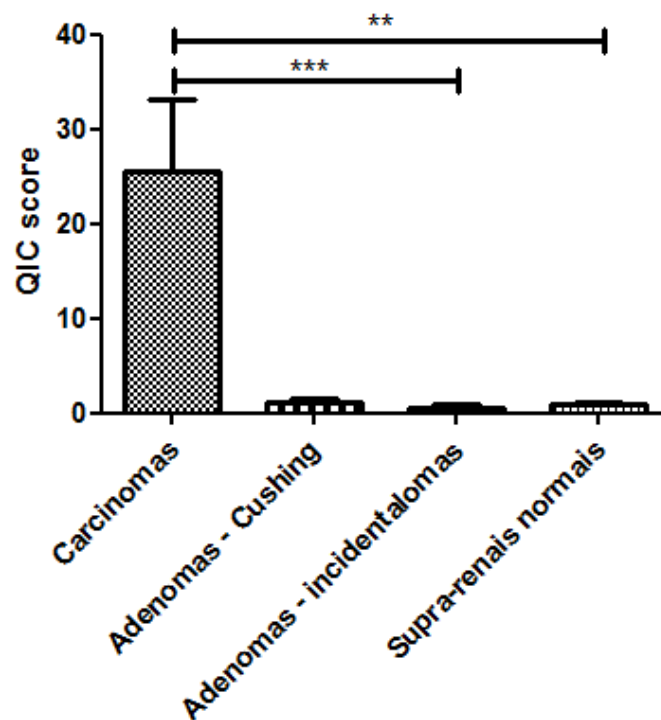
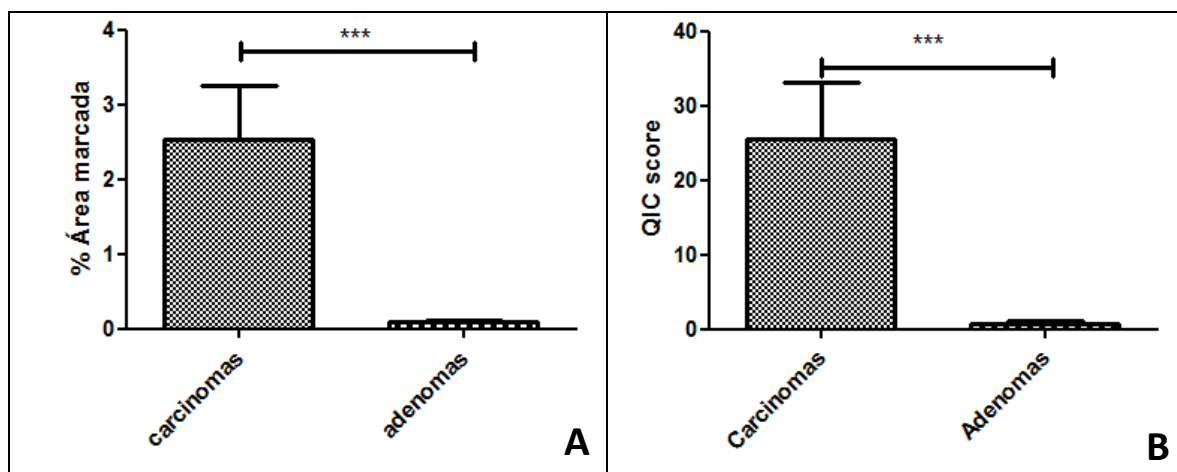


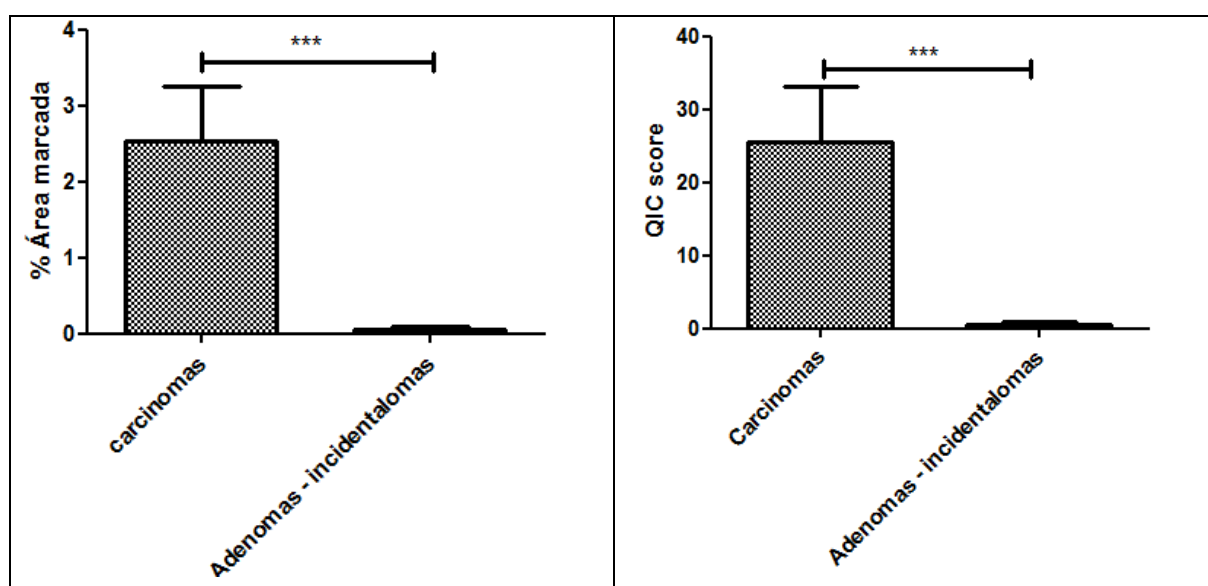
Gráfico 38 - Score de QIC nas amostras marcadas com Ki-67 dos diferentes grupos em estudo (ANOVA ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ entre carcinomas e adenomas incidentais e entre carcinomas e supra-renais normais).

Procedeu-se também à comparação entre carcinomas e adenomas totais quanto à percentagem de área marcada e à intensidade da marcação através do teste de t-Student. Apenas se observaram diferenças significativas para a percentagem de área marcada, tendo os carcinomas uma percentagem de área marcada maior do que os adenomas ($2.53 \pm 0.72 \%$ vs $0.08 \pm 0.02 \%$, $p < 0.001$) (Gráficos 39A e 39B).



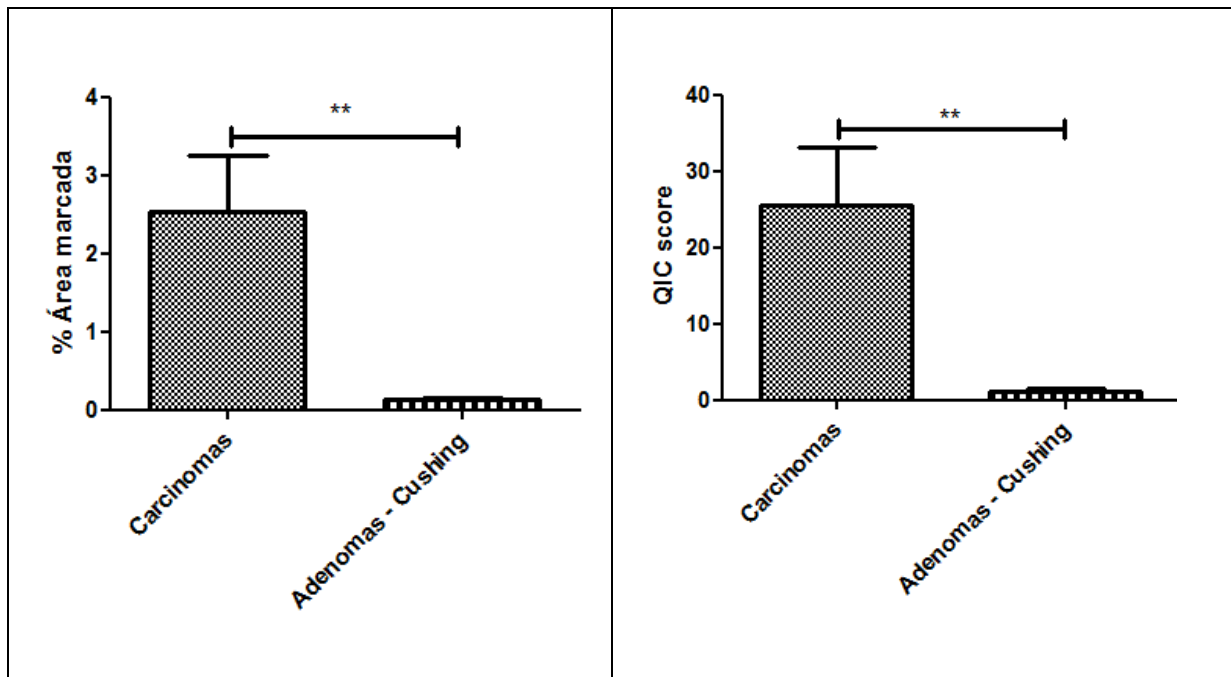
Gráficos: 39A - Percentagem de área marcada com Ki-67 em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) (t-Student *** $p < 0.001$ entre carcinomas e adenomas). **39B** - Score de QIC em carcinomas e adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) marcados com Ki-67 (t-Student *** $p < 0.001$ entre carcinomas e adenomas).

Comparando os carcinomas com os adenomas incidentalomas, observou-se que a percentagem de área marcada foi significativamente maior no grupo dos carcinomas do que no grupo dos adenomas – incidentalomas ($2.52 \pm 0.72 \%$ vs $0.06 \pm 0.03 \%$, $p < 0.001$). Quanto ao score de QIC, este também foi significativamente maior nos carcinomas do que nos adenomas – incidentalomas (25.47 ± 7.68 vs 0.61 ± 0.30 , $p < 0.001$) (Gráfico 40A e 40B).



Gráficos: 40A - Percentagem de área marcada com Ki-67 em carcinomas e adenomas incidentalomas (t-Student *** $p < 0.001$). **40B** - Score de QIC em carcinomas e adenomas incidentalomas marcados com Ki-67 (t-Student *** $p < 0.001$).

Comparando os carcinomas com os adenomas com síndrome de Cushing, observou-se que a percentagem de área marcada foi significativamente maior no grupo dos carcinomas do que no grupo dos adenomas com síndrome de Cushing ($2.53 \pm 0.72 \%$ vs $0.13 \pm 0.02 \%$, $p < 0.01$). Quanto ao *score* de QIC, este também foi significativamente maior nos carcinomas do que nos adenomas – incidentalomas (25.47 ± 7.68 vs 1.19 ± 0.26 , $p < 0.01$) (Gráfico 41A e 41B).



Gráficos: 41A - Percentagem de área marcada com Ki-67 em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing (t-Student $**p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing). **41B** - Score de QIC em carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing marcados com Ki-67 (t-Student $**p < 0.01$ entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing).

A utilidade do marcador Ki-67 por imunohistoquímica no diagnóstico, diferencial entre carcinomas e adenomas, foi avaliada através de uma curva ROC.

Assim, observou-se uma área sob a curva ROC de 0.96 ($p < 0.001$) para a percentagem de área marcada e uma área sob a curva ROC de 0.91 ($p < 0.01$) para o *score* de QIC para distinção entre carcinomas e adenomas (Figura 17).

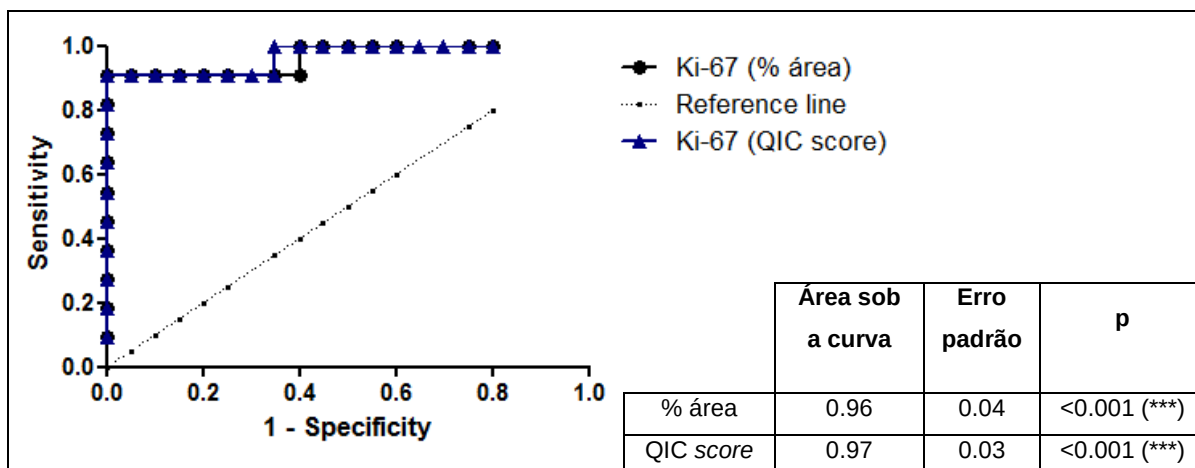


Figura 17 – Representação gráfica da curva ROC para o marcador KI-67, entre adenomas (síndrome de Cushing e incidentalomas) e carcinomas e respetiva tabela de resultados.

Quando a curva ROC foi realizada para comparar carcinomas e adenomas não funcionantes/incidentalomas, observou-se uma área sob a curva ROC de 0.98 ($p < 0.001$) para a percentagem de área marcada e uma área sob a curva ROC de 0.99 ($p < 0.001$) para o score de QIC para distinção entre carcinomas e adenomas (Figura 18).

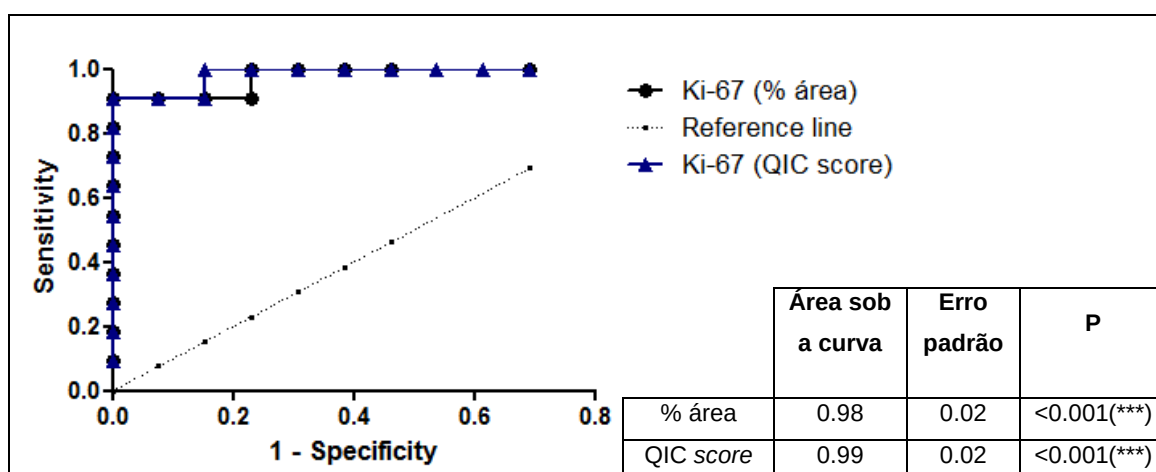


Figura 18 – Representação gráfica da curva ROC para o marcador KI-67, entre adenomas incidentalomas e carcinomas e respetiva tabela de resultados.

Quando a curva ROC foi realizada para comparar carcinomas com adenomas funcionantes com síndrome de Cushing, observou-se uma área sob a curva ROC de 0.94 ($p < 0.01$) para a percentagem de área marcada e uma área sob a curva ROC de 0.94 para o score de QIC ($p < 0.01$) (Figura 19).

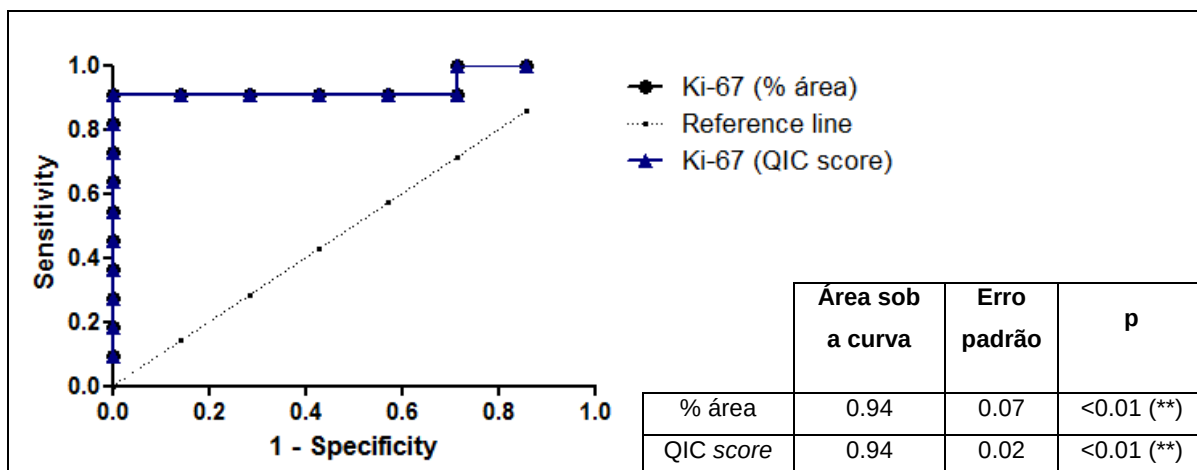


Figura 19 – Representação gráfica da curva ROC para o marcador Ki-67, entre adenomas com síndrome de Cushing e carcinomas e respetiva tabela de resultados.

4.9 - Imunohistoquímica para a E-caderina

A expressão da proteína E-caderina foi avaliada por imunohistoquímica, em todas as amostras e foi avaliada a percentagem de área marcada e a intensidade de marcação nessa área utilizando o software ImageJ (Figura 20).

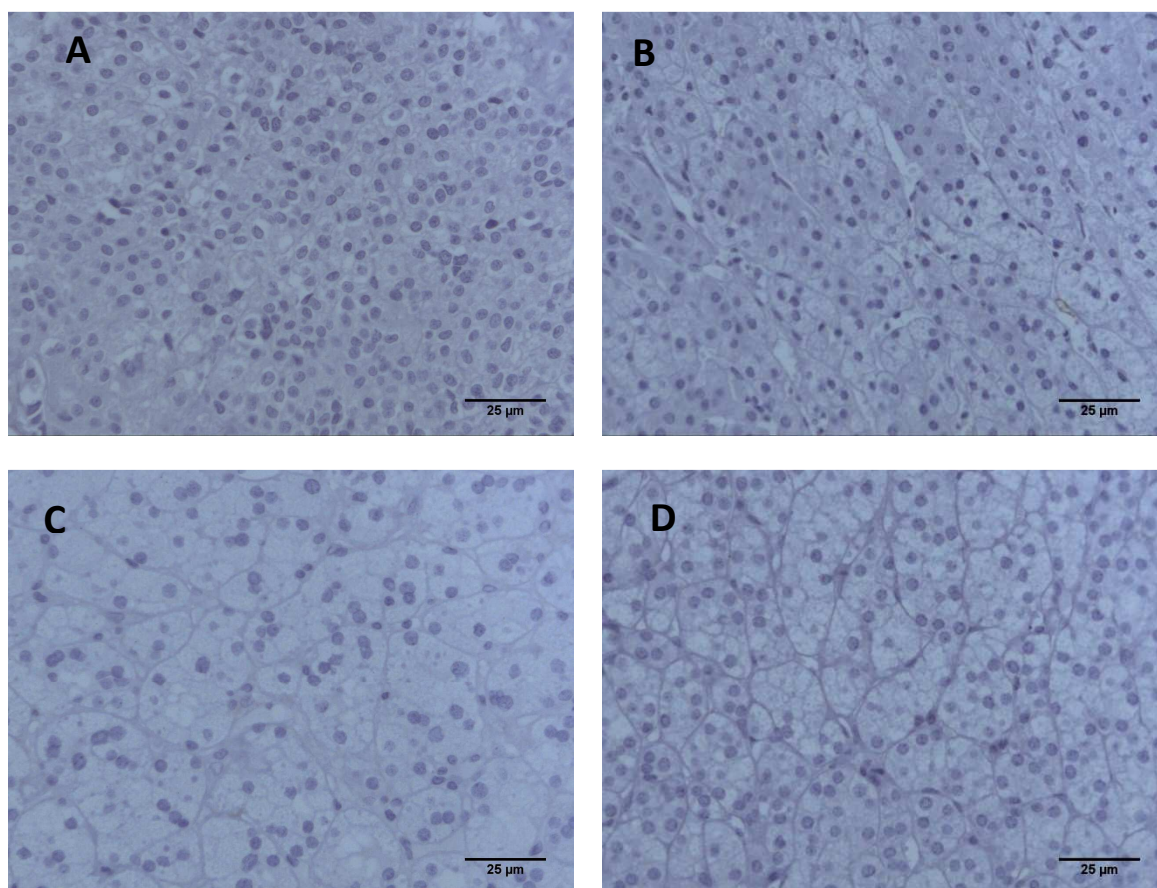


Figura 20 – Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador E-caderina realizadas em carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x)

Para este marcador não se observou marcação positiva em nenhuma das amostras estudadas.

4.10 Imunohistoquímica para a β -catenina

A expressão da proteína β -catenina foi avaliada por imunohistoquímica, em todas as amostras e foi quantificada a percentagem de área marcada e a intensidade de marcação nessa área utilizando o software ImageJ (Figura 21).

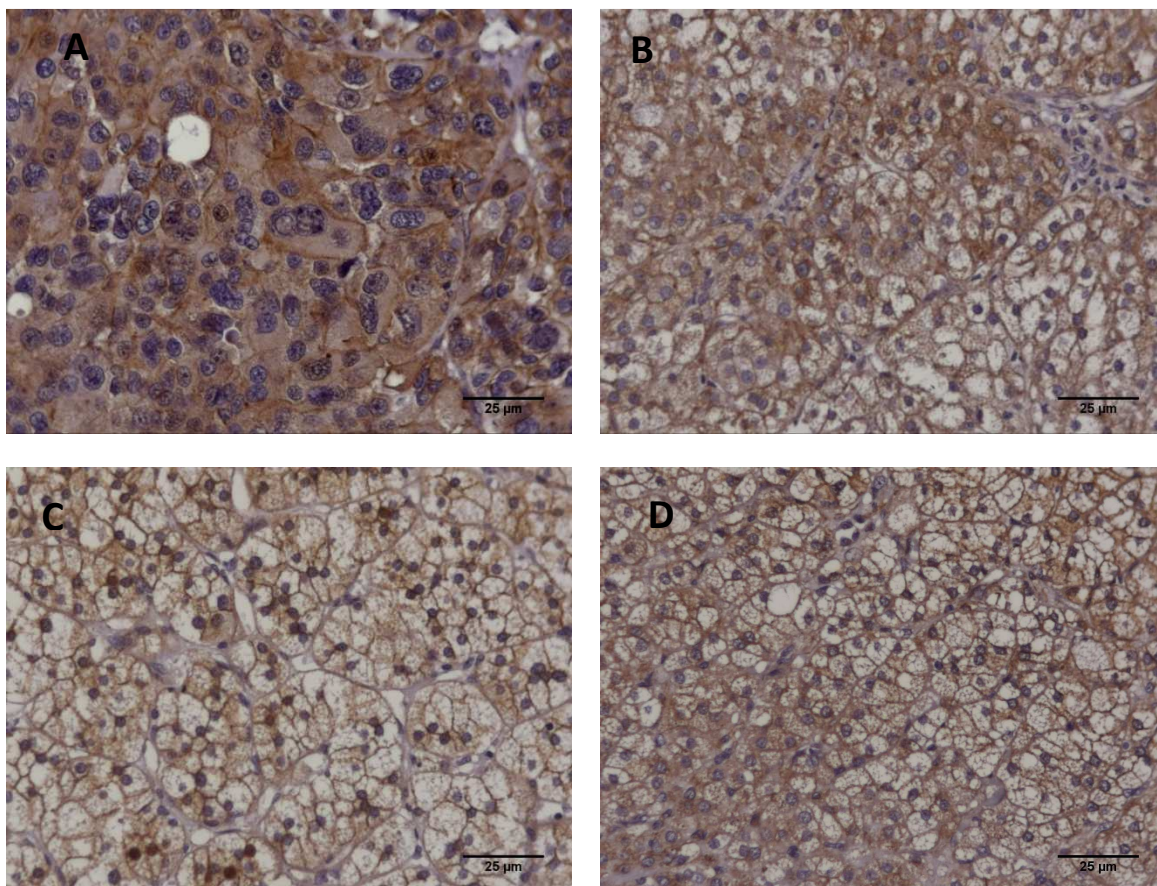


Figura 21 – Fotografias de imunohistoquímica utilizando o marcador β -catenina realizadas em carcinoma adrenocortical (A), adenoma com síndrome de Cushing (B), adenoma incidentaloma (C) e supra-renal normal (D) (400x)

Para a β -catenina, a avaliação da marcação não foi avaliada utilizando o software, uma vez que a marcação não se apresentava uniforme. Verificou-se que a marcação estava distribuída na membrana, na membrana e citoplasma e na membrana, citoplasma e núcleos, a % de casos de cada grupo com cada uma destas distribuições está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição das amostras de acordo com a localização da β -catenina

Localização Amostras	Só Membrana	Membrana + citoplasma	Membrana + citoplasma+ núcleos
Carcinomas	27.27 % (n=3)	54.54 % (n=6)	9.09 % (n=1)
Adenomas com síndrome de Cushing	0.00% (n=0)	100.00 % (n=7)	0.00 % (n=0)
Adenomas incidentalomas	0.00 % (n=0)	53.85 % (n=7)	46.15 % (n=6)
Supra-renais normais	33.33 % (n=4)	66.67 % (n=8)	0.00 % (n=0)

Utilizando o teste Qui-quadrado verificamos que a distribuição da marcação da β -catenina foi significativamente diferente entre os grupos em estudo ($p < 0.01$).

Verificamos que a marcação em localização anormal (Membrana + citoplasma + núcleos ou membrana + citoplasma) foi encontrada em todos os grupos, sendo que a marcação nos núcleos foi encontrada tanto em adenomas incidentalomas como em carcinomas, sendo que a frequência nos primeiros foi superior (Tabela 3).

5

Capítulo

Discussão Geral e Conclusões

Capítulo 5 - Discussão dos resultados

Os tumores malignos adrenocorticais são raros mas altamente agressivos e com mau prognóstico. Esse prognóstico porém correlaciona-se fortemente com a fase em que são descobertos. Se um tumor for identificado precocemente as possibilidades de cura são muito significativas. Pelo contrário os tumores benignos são comuns e embora sejam sobretudo conhecidos pelas síndromes clínicas que a secreção aumentada das hormonas da supra-renal condicionam, mais frequentemente são não secretores e acabam por ser achados incidentais aquando da realização de exames imagiológicos relacionados com outras doenças abdominais ou torácicas. O diagnóstico dos tumores adrenocorticais é habitualmente realizado através do sistema de Weiss que se baseia unicamente em parâmetros morfológicos relativamente inespecíficos observados aquando do exame anatomo-patológico. O score de Weiss pode portanto ser ambíguo e insuficiente para um diagnóstico diferencial seguro entre adenomas e carcinomas adrenocorticais. Por esse motivo os investigadores tem procurado identificar marcadores moleculares que possam contribuir para o diagnóstico diferencial e identificação precoce dos casos com potencial maligno e simultaneamente esclarecer os mecanismos patogénicos da formação e transformação maligna destes tumores.

O principal objetivo deste trabalho foi procurar um marcador ou uma combinação de vários marcadores associados com a malignidade dos tumores adrenocorticais que pudesse ser utilizado como método auxiliar para o diagnóstico diferencial entre os carcinomas e os adenomas. Procuramos analisar a marcação imunohistoquímica usando um método objetivo e automatizado que permitisse evitar a subjetividade dependente do observador. Seleccionamos um conjunto de marcadores moleculares que têm sido estudados individualmente em diversos estudos e apontados como podendo contribuir para esta distinção mas que sempre foram analisados subjetivamente e cujos resultados foram frequentemente descritos de forma ambígua ou mesma contraditória.

A StAR é uma proteína que participa num passo limitante da síntese de esteroides – o transporte de colesterol para dentro da mitocôndria- esta proteína poderá ter influência na capacidade esteroidogénica dos tumores (Pollack, Furth et al. 1997; Zenkert, Schubert et al. 2000). No presente estudo observamos que a expressão desta proteína foi maior nos adenomas funcionantes quando comparados com os adenomas não funcionantes, como seria de esperar devido ao seu papel na esteroidogénese. Na comparação entre todos os grupos, o grupo das supra-renais normais foi o que apresentou uma maior marcação de StAR, o que pode ser justificado pelo fato da esteroidogénese estar normal neste grupo. Uma vez que o grupo dos carcinomas é um grupo heterogéneo incluindo tumores secretores com síndrome clínico, tumores secretores de precursores hormonais

não produzindo síndrome clínico e tumores não secretores e o número de amostras de cada uma das situações era escasso não podemos confirmar se a relação que se encontrou entre os adenomas se verificava dentro do grupo dos carcinomas. No entanto, podemos constatar que em comparação com o grupo dos normais, a esteroidogénese parece estar alterada no grupo dos carcinomas. Para este dado pode ter contribuído o fato do grupo de carcinomas incluir mais carcinomas não funcionantes do que funcionantes ou em alternativa a circunstância dos carcinomas em geral, possuírem uma expressão diminuída da StAR e portanto uma esteroidogénese diminuída. Quando se comparou os carcinomas e a totalidade dos adenomas em simultâneo ou os vários tipos de adenomas, observamos diferenças significativas sobretudo entre carcinomas e adenomas com síndrome de Cushing. Através da curva ROC verificamos a acuidade deste marcador para o diagnóstico de carcinomas em relação aos adenomas funcionantes com síndrome de Cushing que a percentagem de área marcada tem um maior poder discriminativo do que o *score* de QIC. A área sob a curva ROC entre estes dois grupos foi de 0.85 usando a % de área marcada, sugerindo tratar-se de um bom marcador para o diagnóstico diferencial entre adenomas com síndrome de Cushing e carcinomas.

O IGF2 é um fator de crescimento apontado por vários autores como sendo um bom marcador no diagnóstico diferencial entre de adenomas e carcinomas adrenocorticais (Gicquel, Boulle et al. 2001; Schmitt, Saremaslani et al. 2006; Soon, Gill et al. 2009). Quando comparamos todos os grupos em estudo verificamos que os carcinomas e os adenomas funcionantes com síndrome de Cushing, foram os que apresentaram uma maior percentagem de área marcada e de *score* de QIC em comparação com os outros grupos. Schmitt *et al* observaram que os adenomas funcionantes com síndrome de Cushing eram negativos para este marcador (Schmitt, Saremaslani et al. 2006), enquanto no presente estudo obtivemos resultados diferentes uma vez que este tipo de adenomas apresentou uma percentagem de área marcada e um *score* de QIC semelhante aos carcinomas, o que pode ser explicado pelas diferenças no método de contagem utilizado; manual com recurso a contagem de células marcadas no estudo anterior, enquanto no presente estudo foi utilizada uma contagem computadorizada com recurso a um software específico que determina a percentagem de área marcada e a sua intensidade. Pode ter-se verificado o efeito da subjetividade nos estudos de Schmitt *et al* de 2006, enquanto as observações documentadas no presente estudo sustentam a necessidade de realizar estudos complementares noutra população para confirmar estes resultados. Soon *et al* obteve uma área sob a curva de 0.863 para o diagnóstico de carcinomas, no entanto, uma vez que apenas 13% dos adenomas eram funcionantes enquanto no presente estudo 37% dos adenomas eram funcionantes, verificamos que a expressão de IGF2

estava aumentada nos adenomas funcionantes em comparação com os adenomas não funcionantes, o que poderá explicar o motivo pelo qual no presente estudo obtivemos uma área sob a curva inferior (0.75). De referir que quando a curva ROC foi realizada para comparar carcinomas e adenomas incidentais obtivemos uma área sob a curva de 1, para o valor de corte (*cut-off*) de percentagem de marcação de 27.11, o que corresponde a uma especificidade e sensibilidade de 100%. Assim sendo, este marcador parece ser um marcador ideal para o diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas não funcionantes.

Uma outra proteína que tem sido amplamente estudada no âmbito dos tumores malignos é a p53. O p53 é considerado um gene supressor tumoral porque a proteína resultante promove a reparação do DNA nuclear (He, Siddik et al. 2005; Fassnacht, Libe et al. 2011). Essa proteína é degradada rapidamente em situações normais e como tal não é detetada por imunohistoquímica em tecidos normais. Quando mutado, a proteína perde a sua função não levando a cabo a reparação dos danos do DNA e acumula-se no núcleo (Moll and Petrenko 2003). Uma vez que não é degradada pode então ser detetada por imunohistoquímica. Além de analisarmos a expressão desta proteína, analisamos também a expressão de outras proteínas envolvidas na sua via, a MDM2 uma vez que para além das mutações no gene p53, também a proteína MDM2 tem a capacidade de inativar a proteína p53 (Moll and Petrenko 2003; Manfredi 2010); e a p21, uma vez que esta é ativada pela proteína p53, em caso de danos no DNA com consequente paragem do ciclo celular (He, Siddik et al. 2005).

Mutações no gene supressor tumoral p53 inativam a proteína p53 e permitem a progressão do ciclo celular mesmo em caso de danos no DNA, permitindo o desenvolvimento neoplásico (Suzuki and Matsubara 2011). Estudos anteriores demonstraram que as mutações no gene p53 são raras nos tumores benignos adrenocorticais, estando apenas presentes nos carcinomas (Reincke, Karl et al. 1994). Estudos imunohistoquímicos nestes tipos de tumores demonstraram uma expressão aumentada da proteína p53 em carcinomas quando comparados com adenomas (Reincke, Karl et al. 1994; Bernini, Moretti et al. 2002; Babinska, Sworczak et al. 2008), no entanto outros estudos realizados não observaram essa diferença (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002; Stojadinovic, Brennan et al. 2003). O nosso estudo corrobora com estes últimos resultados, uma vez que embora tanto a percentagem de área marcada como o score de QIC fossem superiores nos carcinomas, a diferença não foi estatisticamente significativa. Isto poderá dever-se à natureza heterogénea dos carcinomas, e portanto haver carcinomas onde o gene p53 se apresente mutado e outros em que a forma selvagem desta proteína possuía uma certa instabilidade com perda de função sem no entanto ter um tempo de semi-vida elevado e portanto a sua expressão

não estar aumentados. Assim, de acordo com os nossos resultados esta proteína não parece ser um bom marcador para o diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas. Além das mutações que levam a inativação da proteína p53, a proteína MDM2 liga-se à forma mutada da p53 e à forma selvagem inativando ambas as proteínas (Manfredi 2010). A MDM2 aparece aumentada em vários tumores e parece estar associada com um pior prognóstico (Onel and Cordon-Cardo 2004). No presente estudo, pelo contrário, observamos que tanto a percentagem de área marcada como o *score* de QIC foram significativamente superiores no tecido normal quando comparados com os carcinomas e adenomas incidentalomas. Quanto à comparação entre os adenomas totais e os carcinomas não se observaram diferenças significativas. Resultados semelhantes aos que foram encontrados neste estudo, já tinham sido descritos anteriormente através da contagem do número de núcleos marcados em tumores e em tecido normal (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002; Stojadinovic, Brennan et al. 2003). Assim, nos tumores adrenocorticais esta proteína parece não estar associada a malignidade, ao contrário do que acontece noutros tipos de tumores, e portanto não parece ter utilidade no diagnóstico diferencial entre carcinomas adrenocorticais e tumores benignos (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002; Onel and Cordon-Cardo 2004).

A proteína p21 é ativada pela proteína p53 em caso de danos no DNA, como tal a expressão aumentada desta proteína conduz à paragem do ciclo celular de células tumorais em proliferação. Neste estudo, esta proteína parece estar pouco expressa em todos os grupos estudados (percentagem área marcada inferior a 2% em todos os grupos) e não houve diferenças significativas entre os diferentes tipos tumorais. Estudos prévios obtiveram resultados diferentes dos que agora apresentamos, Stojadinovic *et al* demonstraram que a expressão da proteína p21 estava aumentada em carcinomas quando comparada com o tecido normal (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002). No entanto, quando compararam carcinomas e adenomas não encontraram diferenças significativas (Stojadinovic, Brennan et al. 2003). Outro estudo, encontrou uma expressão significativamente maior em carcinomas quando comparados com adenomas (Babinska, Sworzak et al. 2008). Devido aos resultados não consensuais observados para esta proteína, esta não parece ser útil para o diagnóstico diferencial de carcinomas e adenomas.

Assim, nenhuma das proteínas associadas com a via do p53 estudadas neste estudo parece estar associadas com a benignidade/malignidade dos tumores adrenocorticais e portanto contribuir para a acuidade do diagnóstico dos carcinomas.

A proteína p27, tal como a p21, é um inibidor das CDKs, e portanto em situação de danos de DNA verifica-se um aumento da expressão desta proteína para possibilitar a paragem do ciclo celular até à respetiva reparação do DNA. Neste estudo verificou-se

que a percentagem área marcada foi significativamente maior nos carcinomas quando comparados com os restantes grupos. Estudos anteriores que estudaram a expressão desta proteína em tumores adrenocorticais não observaram diferenças significativas nem entre carcinomas e o tecido normal nem entre carcinomas e adenomas (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002; Stojadinovic, Brennan et al. 2003). No presente estudo, observamos que os carcinomas apresentavam uma expressão desta proteína maior do que os adenomas, tanto na percentagem de área marcada, como no *score* de QIC. Esta diferença também se manteve quando os adenomas foram comparados individualmente segundo a funcionalidade com os carcinomas. O facto da expressão da proteína p27 estar aumentada nos carcinomas poderá ser explicada pela presença de possíveis danos no DNA das células e portanto o aumento da expressão desta proteína ser uma resposta de defesa na tentativa da paragem do ciclo celular. No entanto, este aumento poderá ser insuficiente para parar o ciclo celular por eventual deficiência de outras proteínas envolvidas no progresso do ciclo celular. Ao realizamos a curva ROC para se verificar a utilidade deste marcador para o diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas, observamos uma área sob a curva de 0.92 quando usamos a percentagem de área marcada e uma área sob a curva de 0.91 quando usamos o *score* de QIC. Assim, esta proteína parece ser útil no diagnóstico diferencial entre adenomas e carcinomas.

No presente estudo, a expressão da ciclina D1 foi muito baixa em todos os tipos de tecidos avaliados (percentagem de área marcada <1.50%). O mesmo já tinha sido documentado anteriormente não só na glândula adrenal mas também outros tecidos endócrinos como a tiroide e paratiroide (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002; Stojadinovic, Brennan et al. 2003; Stojadinovic, Hoos et al. 2003). Apesar da expressão desta proteína ser geralmente baixa, observamos uma expressão maior nos carcinomas quando comparados com os adenomas, resultados compatíveis com uma maior proliferação celular. No entanto esta observação não foi constante em todos os carcinomas. Através das curvas ROC observamos uma área sob a curva de 0.75 usando a percentagem de área marcada e uma área sob a curva de 0.74 usando o *score* de QIC no diagnóstico entre carcinomas e adenomas. A análise da curva ROC revelou uma área sob a curva para a percentagem de área marcada de 0.78 e uma área sob a curva de 0.77 usando o *score* de QIC, para o diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas não funcionantes. Todas estas curvas ROC demonstraram assim ser apenas razoáveis uma vez que o valor da área sob a curva é inferior a 0.80 e portanto este marcador não pode ser considerado útil como auxiliar para o diagnóstico de carcinomas.

Na avaliação da expressão do marcador de proliferação celular, Ki-67, observamos que a proliferação celular nos carcinomas foi significativamente maior quando comparada com os adenomas e o tecido normal. Estudos anteriores obtiveram resultados

semelhantes e propuseram a utilidade deste marcador para o diagnóstico de carcinomas (Stojadinovic, Ghossein et al. 2002; Stojadinovic, Brennan et al. 2003; Schmitt, Saremaslani et al. 2006; Soon, Gill et al. 2009). Através da análise da curva ROC obtivemos uma área sob a curva de 0.94 para a percentagem de área marcada e uma área sob a curva de 0.97 para o score de QIC. Resultados semelhantes foram obtidos por Soon *et al*, sendo que este estudo obteve uma área sob a curva de 0.94 (Soon, Gill et al. 2009). Assim, devido ao consenso entre todos os estudos realizados para este marcador em tumores adrenocorticais, este marcador parece ser ideal no diagnóstico diferencial de carcinomas adrenocorticais.

Neste estudo, não foi encontrada a expressão da proteína de adesão celular E-caderina em nenhum tecido estudado. Resultados semelhantes foram observados anteriormente por Khorram-Manesh *et al* (Khorram-Manesh, Ahlman et al. 2002). Assim, apesar de noutros tumores, a sua perda de expressão estar associada com a transição de adenomas bem diferenciados para carcinomas invasivos (Navarro, Gomez et al. 1991), na glândula supra-renal esta não parece ser importante nem para a função da supra-renal normal nem para o desenvolvimento de tumores adrenocorticais.

A β -catenina é um componente do complexo de adesão caderina-catenina, e ainda um coativador transcripcional na via de sinalização Wnt. Quando esta via está ativa, a β -catenina livre, não é ubiquitinada, acumula-se no citoplasma e é translocada para o núcleo onde se liga ao LEF/Tcf ativando genes de transcrição que podem estar associados à tumorigénese (Kikuchi 2003; Tissier, Cavard et al. 2005; Howard, Deroo et al. 2011). Tissier *et al* estudou a expressão desta proteína em tumores adrenocorticais e verificou que a localização anormal da β -catenina (presença de marcação no citoplasma e/ou nos núcleos) era mais frequente nos carcinomas adrenocorticais do que nos adenomas, podendo portanto contribuir para a malignidade dos tumores adrenocorticais (Tissier, Cavard et al. 2005; Tissier 2010). No entanto, no presente estudo, verificamos que localização anormal da β -catenina (presença de marcação no citoplasma e ou nos núcleos) encontra-se tanto em carcinomas como em adenomas, sendo que a proporção de adenomas incidentalomas com marcação nuclear foi superior do que nos carcinomas adrenocorticais, e portanto não sugerindo que a expressão desta proteína esteja associada à malignidade do tumor.

Uma das principais vantagens do presente estudo foi a utilização de um método de avaliação da marcação computadorizado. A utilização do software ImageJ permitiu assim retirar a subjetividade do observador e demonstrou ser apropriado para este tipo de estudos e poderá então ser estendido a outros marcadores que continuam a ser sugeridos por estudos genómicos e até ser usado na prática clínica.

A percentagem de área marcada demonstrou ser um melhor parâmetro para o diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas do que o *score* de QIC para todos os marcadores, com exceção do Ki-67, assim a intensidade da marcação não parece acrescentar valor informativo relevante para ser usado em diagnóstico.

Dos marcadores estudados, o IGF2, o p27, a ciclina D1 e o Ki-67 foram os marcadores cuja percentagem de área marcada e *score* de QIC foi significativamente maior nos carcinomas quando comparados com todos os adenomas e com os adenomas incidentalomas. Comparando os carcinomas com os adenomas funcionantes com síndrome de Cushing, foram observadas diferenças significativas na percentagem de área marcada e *score* de QIC para o p27 e Ki-67, cuja marcação se encontrava aumentada e para a StAR cuja marcação foi menor nos carcinomas. O p27 e o Ki-67 foram os marcadores que demonstraram maior poder discriminativo no diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas, enquanto o IGF2 e a StAR apenas demonstraram ser úteis no diagnóstico diferencial entre carcinomas vs adenomas não funcionantes e carcinomas vs adenomas com síndrome de Cushing, respetivamente.

Conclusão: O uso dos marcadores imunocitoquímicos, IGF2, p27, ciclina D1, Ki-67 e StAR e ainda o recurso a uma ferramenta de análise morfométrica computadorizada para quantificar a sua expressão podem ser um importante método auxiliar no diagnóstico diferencial dos tumores adrenocorticais. Os resultados obtidos neste estudo, podem no futuro, contribuir para orientar a terapêutica no sentido de melhor adequação às diversas situações.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Abukhdeir, A. M. and B. H. Park (2008). "P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance." Expert Rev Mol Med **10**: e19.
- Alkarain, A. and J. Slingerland (2004). "Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer." Breast Cancer Res **6**(1): 13-21.
- Allolio, B. and M. Fassnacht (2006). "Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update." J Clin Endocrinol Metab **91**(6): 2027-2037.
- Babinska, A., K. Sworczak, et al. (2008). "The role of immunohistochemistry in histopathological diagnostics of clinically "silent" incidentally detected adrenal masses." Exp Clin Endocrinol Diabetes **116**(4): 246-251.
- Bernini, G. P., A. Moretti, et al. (2002). "Apoptosis control and proliferation marker in human normal and neoplastic adrenocortical tissues." Br J Cancer **86**(10): 1561-1565.
- Beuschlein, F., M. Fassnacht, et al. (2001). "ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation." Eur J Endocrinol **144**(3): 199-206.
- Bornstein, S. R., C. A. Stratakis, et al. (1999). "Adrenocortical tumors: recent advances in basic concepts and clinical management." Ann Intern Med **130**(9): 759-771.
- Boulle, N., A. Logie, et al. (1998). "Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors." J Clin Endocrinol Metab **83**(5): 1713-1720.
- Davenport, C., A. Liew, et al. (2011). "The prevalence of adrenal incidentaloma in routine clinical practice." Endocrine **40**(1): 80-83.
- DeVita, V. T., T. S. Lawrence, et al. (2008). DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Ewen, M. E. and J. Lamb (2004). "The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis." Trends Mol Med **10**(4): 158-162.
- Ewing, G. P. and L. W. Goff (2010). "The insulin-like growth factor signaling pathway as a target for treatment of colorectal carcinoma." Clin Colorectal Cancer **9**(4): 219-223.
- Fassnacht, M., R. Libe, et al. (2011). "Adrenocortical carcinoma: a clinician's update." Nat Rev Endocrinol **7**(6): 323-335.
- Galac, S., M. M. Kool, et al. (2010). "Expression of the ACTH receptor, steroidogenic acute regulatory protein, and steroidogenic enzymes in canine cortisol-secreting adrenocortical tumors." Domest Anim Endocrinol **39**(4): 259-267.
- Gartner, L. P. and J. L. Hiatt (2007). Color Textbook of Histology.
- Gicquel, C., N. Boulle, et al. (2001). "[Involvement of the IGF system in the pathogenesis of adrenocortical tumors]." Ann Endocrinol (Paris) **62**(2): 189-192.

- Gupta, D., V. Shidham, et al. (2001). "Value of topoisomerase II alpha, MIB-1, p53, E-cadherin, retinoblastoma gene protein product, and HER-2/neu immunohistochemical expression for the prediction of biologic behavior in adrenocortical neoplasms." Appl Immunohistochem Mol Morphol **9**(3): 215-221.
- Harari, A. and W. B. Inabnet, 3rd (2011). "Malignant pheochromocytoma: a review." Am J Surg **201**(5): 700-708.
- He, G., Z. H. Siddik, et al. (2005). "Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities." Oncogene **24**(18): 2929-2943.
- Howard, S., T. Deroo, et al. (2011). "A positive role of cadherin in Wnt/beta-catenin signalling during epithelial-mesenchymal transition." PLoS One **6**(8): e23899.
- Jain, M., S. Kapoor, et al. (2010). "Weiss criteria in large adrenocortical tumors: a validation study." Indian J Pathol Microbiol **53**(2): 222-226.
- Kamio, T., K. Shigematsu, et al. (1991). "Immunoreactivity and receptor expression of insulinlike growth factor I and insulin in human adrenal tumors. An immunohistochemical study of 94 cases." Am J Pathol **138**(1): 83-91.
- Kaneda, A., C. J. Wang, et al. (2007). "Enhanced sensitivity to IGF-II signaling links loss of imprinting of IGF2 to increased cell proliferation and tumor risk." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(52): 20926-20931.
- Khorram-Manesh, A., H. Ahlman, et al. (2002). "N-cadherin expression in adrenal tumors: upregulation in malignant pheochromocytoma and downregulation in adrenocortical carcinoma." Endocr Pathol **13**(2): 99-110.
- Kikuchi, A. (2003). "Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway." Cancer Sci **94**(3): 225-229.
- Kirschner, L. S. (2006). "Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope." J Clin Endocrinol Metab **91**(1): 14-21.
- Lahera Vargas, M. and C. V. da Costa (2009). "[Prevalence, etiology and clinical findings of Cushing's syndrome]." Endocrinol Nutr **56**(1): 32-39.
- Lala, D. S., D. A. Rice, et al. (1992). "Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I." Mol Endocrinol **6**(8): 1249-1258.
- Liu, J., P. Heikkila, et al. (1996). "Expression of the steroidogenic acute regulatory protein mRNA in adrenal tumors and cultured adrenal cells." J Endocrinol **150**(1): 43-50.
- Manfredi, J. J. (2010). "The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor." Genes Dev **24**(15): 1580-1589.
- Moll, U. M. and O. Petrenko (2003). "The MDM2-p53 interaction." Mol Cancer Res **1**(14): 1001-1008.

- Navarro, P., M. Gomez, et al. (1991). "A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis." J Cell Biol **115**(2): 517-533.
- Onel, K. and C. Cordon-Cardo (2004). "MDM2 and prognosis." Mol Cancer Res **2**(1): 1-8.
- Pecina-Slaus, N. (2003). "Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells." Cancer Cell Int **3**(1): 17.
- Pollack, S. E., E. E. Furth, et al. (1997). "Localization of the steroidogenic acute regulatory protein in human tissues." J Clin Endocrinol Metab **82**(12): 4243-4251.
- Reincke, M., M. Karl, et al. (1994). "p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies." J Clin Endocrinol Metab **78**(3): 790-794.
- Sahakitrungruang, T., R. E. Soccio, et al. (2010). "Clinical, genetic, and functional characterization of four patients carrying partial loss-of-function mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)." J Clin Endocrinol Metab **95**(7): 3352-3359.
- Sbiera, S., S. Schnull, et al. (2010). "High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors." J Clin Endocrinol Metab **95**(10): E161-171.
- Schmitt, A., P. Saremaslani, et al. (2006). "IGFII and MIB1 immunohistochemistry is helpful for the differentiation of benign from malignant adrenocortical tumours." Histopathology **49**(3): 298-307.
- Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiol **182**(3): 311-322.
- Serres, M. P., U. Kossatz, et al. (2012). "p27(Kip1) controls cytokinesis via the regulation of citron kinase activation." J Clin Invest **122**(3): 844-858.
- Soon, P. S., A. J. Gill, et al. (2009). "Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas." Endocr Relat Cancer **16**(2): 573-583.
- Stigliano, A., S. Caiola, et al. (2002). "Mutational analysis of StAR gene in adrenal tumors." Int J Cancer **97**(3): 357-360.
- Stocco, D. M., X. Wang, et al. (2005). "Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought." Mol Endocrinol **19**(11): 2647-2659.
- Stojadinovic, A., M. F. Brennan, et al. (2003). "Adrenocortical adenoma and carcinoma: histopathological and molecular comparative analysis." Mod Pathol **16**(8): 742-751.

- Stojadinovic, A., R. A. Ghossein, et al. (2002). "Adrenocortical carcinoma: clinical, morphologic, and molecular characterization." J Clin Oncol **20**(4): 941-950.
- Stojadinovic, A., A. Hoos, et al. (2003). "Parathyroid neoplasms: clinical, histopathological, and tissue microarray-based molecular analysis." Hum Pathol **34**(1): 54-64.
- Suzuki, K. and H. Matsubara (2011). "Recent advances in p53 research and cancer treatment." J Biomed Biotechnol **2011**: 978312.
- Tissier, F. (2010). "Classification of adrenal cortical tumors: what limits for the pathological approach?" Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **24**(6): 877-885.
- Tissier, F., C. Cavard, et al. (2005). "Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors." Cancer Res **65**(17): 7622-7627.
- Zenkert, S., B. Schubert, et al. (2000). "Steroidogenic acute regulatory protein mRNA expression in adrenal tumours." Eur J Endocrinol **142**(3): 294-299.