TAMAYA CASTRO RIBEIRO

**Análise do número de cópias dos genes *IGF1R*, *SF1*
e *FGFR4* em tumores adrenocorticais de crianças e
adultos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para a
obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Ana Claudia Latrônico Xavier

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro, Tamaya Castro

Análise do número de cópias dos genes *IGF1R*, *SF1* e *FGFR4* em tumores
adrenocorticais de crianças e adultos / Tamaya Castro Ribeiro. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Ana Claudia Latrônico Xavier.

Descritores: 1.Neoplasias do córtex-supra-renal 2.Amplificação de genes
3.Receptor IGF tipo 1 4.Fator esteroideogênico 1 5.Receptores de fator de crescimento
de fibroblastos

USP/FM/DBD-283/10

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM - 42 da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): bolsa de mestrado 08/51618-6.

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais, Reine e Eva, pelo amor e incentivo constante a todos os meus objetivos.

Agradecimientos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por sua presença em minha vida, e por permitir que eu alcance os meus ideais e me dar forças para continuar.

Aos meus pais, Reine e Eva, que sempre foram muito presentes em todas as minhas escolhas e foram essenciais para que eu seguisse em frente. Muito obrigada pelo apoio e amor incondicional sempre! À minha irmã Alessa que também sempre incentivou meus objetivos.

Ao meu namorado Gabriel que de uma amizade se tornou meu grande companheiro. Obrigada por seu carinho e por sempre estar disposto a me ouvir e nunca me deixar desanimar.

À minha orientadora, Dra. Ana Claudia Latronico, por ter me aceitado como aluna e me ensinar a fazer pesquisa. Obrigada por todos os momentos de conversa e aprendizado.

À Dra. Berenice pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Ao Alex, por ter me auxiliado com as análises do MLPA e estatística e por ter se tornado um companheiro de pesquisa do *IGF1R*.

A Cândida pela ajuda na organização da casuística e qualificação.

À Miriam por ser sempre tão paciente e nos ajudar no laboratório.

Às secretárias do laboratório Nilda, Cris e Ana que sempre estão disponíveis para nos auxiliar com as burocracias.

A Fran e a Cris por deixarem todo o material pronto para uso e preparação de alíquotas. À Cidinha pela compra de materiais.

Ao Antônio por suas sugestões sempre pertinentes. Ao Madson e à Luciana Brito por terem cedido os dados de expressão gênica.

Às amigas Aline, Beatriz, Ericka, Mariana e Mariza por tornarem o trabalho mais agradável e por sempre me auxiliarem nas questões pessoais e profissionais.

À minha amiga Renata pelo convívio e paciência. Muito obrigada pelo apoio quando me mudei para São Paulo e que continua até hoje. À Nathalia que mesmo longe nunca deixa de ser presente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Finalmente, agradeço todos os pacientes que participaram da nossa pesquisa.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Resumo

Abstract

1	Introdução	1
1.1	Tumores adrenocorticais	2
1.2	Tumorigênese adrenocortical	5
1.3	Sistema IGF	10
1.4	Fator esteroideogênico 1	17
1.5	Os fatores de crescimento de fibroblastos e seus receptores	19
2	Objetivos	25
3	Métodos	27
3.1	Pacientes.....	28
3.2	Estudos moleculares	29
3.2.1	Extração de DNA genômico	29
3.2.2	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>	30
3.2.3	PCR em tempo real - <i>SYBR Green</i>	35
3.2.4	Análise estatística	37
4	Resultados	39
4.1	<i>IGF1R</i>	40
4.2	<i>SF1</i>	42
4.3	<i>FGFR4</i>	45

5	Discussão.....	48
5.1	<i>IGF1R</i>	49
5.2	<i>SF1</i>	55
5.3	<i>FGFR4</i>	59
6	Conclusões	63
7	Anexos.....	65
8	Referências	79

Lista de Abreviaturas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AKT	Proteína quinase B
Arg	Aminoácido arginina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FGFR	Receptor dos fatores de crescimento de fibroblastos
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
Gly	Aminoácido glicina
His	Aminoácido histidina
HSGAG	Heparina sulfato glicosaminoglicana
Ig	Imunoglobulina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	Proteína que se liga aos IGFs
IGF-R	Receptor dos fatores de crescimento semelhantes à insulina
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato de receptor de insulina
M6P	Manose-6-fosfato
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MLPA	Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)
mTOR	Via alvo da rapamicina mamífera
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PLCγ	Fosfolipase Cγ
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro

SUMO	Proteínas pequenas modificadoras semelhantes à ubiquitina (<i>small ubiquitin-like modifier</i>)
TMA	Micromatriz tecidual (<i>Tissue microarray</i>)

Lista de Figuras

Figura 1 -	Representação esquemática das alterações no <i>locus</i> 11p15 em tumores adrenocorticais	9
Figura 2 -	Sistema IGF	11
Figura 3 -	Vias de sinalização de IGF-1R	13
Figura 4 -	Estrutura gênica e protéica de SF-1	18
Figura 5 -	Representação da estrutura dos receptores dos fatores de crescimento de fibroblastos	21
Figura 6 -	Isoformas de FGFRs	21
Figura 7 -	Vias de sinalização de FGFRs	23
Figura 8 -	Padrão de eletroforese de <i>IGF1R</i> em tecido adrenal normal.....	31
Figura 9 -	Padrão de eletroforese de <i>SF1</i> em tecido adrenal normal.....	31
Figura 10 -	Padrão de eletroforese de <i>FGFR4</i> em tecido adrenal normal	32
Figura 11 -	Fases da reação de MLPA	34
Figura 12 -	Fórmulas utilizadas em planilhas Excel para análise do número de cópias das amostras tumorais.....	35

Figura 13 -	Representação dos resultados de MLPA obtidos a partir de DNA de uma glândula suprarrenal normal e de um carcinoma adrenocortical com amplificação dos genes <i>IGF1R</i> e <i>IGFBP3</i>	41
Figura 14 -	Representação dos resultados de MLPA obtidos a partir de DNA de uma glândula suprarrenal normal e de um carcinoma adrenocortical com amplificação dos genes <i>FGFR4</i> e <i>NSD1</i>	41
Figura 15 -	Representação dos resultados de MLPA obtidos a partir de DNA de uma glândula suprarrenal normal e de um tumor adrenocortical com amplificação do gene <i>SF1</i>	43
Figura 16 -	Representação dos resultados de MLPA obtidos a partir de DNA de uma glândula suprarrenal normal e de um tumor adrenocortical com amplificação do locus <i>FGFR4</i>	46

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Critérios histopatológicos de Weiss	3
Tabela 2 -	Sistema de MacFarlane modificado por Sullivan	4
Tabela 3 -	Características clínicas de sessenta e quatro pacientes com tumor adrenocortical	29
Tabela 4 -	Ensaio utilizado na avaliação do número de cópias dos genes <i>IGF1R</i> , <i>SF1</i> e <i>FGFR4</i>	31
Tabela 5 -	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na investigação do número de cópias dos genes <i>IGF1R</i> e <i>SF1</i> por PCR em tempo real - <i>SYBR Green</i>	36
Tabela 6 -	Amplificação de múltiplos genes em um carcinoma adrenocortical.....	42
Tabela 7 -	Características clínicas e moleculares de 10 tumores adrenocorticais com aumento no número de cópias de <i>SF1</i>	44
Tabela 8 -	Características clínicas e moleculares de 12 tumores adrenocorticais com aumento no número de cópias do <i>locus FGFR4</i>	47
Tabela 9 -	Estudos de hibridização genômica comparativa em tumores adrenocorticais	53

Lista de Anexos

Anexo 1	Dados clínicos e moleculares de sessenta e quatro pacientes com tumor adrenocortical 66
Anexo 2A	Lista das sondas presentes no ensaio de MLPA P217 IGF1R 69
Anexo 2B	Lista das sondas presentes no ensaio de MLPA P185-B1 <i>Intersex</i> 70
Anexo 2C	Lista das sondas presentes no ensaio de MLPA P026-C1 Sotos 71
Anexo 3	Análises imunohistoquímicas de SF-1 em tumores adrenocorticais72
Anexo 4	Artigo publicado 73

Resumo

Ribeiro TC. *Análise do número de cópias dos genes IGF1R, SF1 e FGFR4 em tumores adrenocorticais de crianças e adultos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 94p.

Introdução: Uma elevada incidência de tumores adrenocorticais pediátricos e de adultos é observada nas regiões sul e sudeste do Brasil. Hiperexpressão dos genes *IGF1R*, *SF1* e *FGFR4* tem sido descrita em tumores adrenocorticais. Apesar de hiperexpressão ser um evento comum em diversas neoplasias, ainda não são claros os mecanismos moleculares que seriam responsáveis por essa falha na regulação da expressão. **Objetivos:** Determinar o número de cópias dos genes *IGF1R*, *SF1* e *FGFR4* em tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos. Adicionalmente correlacionaremos os dados de expressão gênica e/ou protéica de *IGF1R*, *SF1* e *FGFR4* com o diagnóstico histológico e evolutivo dos tumores adrenocorticais. **Pacientes e métodos:** Sessenta e quatro pacientes com tumores adrenocorticais foram selecionados para o estudo. Todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e tratamento cirúrgico. Oito glândulas adrenais normais obtidas em cirurgias renais ou autópsias foram utilizadas como controles. DNA genômico extraído dos tecidos normais e tumorais da glândula suprarrenal foram utilizados como substrato nas reações de *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) com o intuito de se determinar o número de cópias dos genes *IGF1R*, *SF1* e *FGFR4*. PCR em tempo real (*SYBR Green*) foi realizado para confirmar os dados de MLPA para os genes *IGF1R* e *SF1*. **Resultados:** Amplificação do gene *IGF1R* foi detectada por MLPA e confirmada por PCR em tempo real *SYBR Green* em apenas um carcinoma adrenocortical. Adicionalmente, amplificação gênica de outros *loci* (*IGFBP3*, *FGFR4* e *NSD1*) bem como de sondas controles foi observada, sugerindo uma condição aneuplóide neste tumor maligno. Amplificação de *SF1* foi detectada em 10 tumores adrenocorticais (8 pediátricos e 2 de adultos). Os valores de expressão gênica foram significativamente maiores em tumores associados com amplificação gênica quando comparados com tumores sem amplificação. Além disso, imunorreatividade para SF-1 foi detectada nos tumores com aumento no número de cópias. Doze amplificações do *locus FGFR4* (3 pediátricos e 9 de adultos) foram demonstradas por MLPA. A amplificação do *locus FGFR4* e hiperexpressão deste gene foram significativamente mais relacionados a carcinomas. **Conclusões:** Amplificação do gene *IGF1R* é um evento raro nos tumores adrenocorticais pediátricos e de adultos. A hiperexpressão de *IGF1R* em tumores adrenocorticais pediátricos não foi secundária à amplificação gênica. Amplificação do gene *SF1* foi evidenciada predominantemente em tumores adrenocorticais pediátricos e se correlacionou com hiperexpressão gênica e protéica. Amplificação do *locus FGFR4* foi demonstrada predominantemente em tumores adrenocorticais malignos de adultos. Amplificação de oncogenes representa um mecanismo molecular relevante na tumorigênese adrenocortical.

Descritores: 1.Neoplasias do córtex-suprarrenal 2.Amplificação de genes
3.Receptor IGF tipo 1 4.Fator esteroideogênico 1 5.Receptores de fator de
crescimento de fibroblastos

Abstract

Ribeiro TC. *Analysis of copy number variations of IGF1R, SF1 and FGFR4 genes in adrenocortical tumors from children and adults* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 94p.

Introduction: A high incidence of adrenocortical tumors in children and adults has been observed in Southern and Southeastern regions of Brazil. Overexpression of *IGF1R*, *SF1* and *FGFR4* genes have been described in adrenocortical tumors. Despite of overexpression be a common event in several neoplasias, the molecular mechanism implicated in this upregulation remains unknown. **Objectives:** To determine the copy number of *IGF1R*, *SF1* and *FGFR4* genes in pediatric and adult adrenocortical tumors. Additionally, correlate with *IGF1R*, *SF1* and *FGFR4* gene and/or protein expression data as well as with the histological diagnosis and evolution of the adrenocortical tumors. **Patients and methods:** Sixty and four patients with adrenocortical tumors were selected for this study. All patients were submitted to clinical evaluation and surgical treatment. Eight normal adrenal glands obtained in renal surgery or autopsies were used as controls. The MLPA reactions were performed with the DNA extracted from adrenal gland tissues in order to determine the copy number of *IGF1R*, *SF1* and *FGFR4* genes. SYBR Green real-time PCR was carried out to confirm MLPA data for *IGF1R* and *SF1* genes. **Results:** *IGF1R* amplification was detected by MLPA and confirmed by SYBR green real-time PCR in only one adrenocortical carcinoma. Additionally, other *loci* amplification was detected (*IGFBP3*, *FGFR4* and *NSD1*) as well as for control probes, suggesting aneuploidy in this malignant tumor. *SF1* amplifications were shown in 10 adrenocortical tumors (8 from children and 2 from adults). The *SF1* mRNA levels were significantly higher in adrenocortical tumors associated with increased *SF1* gene copies when compared with adrenocortical tumors without gene amplification. Moreover, all adrenocortical tumors with *SF1* gene amplification showed a strong SF1 staining. Twelve *FGFR4 locus* amplifications (3 from children and 9 from adults) were demonstrated by MLPA. *FGFR4 locus* amplification and overexpression of this gene were significantly more related to carcinomas. **Conclusions:** *IGF1R* amplification is a rare event in adrenocortical tumors and it was not responsible for the *IGF1R* overexpression of pediatric and adult adrenocortical tumors. *SF1* gene amplification was detected predominantly in pediatric adrenocortical tumors and was associated with gene and protein overexpression. *FGFR4 locus* amplification was demonstrated mainly in adult malignant adrenocortical tumors. *FGFR4* amplification and upregulation were more associated to adrenocortical carcinomas. Oncogenes amplification represents an important molecular mechanism in adrenocortical tumorigenesis.

Descriptors: 1. Adrenocortical neoplasias 2. Gene amplification 3. Receptor, IGF Type 1 4. Steroidogenesis Factor 1 5. Receptors, fibroblast growth factor

1 – Introdução

1.1 – Tumores adrenocorticais

Tumores adrenocorticais são relativamente comuns, com uma incidência estimada de 7,3% em autópsias (1). Os adenomas são frequentes e, em sua maioria, são diagnosticados incidentalmente, enquanto que os carcinomas adrenais são raros, com prevalência estimada de 0,5 - 2 casos por milhão de habitantes, correspondendo a 0,02% de todas as neoplasias (2). Nas regiões sul e sudeste do Brasil, uma elevada incidência de tumores adrenocorticais pediátricos e de adultos tem sido observada. A incidência estimada destes tumores em crianças brasileiras provenientes destas regiões é 10 a 15 vezes maior quando comparada aos dados epidemiológicos descritos na literatura (3). Os tumores adrenocorticais podem ocorrer em todas as idades, no entanto, uma distribuição bimodal é observada com um pico na infância, antes dos cinco anos, e outro pico na vida adulta, por volta das quarta e quinta décadas, exibindo predominância no sexo feminino (4).

A frequência de nódulos adrenocorticais correlaciona-se com a idade, 0,2% em indivíduos com idade inferior a 30 anos e 6,9% acima de 70 anos (5). A maior parte destes tumores é constituída de adenomas adrenocorticais não funcionantes (6) e a síndrome endócrina mais comumente associada aos tumores adrenocorticais é a síndrome de Cushing, presente em 30 a 40% dos pacientes com tumores adrenocorticais (7). Virilização acomete de 20 a 30% dos adultos com tumores adrenocorticais funcionantes, sendo a síndrome hormonal mais prevalente entre as crianças afetadas (8). A

combinação da síndrome de Cushing e virilização é observada em 10 a 30 % dos pacientes (7).

O diagnóstico diferencial entre processos benignos e malignos ainda representa um desafio. Em 1984, foram propostos os critérios de Weiss baseados em nove características histopatológicas (Tabela 1) (9). Apesar de apresentar boa acurácia em pacientes adultos, o sistema proposto por Weiss, tem como limitação a não aplicabilidade em tumores pediátricos. Tumores adrenocorticais pediátricos que apresentam prognóstico desfavorável baseado somente em critérios histopatológicos, frequentemente, apresentam evolução clínica favorável (2, 10). Os critérios definitivos de malignidade são a presença de invasão de tecidos e órgãos adjacentes ou metástases.

Tabela 1 – Critérios histopatológicos de Weiss

Características histopatológicas	
1	Altas taxas de mitoses
2	Mitoses atípicas
3	Aumento nuclear
4	Pequena porcentagem de células claras
5	Necrose
6	Arquitetura difusa do tumor
7	Invasão capsular
8	Invasão sinusoidal
9	Invasão venosa

O fator prognóstico mais importante em tumores adrenocorticais pediátricos é o estadiamento proposto por MacFarlane (11) e modificado por Sullivan (12) (Tabela 2). O prognóstico de pacientes com doença localizada (estádios I e II) geralmente é bom, enquanto que os portadores de doença avançada (estádios III e IV) apresentam um prognóstico mais desfavorável (7). A maior parte dos casos encontra-se nos estádios III e IV ao diagnóstico, embora séries mais recentes tenham mostrado tendência a um diagnóstico em estádios mais precoces, provavelmente pela maior disponibilidade e melhor qualidade técnica dos exames de imagem (13). A ressecção tumoral é o melhor tratamento para os carcinomas adrenocorticais em estágios iniciais. No entanto, observa-se um prognóstico desfavorável, com mortalidade de 15 a 47% em cinco anos (7).

Tabela 2 – Sistema de MacFarlane modificado por Sullivan

Estadio	Característica
I	Tumor menor que 5 cm
II	Tumor maior que 5 cm
III	Invasão local
IV	Invasão tumoral de órgãos vizinhos e a distância

1.2 – Tumorigênese adrenocortical

A tumorigênese é um processo com múltiplas etapas. Estas refletem alterações genéticas que desencadeiam a transformação progressiva de células normais em células altamente malignas. O genótipo das células neoplásicas é determinante para a manifestação de seis habilidades essenciais na fisiologia celular: auto-suficiência de sinais proliferativos, insensibilidade a sinais inibitórios, potencial replicativo ilimitado, resistência aos mecanismos de apoptose, angiogênese sustentada, capacidade de invasão e metástases (14).

Apesar de dados relativos à tumorigênese adrenal ainda serem escassos quando comparados a outras neoplasias, nas últimas décadas diversos estudos surgiram com o objetivo de elucidar alterações moleculares envolvidas no processo de tumorigênese adrenocortical.

Análise de clonalidade tumoral é uma etapa importante no estabelecimento da origem celular e identificação de mecanismos relacionados à tumorigênese. Monoclonalidade indica que a progressão tumoral é o resultado final de uma mutação genética intrínseca. Tumores monoclonais resultam de alterações genéticas que conferem vantagens de crescimento à célula inicialmente afetada enquanto que policlonalidade sugere que as células neoplásicas são afetadas por estímulos locais ou sistêmicos comuns, como por exemplo, fatores de crescimento (15). Análises do padrão de inativação do cromossomo X em tecidos femininos heterozigotos demonstraram que os carcinomas adrenocorticais são

constituídos por células monoclonais enquanto que os adenomas podem ser mono ou policlonais (16). A presença de adenomas mono e policlonais poderia ser resultado de diferentes mecanismos patológicos ou diferentes estágios de um processo com múltiplas etapas. A progressão para um tumor monoclonal poderia ser resultado de um primeiro evento que inicia o crescimento de um tumor policlonal ou parcialmente monoclonal com a manutenção de padrões esteróides normais. Um segundo evento seria capaz de oferecer vantagens de crescimento a clones selecionados, com a perda concomitante de funções e padrões secretórios de esteróides alterados (16, 17).

A maioria dos tumores adrenocorticais ocorre de maneira esporádica. No entanto, estes tumores também podem estar associados a síndromes tumorais hereditárias como a síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Beckwith-Wiedemann, neoplasia endócrina múltipla tipo 1, complexo de Carney, polipose adenomatosa familiar e hiperplasia adrenal congênita. Os genes relacionados a estas síndromes também possuem papel relevante na patogênese dos tumores adrenocorticais esporádicos (18).

O supressor tumoral *TP53* (17p13) é o gene mais comumente alterado em neoplasias humanas (19). A proteína p53 atua como fator de transcrição que está relacionado a diversos processos intracelulares que regulam o ciclo celular, promovendo sua parada ou morte celular em resposta a agentes causadores de danos ao DNA, como por exemplo, radiação e vírus (20). Mutações germinativas no *TP53* foram identificadas em 70% das famílias com a síndrome de Li-Fraumeni que é caracterizada

por uma incidência aumentada e em idade precoce de alguns tipos de tumores, como carcinoma de mama, sarcoma, tumores cerebrais e leucemias (21). O carcinoma adrenocortical ocorre em 3,6% dos casos, sendo a manifestação menos frequente (22).

Uma única mutação germinativa do *TP53* foi identificada com alta frequência em tumores adrenocorticais esporádicos de crianças provenientes das regiões sul e sudeste do Brasil (23). Esta variante alélica, localizada no exon 10, resulta na substituição do aminoácido arginina por histidina na posição 337 (p.R337H) do domínio de tetramerização da proteína (23). Estima-se que um em cada dez indivíduos carreadores desta alteração desenvolva carcinoma adrenocortical. A perda de heterozigose do alelo normal ocorre frequentemente, permanecendo apenas o alelo Arg337His (24). Esta mutação foi identificada em 78% das crianças e em 13,5% dos adultos com tumores adrenocorticais (25). A análise de dois marcadores polimórficos intragênicos em pacientes portadores de tumores adrenocorticais com a mutação p.R337H demonstrou a co-segregação de dois alelos distintos com o alelo *TP53* mutado, indicando efeito fundador (26). Esta alteração não provoca redução da função protéica em condições fisiológicas, mas em situações extremas de pH e temperatura ocorre a perda da estabilidade da proteína (27). Hipotetiza-se que os tumores adrenocorticais pediátricos sejam originados a partir de células provenientes da zona fetal, que normalmente apresenta rápida involução após o nascimento às custas de apoptose. Neste processo, atingem-se as

condições de temperatura e pH as quais poderiam favorecer a perda de estabilidade da p53 (27).

O gene *IGF2* codifica um importante fator de crescimento fetal localizado na região 11p15 que está organizada em dois diferentes *clusters*: um domínio telomérico que contém os genes *IGF2* e *H19* (28, 29) e um domínio centromérico que inclui o gene supressor *p57kip2*; relacionado aos mecanismos de controle do ciclo celular (30). *IGF2* sofre *imprinting* materno sendo expresso apenas pelo alelo paterno (28). *H19* não é traduzido e este gene poderia modular hiperexpressão de *IGF2*. *H19* e *p57kip2* também sofrem *imprinting*, mas ao contrário de *IGF2*, estes genes são expressos a partir do alelo materno (31). Isodissomia unipatental do *locus* 11p15 é associada com a síndrome de Beckwith-Wiedemann. Essa alteração estrutural é caracterizada pela perda do alelo materno e duplicação do alelo paterno, promovendo a expressão bialélica de *IGF2* e diminuição da expressão de *H19* e *p57kip2* (Figura 1). Recentemente, hiperexpressão do gene *IGF2* foi evidenciada nos tumores adrenocorticais benignos e malignos de crianças (32). Em adultos, os valores de RNAm do gene *IGF2* foram significativamente mais elevados nos carcinomas adrenocorticais quando comparados aos adenomas (32).

As ações biológicas de IGF-2 são mediadas por IGF-1R. Almeida *et al.* (32), em estudo realizado em 57 pacientes brasileiros com tumor do córtex adrenal, demonstraram que a expressão de *IGF1R* foi significativamente mais elevada nos carcinomas adrenocorticais pediátricos em relação aos adenomas. Estes dados sugerem que a expressão de *IGF1R* possa ser útil

na identificação de tumores adrenocorticais pediátricos associados a um fenótipo mais agressivo. Adicionalmente, a via de sinalização do IGF-1R pode representar um potencial alvo terapêutico para o tratamento do carcinoma adrenocortical humano (32). No grupo dos adultos os valores de RNAm foram similares nos tumores adrenocorticais benignos e malignos (32).

Figura 1 – Representação esquemática das alterações no locus 11p15 em tumores adrenocorticais. No córtex adrenal normal o gene *IGF2* sofre *imprinting* materno, enquanto os genes *H19* e *p57* sofrem *imprinting* paterno. No processo de tumorigênese ocorre perda do alelo materno e duplicação do alelo paterno, culminando em expressão bialélica de *IGF2* e silenciamento dos genes *p57* e *H19*.

A amplificação do fator esteroideogênico 1 foi evidenciada por FISH (hibridização *in situ* fluorescente) em 8 de 9 tumores adrenocorticais de crianças brasileiras, sugerindo uma associação entre o aumento do número de cópias deste gene e a tumorigênese adrenocortical (33). Além disso, estudos por *imunoblot* demonstraram um aumento de expressão da proteína SF-1 nos tumores estudados por FISH e que apresentaram amplificação gênica. No entanto, não houve correlação entre a expressão protéica e o número de cópias do gene *SF1* em tumores adrenocorticais pediátricos (34).

Estudo realizado recentemente por nosso grupo de pesquisa demonstrou hiperexpressão gênica do receptor tipo 4 dos fatores de crescimento de fibroblastos (*FGFR4*) em 20 (87%) de 23 e em 19 (55%) de 34 dos tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos, respectivamente (Brito LP, 2007- apresentado no ENDO 2007, Toronto, Canadá).

1.3 – Sistema IGF

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) desempenham importante função no crescimento e desenvolvimento de muitos tecidos por meio da regulação da proliferação, diferenciação, apoptose e transformação celular (35). Inicialmente estes fatores foram identificados como hormônios polipeptídeos expressos no fígado (36). Posteriormente, foi demonstrado que IGFs são sintetizados pela maioria dos tecidos extra-hepáticos como cérebro, rins, estômago e glândula suprarrenal, nos quais exibem ações autócrinas ou parácrinas (36, 37). Adicionalmente, células tumorais e fibroblastos podem produzir IGFs (38) que são capazes de interagir com outros fatores produzidos localmente, incluindo os hormônios esteróides (39).

O sistema IGF é constituído pelos ligantes IGF-1 e IGF-2, quatro receptores de membrana, seis proteínas ligadoras (IGFBP 1 - 6) e proteases de IGFBPs (Figura 2) (40).

Figura 2 – Sistema IGF. O sistema IGF é constituído por dois ligantes IGF-1 e IGF-2, receptores de membrana IGF-1R, IGF-2R, receptores de insulina (IR), receptores híbridos e IGFBPs. Ryan PD *et al.* (41).

IGF-1 e IGF-2 são polipeptídeos de cadeia simples que possuem grande homologia em suas sequências de aminoácidos (42). IGF-1 atua como um importante fator na progressão do ciclo celular (43) bem como mediador dos efeitos anabólicos do hormônio de crescimento na vida pós-natal e sua concentração aumenta durante o desenvolvimento (44). Além disso, dados sugerem que altas concentrações de IGF-1 estejam relacionadas ao risco de desenvolvimento de cânceres de mama e próstata (45).

IGF-2 tem relevante papel durante o desenvolvimento fetal e sua função durante a fase adulta ainda não está bem definida (44). Este fato é ilustrado pelo declínio significativo das concentrações séricas e teciduais de IGF-2 no período pós-natal (46).

Fottner *et al.* (37) demonstraram que o sistema IGF desempenha função

fundamental na regulação secretora da glândula suprarrenal. Os peptídeos IGF-1 e IGF-2 são capazes de induzir esteroidogênese em células adrenocorticais *in vitro* e *in vivo* (47-49). Este efeito é mediado pela interação com IGF-1R e modulado pelas IGFBPs produzidas localmente, reguladas de maneira específica por ACTH e IGFs (47-49). Além disso, o sistema IGF está envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento adrenocortical (37). IGF-2 parece ser um fator de crescimento importante na glândula suprarrenal fetal, na qual são expressas altas concentrações deste fator. Adicionalmente, mudanças características dos valores séricos deste peptídeo durante a puberdade e menopausa são associadas com mudanças relevantes na função adrenocortical (50).

O receptor tipo 1 dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1R) é um receptor tetramérico constituído por duas subunidades α e duas subunidades transmembrana β que estão unidas por pontes dissulfídicas. As subunidades α são estruturas extracelulares nas quais os IGFs se ligam, enquanto as subunidades β contêm um domínio tirosina quinase intracelular (51). IGF-1R apresenta 84% de homologia com o receptor de insulina em seu domínio tirosina quinase (52).

IGF-1R é ativado por IGF-1 e IGF-2. A ligação do receptor com estes fatores de crescimento promove a autofosforilação das tirosinas 1131, 1135 e 1136, localizadas no domínio quinase da subunidade β , gerando resíduos fosfotirosina. Estes atuam como sítios acopladores para moléculas sinalizadoras, como os substratos de IR (IRS-1 a IRS-4) e domínios homólogos de Src. O recrutamento destas moléculas ativa a sinalização de

IGF-1R por meio das vias fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K-AKT) que desencadeia decréscimo de apoptose e da via RAS-RAF-proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) que promove o aumento de proliferação celular (53). Recentemente, demonstrou-se que a via alvo da rapamicina mamífera (mTOR) é importante na regulação da síntese protéica e sua inibição resulta em um aumento na fosforilação da proteína quinase B (AKT) por meio de uma alça de retroalimentação (Figura 3) (54).

Figura 3 – Vias de sinalização de IGF-1R. A ligação de IGF-1 e IGF-2 ao receptor IGF-1R ativa a transdução de sinais por meio das vias PI3K-AKT e RAS-RAF-MAPK que promovem a diminuição de apoptose e aumento nas taxas de proliferação celular, respectivamente. Adaptado de Pappano WN *et al.* (54).

O gene *IGF1R* está localizado no braço longo do cromossomo 15 posição 25-26 (15q25 - 26) e tem aproximadamente 100 Kb organizadas em 21 exons (55). Este gene codifica um único polipeptídeo de 1367 aminoácidos que é constitutivamente expresso na maioria das células. Os

exons 1 a 11 codificam a região 5' não traduzida, o peptídeo sinal e a subunidade α , enquanto que os exons 12 a 21 codificam a subunidade β e a região 3' não traduzida (55, 56). Doze dos 21 exons do gene *IGF1R* são idênticos ao gene homólogo do receptor da insulina (57). A região de maior semelhança é a que codifica parte da subunidade β (exons 16 - 20) no domínio tirosina quinase (55).

IGF1R possui um único sítio de iniciação de transcrição; sua região promotora é rica em guanina e citosina (G - C) e não possui os elementos clássicos TATA e CCAAT *box* (58), no entanto, possui elementos de genes *housekeeping* característicos de genes altamente regulados. Além disso, possui atividade transcricional basal alta (59). Este gene possui dois transcritos resultantes de *splicing* alternativo no exon 14, caracterizado pela perda de três nucleotídeos (CAG) a partir da posição 2829 do DNA complementar (cDNA) (55).

A importância de *IGF1R* no desenvolvimento normal de mamíferos é clara em estudo com camundongos sem receptores funcionais (60, 61). Estes nascem com 45% do tamanho de camundongos normais e morrem rapidamente devido à severa hipoplasia pulmonar (60). Células que não possuem IGF-1R (derivadas de embriões com ablação de *IGF1R* - fenótipo letal) não são capazes de sofrer transformação quando expostas a diferentes oncogenes celulares e virais (61).

Existem fortes evidências de que a via de IGF-1R tem importância na transformação, crescimento e sobrevivência das células neoplásicas. Apesar de mutações em *IGF1R* ainda não terem sido descritas em nenhum tipo

tumoral, polimorfismos nos genes *IGF1* e *IGFBP3* foram descritos e parecem ser importantes no risco de desenvolvimento de tumores (62, 63).

Estudos demonstraram hiperexpressão de *IGF1R* em diversos tumores primários e células derivadas de cânceres (64, 65). Apesar dos mecanismos moleculares que promovem o aumento de expressão de *IGF1R* ainda não terem sido bem elucidados, dados sugerem que a expressão deste receptor seja pré-requisito fundamental para transformação celular.

IGF-2R, também conhecido como IGF-2/M6PR, é um receptor de cadeia simples que possui sítios de ligação para IGF-2 e proteínas que contém manose-6-fosfato (42). Este receptor desempenha papel fundamental na regulação do crescimento celular promovendo a degradação lisossomal de IGF-2 e, portanto, reduzindo a biodisponibilidade deste peptídeo (39). Em consequência desta degradação, IGF-2R tem sido considerado um potencial supressor tumoral. De fato, IGF-2/M6PR encontra-se mutado ou deletado em alguns cânceres (37). Perda de heterozigose do *locus* de IGF-2/M6PR é um evento frequente em tumores adrenocorticais e suporta a hipótese de que este receptor possa ser um gene de supressão tumoral na tumorigênese adrenocortical (66).

Ainda constituem o sistema IGF os receptores de insulina (IR) e receptores híbridos. IR está relacionado ao controle de glicose e metabolismo e possui duas isoformas produzidas por *splicing* alternativo do exon 11, gerando o exon 11- ou isoforma A (IR-A) e exon 11+ ou isoforma B (IR-B) (67). As duas isoformas de IR são expressas de maneira específica, sendo IR-A altamente expressa em tecidos fetais e IR-B encontrada em

tecidos adultos (68). IR-A promove o crescimento em resposta ao estímulo de IGF-2 e apresenta elevada expressão em alguns leiomiosarcomas deficientes em IGF-1R (69). Os receptores híbridos são compostos por hemi receptores de IR e IGF-1R (70) e sua presença varia de acordo com o tecido. Estes receptores funcionam predominantemente como IGF-1R em função do fato de se ligarem com maior afinidade ao IGF-1, mas sua importância biológica permanece ainda desconhecida (42).

As ações biológicas de IGF-1 e IGF-2 são moduladas por uma família de proteínas que se ligam com alta afinidade aos IGFs (IGFBP 1 - 6) (71). Estas proteínas têm múltiplas e complexas funções. IGFBPs são capazes de inibir ou aumentar a ação destes fatores de crescimento, resultando na supressão ou no estímulo da proliferação celular (72). As IGFBPs desempenham três principais funções: 1) transportam os IGFs, 2) protegem IGFs de degradação e 3) regulam a interação com IGF-1R. IGF-1 e IGF-2 possuem maior afinidade por IGFBPs quando comparado ao IGF-1R. A ligação destas proteínas regulatórias aos IGFs bloqueia a interação com o receptor e diminui a ação destes fatores de crescimento. No entanto, a ligação destes com IGFBPs os protege de degradação proteolítica e aumenta sua meia vida (73).

1.4 – Fator esteroideogênico 1 (SF-1)

SF-1 é um receptor nuclear também conhecido como Ad4BP ou *NR5A1* (74). Este fator de transcrição foi inicialmente descrito como importante regulador da expressão tecido-específica das enzimas hidroxilases envolvidas na síntese de hormônios esteróides do citocromo P450, as quais catalisam a maioria das reações nas vias esteroideogênicas (75). Estudos subsequentes demonstraram que SF-1 ativa a região promotora de diversos genes essenciais para o desenvolvimento dos órgãos relacionados ao sistema endócrino (76).

O gene *SF1* está localizado no braço longo do cromossomo 9 posição 33.3 (9q33.3), região cromossômica na qual foram identificados ganhos e ampliações em tumores adrenocorticais por hibridização genômica comparativa (77-80). Este gene tem aproximadamente 30 Kb organizadas em 7 exons, incluindo o exon 1 que é não codificante (81). A proteína SF-1 é composta por 461 aminoácidos e possui a mesma organização clássica dos demais membros da família dos receptores nucleares sendo constituída por um domínio de ligação ao DNA, uma região *hinge*, um domínio de ativação funcional e um domínio de ligação (82). O domínio de ligação ao DNA é composto por dois dedos de zinco, que são altamente conservados em diversos mamíferos. No primeiro dedo de zinco está localizado o domínio P *box* (*Proximal box*), que confere especificidade no reconhecimento de sítios particulares do DNA. No segundo dedo de zinco situa-se o domínio D *box* (*Distal box*) que forma a interface de dimerização do SF-1. O domínio AF-2

tem importância na atividade transcricional e na interação com cofatores. Esta proteína é altamente conservada entre as espécies e possui 95% de homologia entre os aminoácidos de camundongos e humanos (Figura 4) (83).

Figura 4 – Estrutura gênica (A) e proteica (B) de SF-1. Adaptado de Biason-Lauber A *et al.* (84).

Estudos de imunohistoquímica e hibridização *in situ* caracterizaram a distribuição celular e tecidual de SF-1 (85-90). Em acordo com seu papel regulador das enzimas relacionadas à síntese de hormônios esteróides, SF-1 é expresso em órgãos nos quais os hormônios esteróides são produzidos, tais como as células das três zonas do córtex adrenal, células de Leydig, células da granulosa e teca (85-87). Os transcritos de SF-1 também foram detectados em células de Sertoli, gonadotrofos da hipófise nos quais regula a expressão de gonadotrofinas e do receptor GnRH, e no núcleo ventromedial do hipotálamo (88-90). Estes achados demonstraram que SF-1 atua em diferentes regiões dos eixos hipotálamo-hipófise-gônadas / adrenais regulando a expressão de diversos genes mediadores da esteroidogênese e reprodução.

A importância de *SF1* no desenvolvimento adrenogonadal foi bem estabelecida em camundongos com ablação deste gene. Estes animais não possuem glândulas supra-renais e gônadas ao nascimento em função da regressão do primórdio adrenogonadal por apoptose a partir do 12º dia embrionário (E12.0) (91, 92).

A identificação de mutações inativadoras no gene *SF1* em humanos demonstra a importância deste fator de transcrição no desenvolvimento e função endócrina. Até o momento, aproximadamente vinte diferentes variantes gênicas foram descritas (83). Estas elucidam a função de SF-1 e os mecanismos relacionados a disgenesias gonadais e falências adrenais. A primeira mutação, caracterizada pela substituição do aminoácido glicina por glutamato na posição 35 do SF-1, foi identificada em uma paciente com insuficiência adrenal e disgenesia gonadal bilateral (93). Posteriormente, a identificação de uma microdeleção de 8 pb no gene *SF1* em uma paciente com disgenesia gonadal e função adrenal normal indicou que o efeito negativo de mutações do SF-1 pode afetar diferentemente a atividade transcricional gonadal e adrenal (94).

1.5 – Os fatores de crescimento de fibroblastos e seus receptores

Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) foram identificados inicialmente como mitógenos de fibroblastos em cultura (95). Desde então, pelo menos 23 FGFs distintos foram demonstrados em uma variedade de organismos. Todos os membros da família FGF possuem uma sequência de

120 aminoácidos conservada que possui de 16 a 65% de homologia (96). Os FGFs são mediadores de uma variedade de respostas celulares durante o desenvolvimento embrionário e adulto. No desenvolvimento embrionário, estes fatores de crescimento apresentam relevante função na morfogênese, regulando a proliferação, diferenciação e migração celular. Em adultos, FGFs tem papel na reparação tecidual, cicatrização e angiogênese (97).

A ação biológica dos FGFs é mediada pela ligação e ativação de 4 receptores de membrana com atividade tirosina quinase (FGFR1 - 4). Estes receptores possuem um sítio de ligação extracelular composto por três alças semelhantes à imunoglobulina (Igl, IgII, IgIII), uma sequência de sete a oito resíduos ácidos entre Igl e IgII (*acid box*), um domínio transmembrana simples e um sítio citoplasmático com atividade tirosina quinase bem como sequências regulatórias adicionais (Figura 5) (98).

Uma importante característica dos FGFRs é a variedade de isoformas geradas por *splicing alternativo* (96). As diferentes isoformas incluem FGFRs compostos por duas ou três alças de Ig, formas solúveis de FGFRs assim como formas geradas por *splicing* alternativo dos exons que codificam a IgIII. Esta última é observada apenas em FGFR1 - 3 (Figura 6). As isoformas possuem diferentes afinidades e são expressas de maneira tecido-específica (97).

Figura 5 – Representação da estrutura dos receptores dos fatores de crescimento de fibroblastos. A porção extracelular de FGFRs contém três alças semelhantes à imunoglobulina e *acid box* enquanto que a porção intracelular contém o domínio tirosina quinase. Adaptado de Knights V *et al.* (99).

Figura 6 – Isoformas de FGFRs. As duas isoformas de FGFR são geradas por *splicing* alternativo dos exons 8 e 9. Quando a metade C-terminal de IgIII é codificada pelo exon 8 a isoforma FGFRIIIb é gerada, e quando é codificada pelo exon 9 a isoforma FGFRIIIc é gerada. Adaptado de Eswarakumar VP *et al.* (96).

Após a ligação com FGFs, estes receptores se dimerizam e promovem a ativação do domínio tirosina quinase intracelular, gerando resíduos tirosina fosforilados. Estes atuam como sítios acopladores para proteínas adaptadoras, desencadeando as vias de transdução de sinais: RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT, e fosfolipase C γ (PLC γ). Esta última reforça a via MAPK por meio da fosforilação da proteína RAF. A sinalização de FGFRs pode ser regulada negativamente em diferentes níveis por meio de reguladores negativos que modulam a ligação de FGFs ao receptor ou interferem na sinalização celular (Figura 7) (100).

Um aspecto relevante dos FGFs é sua interação com heparina ou heparina sulfato glicosaminoglicana (HSGAG) na matrix extracelular. A ligação com HSGAG protege estes peptídeos da degradação mediada por proteases. Adicionalmente, ativação de FGFRs é modulada por HSGAGs que se ligam diretamente ao receptor no domínio IgII e podem aumentar a afinidade FGF/FGFR (99).

O gene do receptor tipo 4 dos fatores de crescimento de fibroblastos está localizado no braço longo do cromossomo 5 posição 35.1 (5q35.1) e tem aproximadamente 11,3 Kb organizadas em 18 exons. O exon 1 não é traduzido e é precedido por uma região promotora que não possui TATA *box* (101). Nesta região cromossômica também foram identificados ganhos e amplificações em tumores adrenocorticais por hibridização genômica comparativa (77, 79, 102, 103).

Figura 7 – Vias de sinalização de FGFRs. A sinalização dos receptores de FGFs ocorre por meio das vias RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT e fosfolipase C γ . Os retângulos roxos representam reguladores negativos envolvidos com as vias de transdução de sinais dos FGFRs. Adaptado de Turner N *et al.* (100).

Existem evidências de falhas na regulação de FGFs em diversos tipos tumorais. Sinalização anômala de FGFs pode promover o desenvolvimento de tumores por meio do aumento da proliferação celular, escape de apoptose e angiogênese (100). Hiperexpressão deste receptor foi demonstrada em linfomas de Hodgkins (104), câncer de próstata (105), adenocarcinoma pancreático (106) e carcinoma hepatocelular (107). Adicionalmente, análises de *microarray* demonstraram que a expressão diferencial de *FGFR4* e outros genes como *IGF2*, *FGFR1* é capaz de caracterizar adenomas e carcinomas adrenocorticais (108). Estudo realizado em 57 tumores adrenocorticais em nosso laboratório demonstrou hiperexpressão gênica de *FGFR4* em 20 (87%) de 23 e em 19 (55%) de 34 dos tumores diagnosticados em crianças e adultos, respectivamente (Brito LP, 2007- apresentado no ENDO 2007, Toronto, Canadá).

Bange *et al.* (109) demonstraram a substituição do aminoácido glicina por arginina na posição 338 (p.G338R) do domínio transmembrana de FGFR-4 em células de carcinoma mamário. Esta variante alélica também foi demonstrada em uma variedade de células tumorais assim como em pacientes com outros tipos de câncer e em indivíduos normais (109). Análises de três grupos geograficamente separados indicaram que esta alteração ocorre em aproximadamente 50% dos humanos (109, 110). Além disso, demonstrou-se que pacientes com o alelo arginina em homo ou heterozigose (Arg/Arg ou Gly/Arg) apresentaram tumores mais agressivos (109). A correlação entre a presença do alelo arginina e prognóstico desfavorável foi avaliada em outros tipos tumorais e alguns grupos constatarem associação deste alelo com tumores mais agressivos (110, 111), enquanto que outros não observaram qualquer associação (112, 113).

2 – Objetivos

1 - Determinar o número de cópias dos genes *IGF1R*, *SF1* e *FGFR4* em tumores adrenocorticais pediátricos e de adultos.

2 - Correlacionar o número de cópias com os dados de expressão gênica e/ou protéica de *IGF1R*, *SF1* e *FGFR4*, assim como, com o diagnóstico histológico e evolutivo dos tumores adrenocorticais.

3 – *Métodos*

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo nº 0199/08). Após consentimento informado por escrito, obtivemos amostra de tecido tumoral dos pacientes. Todos os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM 42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas, FMUSP.

3.1 – Pacientes

Sessenta e quatro pacientes com tumores do córtex adrenal (42 adenomas e 22 carcinomas) de 25 crianças (1 a 18 anos) e 39 adultos (19 a 73 anos) não relacionados foram estudados (Anexo 1). Todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e tratamento cirúrgico. O diagnóstico foi confirmado por estudo anátomo-patológico e classificado segundo os critérios histológicos de Weiss (9). Os pacientes foram avaliados a partir do estadiamento proposto por MacFarlane (11) e modificado por Sullivan (12). O diagnóstico de malignidade em tumores de pacientes adultos foi estabelecido pelas seguintes características: escore de Weiss ≥ 3 ou estadiamento III ou IV. Como os critérios histológicos de Weiss não são preditivos de malignidade em crianças com tumores adrenocorticais, o diagnóstico de carcinoma adrenocortical neste grupo foi definido pelo estadiamento tumoral (III ou IV) ou evolução desfavorável. Síndrome de Cushing (60%) foi a manifestação clínica mais frequente nos adultos com

tumores adrenocorticais, enquanto que virilização (61,5%) constituiu a apresentação clínica mais comum no grupo pediátrico (Tabela 3).

Tabela 3 – Características clínicas de 64 pacientes com tumor adrenocortical.

	Crianças		Adultos	
	Adenomas n = 18	Carcinomas N = 7	Adenomas N = 24	Carcinomas n = 15
Sexo (F : M)	3,5 : 1	1,3 : 1	11 : 1	4 : 1
Síndrome Clínica (n)				
Cushing	2	0	20	3
Virilização	12	4	0	1
Mista	4	2	2	7
Não Funcionante	0	0	2	4
Feminilizante	0	1	0	0

F: sexo feminino, M: sexo masculino

Oito glândulas adrenais normais obtidas em cirurgias renais ou autópsias foram utilizadas como controles. Todos os tecidos adrenais (tumoriais e normais) foram armazenados em nitrogênio líquido até a realização da extração de DNA.

3.2 – Estudos moleculares

3.2.1 – Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico de tecidos adrenais normais e tumorais preservados em nitrogênio líquido foi realizada utilizando-se *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega,USA). A concentração e pureza do DNA genômico extraído foram medidas em espectrofotômetro.

3.2.2 – *Multiplex ligation-dependent probe amplification- MLPA*

A verificação do número de cópias dos genes *IGF1R*, *SF1* e do locus *FGFR4* foi realizada por amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA - *multiplex ligation-dependent probe amplification*). Esta técnica de investigação molecular foi descrita por Schouten *et al.* (114) em 2002 e permite a detecção de amplificações ou deleções gênicas, envolvendo um ou mais exons, regiões subteloméricas e cromossomos inteiros.

Deleções ou amplificações dos genes *IGF1R*, *SF1* e do locus *FGFR4* foram investigadas utilizando-se ensaios comerciais desenvolvidos especificamente para avaliação do número de cópias (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda) (Tabela 4, Anexos 2A, 2B e 2C). As figuras 8, 9 e 10 representam padrões de eletroforese dos ensaios P217 *IGF1R*, P185-B1 *Intersex* e P026-C1 Sotos, respectivamente.

Tabela 4 – Ensaio utilizados na avaliação do número de cópias dos genes *IGF1R*, *SF1* e *FGFR4*.

Ensaio	Genes ou Sondas Controles	Locus	Quantidade de Sondas	Tamanho dos Produtos Amplificados (pb)
P217 <i>IGF1R</i>	<i>IGF1R</i>	15q25-26	22	136 a 472
	<i>IGFBP3</i>	7p13	6	
	Sondas controles	-	9	
P185-B1 <i>Intersex</i>	<i>SF1</i>	9q33	5	160 a 445
	Demais genes	-	27	
	Sondas controles	-	8	
P026-C1 Sotos	<i>FGFR4</i>	5q35.1	2	130 a 463
	<i>NSD1</i>	5q35	24	
	Sondas controles	-	14

Figura 8 – Padrão de eletroforese de *IGF1R* em tecido adrenal normal.

Figura 9 – Padrão de eletroforese de *SF1* em tecido adrenal normal.

Figura 10 – Padrão de eletroforese de *FGFR4* em tecido adrenal normal.

Aproximadamente 200 ng de DNA genômico das amostras tumorais foram diluídos em água ultrapura em um volume final de 5 μ L. Em termociclador modelo 9700 (Applied Biosystem, Foster City, California, USA) os tubos com 5 μ L de DNA diluído foram incubados por 5 minutos a 98 °C, a fim de ocorrer a desnaturação. A temperatura foi diminuída para 25 °C e foram acrescentados 3 μ L do mix de sondas, preparado a partir de 1,5 μ L do SALSA probe mix e 1,5 μ L do tampão MLPA. Essa mistura foi submetida por um minuto a uma temperatura de 95 °C, seguida por 16 horas a 60 °C, para que as sondas hibridassem aos seus respectivos alvos (Figura 11 A).

Após a hibridação das sondas, a temperatura foi reduzida para 54 °C e então adicionados 32 μ L da mistura de Ligase-65 (3 μ L do tampão ligase-65 A, 3 μ L do tampão ligase-65 B, 1 μ L Ligase-65 e 25 μ L de água ultrapura) em cada tubo. As reações foram incubadas a 54 °C por 15 minutos para ocorrer a ligação das sondas previamente hibridadas e, em seguida, a 98 °C por cinco minutos, para inativação das enzimas restantes (produto de ligação) (Figura 11 B).

Dez μ L do produto de ligação foram transferidos para um novo tubo contendo 30 μ L do mix PCR, preparado a partir de 4 μ L do tampão SALSA PCR e 26 μ L de água ultrapura. Os tubos foram colocados no termociclador

a 60 °C e mantidos nesta temperatura enquanto foram adicionados 10 µL do mix polimerase, que contém 2 µL de SALSA PCR primers, 2 µL do tampão SALSA enzyme dilution, 0,5 µL da enzima SALSA polimerase e 5,5 µL de água ultrapura. Nessa etapa, teve início a reação de amplificação das sondas ligadas por PCR. O protocolo de amplificação consistiu em 35 ciclos a 95 °C (30 segundos), 60 °C (30 segundos) e 72 °C (1 minuto), e um ciclo final de extensão a 72 °C por 20 minutos (Figura 11 C).

Os produtos da amplificação foram detectados e quantificados por eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems, The Perkin-Elmer Corporation, CA, USA), e analisados pelo programa de análise de fragmentos *GeneScan* (PE Applied Biosystems, The Perkin-Elmer Corporation, CA, USA) que determina o tamanho de cada fragmento e sua correspondente altura e área do pico no eletroferograma (Figura 11 D).

O conjunto de dados de altura dos picos de cada amostra foi transferido para uma planilha Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, USA). Em cada ensaio foram utilizados no mínimo dois controles que tiveram seus DNAs extraídos pela mesma metodologia e pertenciam ao mesmo tipo de tecido que as amostras analisadas. Inicialmente, a média da altura dos picos de cada sonda dos controles da reação foi determinada. Posteriormente, para cada amostra tumoral, foi calculada a média das proporções P_n de cada sonda. O valor obtido desta média (média das proporções) é o número de cópias estimado de cada sonda (Figura 12).

Figura 11 – Fases da reação de MLPA. O DNA genômico das amostras tumorais foi desnaturado e as sondas adicionadas para que a hibridação aos seus respectivos alvos ocorresse (A). Em seguida, as sondas foram ligadas com uma enzima ligase termoestável (B) e submetidas a reação de PCR para amplificação (C). O produto amplificado foi submetido à análise de fragmentos em sequenciador automático (D).

$$P_n = \frac{(\text{Altura da sonda analisada} / \text{Altura da sonda controle})_{n^{\text{amostra}}}}{(\text{Altura da sonda analisada} / \text{Altura da sonda controle})_{n^{\text{média dos controles}}}}$$

$$\text{Média das proporções} = \frac{P_1 + P_2 + P_3 + \dots + P_n}{n}$$

$n = \text{número de sondas controles}$

Figura 12 – Fórmulas utilizadas em planilhas Excel para análise do número de cópias das amostras tumorais.

Uma determinada região analisada foi considerada normal quando a média das proporções esteve entre 0,7 e 1,3; com diminuição no número de cópias quando fosse inferior a 0,7 e com aumento no número de cópias quando fosse superior a 1,3. Um ensaio foi considerado válido somente quando os controles eram diplóides para as sondas analisadas e quando as amostras tumorais também apresentavam duas cópias na maioria das sondas controles. Todas as reações em que foram detectadas alterações no número de cópias dos genes em estudo foram repetidas para fins de confirmação.

3.2.3 – PCR em tempo real - *SYBR Green*

A reação em cadeia da polimerase *SYBR Green* foi realizada com o objetivo de confirmar os dados obtidos pela metodologia de MLPA. A confirmação das amplificações dos genes *IGF1R* e *SF1* foram realizadas por meio de um estudo de quantificação relativa. As reações foram realizadas

pelo método baseado em *SYBR Green 1*, utilizando-se o aparelho *ABI 7000 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O estudo foi realizado a partir de DNA genômico extraído dos tumores adrenocorticais. A análise de quantificação relativa, baseada na comparação de um gene referência que, assim como *IGF1R* e *SF1*, apresenta duas cópias no genoma foi realizada. O gene escolhido foi o *NPC1* (*Niemann-Pick C1 protein precursor*), localizado no cromossomo 18q11-12 que foi quantificado, simultaneamente, em tubos separados para cada amostra tumoral. Oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados para os dois genes em estudo assim como para o gene referência (Tabela 5).

Tabela 5 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na investigação do número de cópias dos genes *IGF1R* e *SF1* por PCR em tempo real - *SYBR Green*.

Gene (região)	Sequência dos nucleotídeos	Produto (pb)
<i>IGF1R</i> (Intron 2)	F: 5' GACCCGGGCTCGTTTCGTCTG 3' R: 5' AACACGGCTGGGCTGTCAGGA 3'	101
<i>SF1</i> (Exon 4)	F: 5' ACC AGA AGA AGG CAC AGA TTC 3' R: 5' CTG GGA GGC AGC ACG TAG TC 3'	109
<i>NPC1</i> (Exon 8)	F: 5' AC CCT GGC TGT GTC ATT TTC TTC TCG 3' R: 5' TG ACC AGA GGT CAA CTG GAT TGG TTG 3'	101

F: oligonucleotídeo sense, R: oligonucleotídeo antisense

O produto comercial *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) contém o corante *SYBR Green 1*, uma DNA polimerase (*AmpliTaQ Gold DNA Polymerase*), dNTPs e um tampão que proporciona condições apropriadas para a PCR. Este método é baseado

na detecção de fluorescência gerada a medida que o produto de PCR é amplificado, uma vez que o corante *SYBR Green 1* apresenta grande afinidade pela molécula de DNA dupla fita. Sendo assim, o produto gerado a cada ciclo resulta em aumento na intensidade de fluorescência, que é proporcional à quantidade de cópias destas regiões.

Todas as reações foram realizadas em triplicatas em um volume final de 25 µL que continha 2,5 µL de DNA (50 ng), 10 pmol de cada *primer* e SYBR Green PCR Master Mix. As condições de termociclagem foram 10 minutos a 95 °C, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Ao final de cada reação, foi realizada uma curva de dissociação para verificação dos produtos amplificados. Esta análise é importante para garantir que apenas o produto esperado tenha sido amplificado, uma vez que o *SYBR Green 1* se liga inespecificamente a qualquer DNA fita dupla.

O cálculo da quantificação relativa do número de cópias das regiões de interesse foi realizado utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme descrito por Livak (115). ΔCT é a diferença entre os Ct do gene alvo e gene referência de uma determinada amostra e o $\Delta\Delta CT$ corresponde à diferença entre o ΔCT do calibrador e da amostra.

3.2.4 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa SPSS (versão 13). As variáveis contínuas foram expressas com média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os valores de expressão dos genes nos tumores

adrenocorticais benignos e malignos foram analisadas pelo teste *Mann-Whitney*. O valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo.

4 – Resultados

4.1 – *IGF1R*

Amplificação do gene *IGF1R* foi detectada por MLPA (Figura 13) e confirmada por PCR em tempo real *SYBR Green* em apenas um carcinoma adrenocortical (caso nº 30, Anexo 1). Este tumor foi diagnosticado em uma paciente do sexo feminino de 46 anos que apresentou síndrome de Cushing e virilização. O tumor foi classificado como MacFarlane III e *score* de Weiss 7.

Três cópias do gene *IGF1R* foram evidenciadas neste tumor com amplificação de *IGF1R*. Os valores de RNAm deste carcinoma adrenocortical, avaliados por PCR em tempo real, foram cinco vezes maiores quando comparados aos valores de RNAm de uma glândula adrenal normal. Adicionalmente, amplificação gênica de outros *loci* (*IGFBP3*, *FGFR4* e *NSD1*) foi observada neste caso (Figuras 13 e 14), bem como a amplificação gênica de sondas controles (Tabela 6). Análise de MLPA realizada com DNA proveniente de leucócitos periféricos desta paciente demonstrou que *IGF1R* está amplificado apenas no tecido tumoral, sugerindo que a amplificação de *IGF1R* representa um evento somático.

Amplificação do gene *IGF1R* não foi observada nos outros tumores adrenocorticais tanto no grupo pediátrico quanto no grupo de adultos.

Figura 13 – Representação dos resultados de MLPA obtidos a partir de DNA de uma glândula suprarrenal normal (painel A) e de um carcinoma adrenocortical com amplificação dos genes *IGF1R* e *IGFBP3* (caso nº 30) (painel B). As setas vermelhas demonstram alguns exemplos de sondas amplificadas.

Figura 14 – Representação dos resultados de MLPA obtidos a partir de DNA de uma glândula suprarrenal normal (painel A) e de um carcinoma adrenocortical com amplificação dos genes *FGFR4* e *NSD1* (caso nº 30) (painel B). As setas vermelhas demonstram alguns exemplos de sondas amplificadas.

Tabela 6 – Amplificação de múltiplos genes em um carcinoma adrenocortical.

Gene	Locus	Número de sondas amplificadas / número total de sondas
<i>IGF1R</i>	15q26.3	22 / 22
<i>IGFBP3</i>	7p13	6 / 6
<i>FGFR4</i>	5q35.1	1 / 2
<i>NSD1</i>	5q35	24 / 24
Sondas controles		7 / 23

4.2 – *SF1*

A fim de analisarmos a correlação de amplificação de *SF1* com os valores de expressão gênica e protéica foram selecionados apenas os tumores que possuíam dados prévios de expressão por PCR em tempo real e de imunohistoquímica de micromatriz tecidual (TMA) (116). Portanto, para esta avaliação foram selecionados apenas 39 casos de tumor adrenocortical. Dentre estes casos 10 tumores apresentaram amplificação gênica de *SF1* (casos nº 1, 7, 20, 37, 38, 40, 49, 55, 63 e 64, Anexo 1).

Amplificações de *SF1* foram detectadas em oito (38,1%) de 21 tumores adrenocorticais pediátricos e em dois (11,1%) de 18 tumores adrenocorticais de adultos ($P = 0,02$) (Figura 15). Amplificação foi observada em sete adenomas e três carcinomas. Dentre estes tumores com amplificação, nove apresentaram estimativa de três cópias e um tumor apresentou quatro cópias do gene *SF1*. O aumento do número de cópias foi detectado por MLPA e PCR em tempo real em cinco casos, no entanto nos casos restantes amplificação foi demonstrada apenas por MLPA ($n = 2$) ou

PCR em tempo real ($n = 3$) (Tabela 7). Os valores de expressão gênica (RNA_m) foram significativamente maiores em tumores associados com amplificação gênica quando comparados com tumores sem amplificação ($2,3 \pm 0,52$ vs. $1,16 \pm 0,18$; $P = 0,001$). Adicionalmente, os resultados de expressão protéica (TMA) de todos os tumores com aumento no número de cópias demonstraram imunorreatividade expressiva para SF-1 e a maioria dos tumores sem amplificação demonstrou marcação fraca ou negativa ($P = 0,0008$). Entretanto, imunorreatividade foi identificada em cinco tumores adrenocorticais pediátricos sem amplificação gênica de *SF1* (116) (Anexo 3 e Anexo 4).

A deleção de *SF1* foi observada em apenas um adenoma adrenocortical secretor de cortisol (caso nº 44, Anexo 1). Em concordância com este dado, foram observadas expressão gênica diminuída e imunorreatividade negativa neste caso.

Figura 15 – Representação dos resultados de MLPA obtidos a partir de DNA de uma glândula suprarrenal normal (painel A) e de um tumor adrenocortical com amplificação do gene *SF1* (painel B). As setas vermelhas demonstram as sondas de *SF1* amplificadas.

Tabela 7 – Características clínicas e moleculares de 10 tumores adrenocorticais com aumento no número de cópias de *SF1*.

Casos nº	Idade (anos)	Sexo	Síndrome Clínica	Diagnóstico	Técnica	Nº de cópias de <i>SF1</i>	Expressão gênica	Expressão protéica (%)
1	1	F	Mista	Adenoma	PCR	3	1,11	50
7	2,2	M	Virilização	Adenoma	PCR	3	1,33	83,33
20	15	F	Virilização	Carcinoma	MLPA e PCR	3	1,47	33,3
37	19	F	Mista	Carcinoma	MLPA e PCR	3	1,22	73,33
38	23	F	Mista	Carcinoma	MLPA	3	1,72	53,33
40	1,2	F	Virilizaçãp	Adenoma	MLPA e PCR	3	0,85	55
49	1,1	F	Virilização	Adenoma	MLPA e PCR	3	0,76	96,67
55	2,8	F	Virilização	Adenoma	PCR	4	1,6	70
63	2,5	F	Virilização	Adenoma	MLPA	3	0,68	86,67
64	9	F	Mista	Adenoma	MLPA e PCR	3	6,9	33,33

F: sexo feminino, M: sexo masculino

4.3 – *FGFR4*

Sessenta e quatro pacientes tiveram o número de cópias de *FGFR4* estudados. Doze amplificações do *locus FGFR4* foram demonstradas por MLPA (Figura 16). Este aumento no número de cópias foi identificado em 3 (12%) de 25 (casos nº 7, 36, 64, Anexo 1) dos tumores adrenocorticais pediátricos e em 9 (23%) de 39 dos tumores de adultos (casos nº 3, 21, 23, 30, 31, 37, 38, 44, 46, Anexo 1). Amplificação esteve presente em 9 carcinomas e 3 adenomas e todos os tumores apresentaram uma estimativa de três cópias. A maioria dos casos com amplificação ($n = 7$; 58,3%) foi identificada em tumores de pacientes com síndrome de Cushing e virilização. Dentre os tumores sem evidência de amplificação 23 (44%) de 52 eram produtores de cortisol (Tabela 8). A amplificação do *locus FGFR4* e hiperexpressão deste gene foram significativamente mais relacionados aos carcinomas do que aos adenomas ($P = 0,009$; OR = 7,8 e $P = 0,002$, respectivamente). Não foi identificada diferença significativa entre tumores diagnosticados em crianças e adultos com amplificação e aumento de expressão em ($P = 0,165$ e $P = 0,108$; respectivamente).

Figura 16 – Representação dos resultados de MLPA obtidos a partir de DNA de uma glândula suprarrenal normal (painel A) e de um tumor adrenocortical com amplificação do locus *FGFR4* (painel B). As setas vermelhas demonstram alguns exemplos de sondas amplificadas.

Tabela 8 – Características clínicas e moleculares de 12 tumores adrenocorticais com aumento no número de cópias do *locus FGFR4*.

Casos nº	Idade (anos)	Sexo	Síndrome Clínica	Diagnóstico	Número de cópias de <i>FGFR4</i>	Expressão gênica
3	29	M	Cushing	Carcinoma	3	10,17
7	2,2	M	Virilização	Adenoma	3	13,14
21	33	M	Não funcionante	Carcinoma	3	5,36
23	30	M	Não funcionante	Carcinoma	3	4,06
30	46	F	Mista	Carcinoma	3	8,53
31	17	F	Mista	Carcinoma	3	ND
36	1	F	Mista	Carcinoma	3	8,22
37	19	F	Mista	Carcinoma	3	13,76
38	23	F	Mista	Carcinoma	3	15,22
44	28	F	Cushing	Adenoma	3	1,24
46	26	F	Mista	Carcinoma	3	ND
64	9	F	Mista	Adenoma	3	167

F: sexo feminino, M: sexo masculino, ND: dados não disponíveis

5 – Discussão

Variações no número de cópias correspondem a segmentos de DNA de 1Kb ou maiores que estão presentes em números variados quando comparados a um genoma referência (117). Apesar de uma maquinaria de reparo eficiente, variações no número de cópias são de 100 a 10000 vezes mais frequentes que mutações de ponto no genoma humano, no entanto, ainda não são conhecidos os mecanismos responsáveis por estas variações estruturais do genoma (118). A importância de mudanças cromossômicas adquiridas tem sido bem estabelecida na tumorigênese; a amplificação do oncogene *MYCN* e deleções do cromossomo 1p foram descritas como os indicadores principais de prognóstico em neuroblastomas (119).

Estudos sugerem um crescente reconhecimento do papel crucial das variações no número de cópias na modulação da expressão gênica e do fenótipo de algumas doenças (120). Alterações na expressão gênica podem representar base fundamental para diversas características fenotípicas associadas a estas variantes. Além disso, por meio deste efeito de dosagem gênica poderia influenciar a formação de complexos protéicos e sistemas celulares altamente regulados (121).

5.1 – *IGF1R*

O crescimento e a diferenciação celular normais são resultados de um delicado equilíbrio entre os processos de proliferação e morte celular. A perda de regulação de um desses processos pode resultar em fenótipos patológicos, incluindo câncer (36). *IGF-1R* é um proto-oncogene com papel central na proliferação celular normal bem como nos processos de

transformação. Evidências sugerem que a sinalização aumentada do sistema IGF-1/IGF-1R represente fator chave para as vias proliferativas e oncogênicas (122). Expressão aumentada de IGF-1 está associada aos estágios iniciais da carcinogênese que é caracterizada por altas taxas de divisão celular e acúmulo de danos genéticos. Estes eventos também são facilitados pelo meio que favorece a sobrevivência das células que sofreram alterações genéticas iniciais. Deste modo, o número de células danificadas aumenta e estas estarão disponíveis para alterações subsequentes (123).

Recentemente, nosso grupo demonstrou hiperexpressão de *IGF1R* em 69% e 22% dos tumores adrenocorticais pediátricos e de adultos respectivamente, por meio da técnica de PCR em tempo real (32). Expressão do gene *IGF1R* foi significativamente mais elevada nos carcinomas adrenocorticais pediátricos e constituiu um marcador prognóstico independente para o desenvolvimento de metástases neste grupo (32).

Apesar de *IGF1R* estar hiperexpresso em algumas neoplasias ainda não são conhecidos os mecanismos moleculares que seriam responsáveis por uma maior expressão deste receptor. Alguns mecanismos poderiam explicar o aumento de regulação de *IGF1R* em cânceres humanos, incluindo amplificação gênica, hipometilação (124), mutações na região promotora ou codificadora, translocações cromossômicas, estímulos anormais (autócrinos, endócrinos ou parácrinos) ou perda de *imprinting* (125).

Neste trabalho, hipotetizamos que a hiperexpressão do gene *IGF1R* identificada previamente em tumores adrenocorticais poderia ser causada

pelo aumento do número de cópias desse receptor. Amplificação gênica tem sido descrita como um mecanismo comum para hiperexpressão de proto-oncogenes associados com transformação celular e progressão tumoral (40). De fato, a amplificação de *IGF1R* foi demonstrada em melanomas malignos (126), cânceres de mama (127), adenocarcinomas pancreáticos (128), linhagens celulares estabelecidas a partir de câncer gástrico (129), rabdomiosarcomas (130), tumores de Wilms (131) e tumores gastrointestinais estromais (132). Nenhum dos trabalhos anteriores elucidou quais seriam os mecanismos responsáveis pelo aumento no número de cópias de *IGF1R*.

Sessenta e quatro pacientes com tumores adrenocorticais tiveram o número de cópias de *IGF1R* analisados pela técnica de MLPA. Amplificação gênica foi identificada em apenas um carcinoma adrenocortical diagnosticado em uma paciente do sexo feminino de 46 anos que apresentou síndrome de Cushing e virilização. Esta paciente foi submetida à adrenalectomia unilateral e nefrectomia seguida de 6 meses de terapia com mitotane. O tumor foi classificado como estadio III e score de Weiss 7. Após 10 anos de seguimento a paciente não apresentou recorrência. Os valores de RNAm foram 5 vezes maiores neste caso quando comparados com os valores de RNAm de uma glândula adrenal normal. A amplificação de outros *loci* (*IGFBP3*, *FGFR4* e *NSD1*) também foi observada nesse carcinoma adrenocortical. Além disso, algumas sondas controles apresentaram amplificação gênica sugerindo que este tumor adrenal apresenta uma

condição aneuplóide, fenômeno de ocorrência comum em tumores malignos devido à instabilidade cromossômica (133).

Alterações cromossômicas são comuns nos processos tumorigênicos. Tumores malignos podem apresentar cariótipos anormais com alterações numéricas e estruturais. Além disso, células tumorais frequentemente apresentam múltiplos centrossomos que podem desencadear mitoses anormais e falhas na segregação cromossômica (134). Estas alterações refletem o intenso grau de instabilidade cromossômica que existe nestes tumores (14). Os mecanismos moleculares que causam este fenômeno são pouco conhecidos, mas presume-se que podem ser o resultado de alterações em centenas de genes (135). Avaliações de cariótipo dos tumores adrenocorticais permitiram a observação de alterações estruturais múltiplas nos carcinomas (136, 137). Adicionalmente, estudos realizados com hibridização genômica comparativa revelaram regiões com ganhos ou perdas cromossômicas em tumores adrenocorticais. A tabela 9 mostra os dados dos principais estudos disponíveis na literatura.

Amplificação do gene *IGF1R* não foi identificada nos outros tumores adrenocorticais com ou sem hiperexpressão do gene *IGF1R*, sugerindo que este mecanismo molecular não foi responsável pela hiperexpressão deste receptor na maioria dos tumores adrenocorticais.

Tabela 9 – Estudos de hibridização genômica comparativa em tumores adrenocorticais.

	Ganhos cromossômicos		Perdas cromossômicas	
	e regiões envolvidas		e regiões envolvidas	
	Adenomas	Carcinomas	Adenomas	Carcinomas
Kjellman, 1996 (102)		4 e 5		17p, 11q, 2
Figueiredo, 1999 (77)	9q34, 5p, 5q, 6p, 6q, 8p,		2,3,4, 9p, 11, 13q, 18, 20p,	
	8q, 10p, 11q, 12q, 13q,		Xq	
	14q, 15q, 16, 18q, 19, 20q			
James, 1999 (78)		9q34		2q, 22q, 4
Zhao, 1999 (79)		20q, 5q, 9q,		1p, 9p, 3p, 2q,
	17q, 17p	12q, Xq, 4p,		6q, 11q
		5p		
Dohna, 2000 (80)	4, 5, 7, 8, 9q34, 11q, 12q,			9p
	14q, 16, 17q, 19, 20, 22q			
Sidhu, 2002 (103)		5p, 5q, 12p,		1p, 17p, 2q,
	2,4q, 5	12q, 19, 4	1p, 17p	11q, 22

Diversos fatores de transcrição estimulatórios e inibitórios foram identificados como entidades reguladoras da expressão de *IGF1R* e, portanto, do *status* proliferativo da célula (122). Supressores tumorais e oncogenes também estão envolvidos na regulação deste gene. Supressores como WT1, p53, BRCA1 são capazes de suprimir a expressão deste receptor em suas formas selvagens, no entanto, estão alterados em diversos cânceres nos quais *IGF1R* está hiperexpresso (138). Oncogenes celulares e virais desenvolveram mecanismos para exibir suas atividades proliferativas e

IGF1R tem sido identificado como um potencial alvo destas ações. Alguns destes oncogenes aumentam a transcrição de *IGF1R* enquanto que outros têm ação pós-transcricional (122).

O supressor tumoral *TP53* tem sido descrito como importante regulador da expressão de *IGF1R*, suprimindo a atividade promotora deste gene em aproximadamente 90%. Em contraste, formas mutantes deste regulador negativo permitem a atividade transcricional normal do promotor (139). Adicionalmente, p53 selvagem reduziu a fosforilação de IGF-1R e IRS-1, enquanto p53 mutante aumentou a fosforilação (140). No atual estudo, 22 (34,3%) de 64 pacientes com tumor adrenocortical eram carreadores da mutação germinativa p.R337H do *TP53*. No entanto, hiperexpressão de *IGF1R* não foi associada a presença desta mutação (32). Além disso, esta mutação germinativa não foi detectada no carcinoma adrenal com amplificação de *IGF1R*.

Alterações epigenéticas e microRNAs também poderiam estar relacionados a falhas na regulação gênica de *IGF1R* e ao seu papel na tumorigênese adrenocortical. As mudanças epigenéticas estão relacionadas a variações no padrão de metilação das bases citosinas que estão localizadas em dinucleotídeos CpG do DNA (141). Interessantemente, a região promotora de *IGF1R* possui ilhas CpG e poderia estar hipometilada, fenômeno que promoveria uma maior transcrição gênica. A expressão alterada de microRNAs vem sendo relacionada a diversos tipos tumorais, podendo atuar como oncogenes ou genes supressores tumorais. Em humanos, 50% dos genes de microRNAs estão localizados em sítios

genômicos associados ao câncer (142). Shi *et al.* (143) demonstraram que IGF-1R e IRS-1 são alvos do microRNA 145.

Apesar de hiperexpressão de *IGF1R* ser evento comum em diversos tipos tumorais ainda são desconhecidos os mecanismos que promoveriam essa falha na regulação transcricional. A transcrição de *IGF1R* está submetida a uma complexa rede que determina sua expressão e o entendimento molecular destas interações poderá elucidar os mecanismos relacionados à tumorigênese adrenocortical.

5.2 – *SF1*

SF1 tem sido descrito como importante fator na gênese e progressão de tumores adrenocorticais. SF-1 é expresso nos estágios iniciais do desenvolvimento, sendo expresso nos precursores adrenogonadais e em seguida, nas zonas fetal e definitiva do córtex adrenal (144). Camundongos com ablação do gene *SF1* demonstraram a importância deste fator de transcrição no desenvolvimento adrenal. Apesar de o primórdio adrenal ser formado na ausência de SF-1, eventos subsequentes foram interrompidos por morte celular programada levando à agenesia adrenal e morte pós-natal por insuficiência adrenal (91, 92). Estas observações sugerem que SF-1 regula a expressão de genes que determinam proliferação celular e apoptose (145). Além disso, camundongos que não expressam SF-1 não possuem gônadas e têm alterações estruturais do núcleo ventro-medial do hipotálamo (146, 147). A relação entre o número de cópias do *SF1* e o potencial proliferativo adrenocortical foi previamente sugerida pela redução

do crescimento adrenocortical contralateral compensatório após adrenalectomia unilateral em camundongos heterozigotos para deficiência deste fator de transcrição (*Sf1*^{+/-}) (148).

James *et al.* (78) demonstraram que a região 9q34 estava amplificada em 10 de 11 tumores adrenocorticais utilizando a técnica de hibridização genômica comparativa. Estes resultados foram confirmados por Figueiredo *et al.* (33), utilizando-se a técnica de FISH, em 8 de 9 tumores adrenocorticais de crianças brasileiras, sugerindo uma associação entre o aumento do número de cópias deste gene e o processo de tumorigênese adrenocortical. Além disso, estudos por *imunoblot* demonstraram um aumento da expressão da proteína de SF-1 nestes tumores com amplificação gênica (34). No entanto, não houve correlação entre as concentrações protéicas de SF-1 e número de cópias do gene nos tumores adrenocorticais pediátricos deste estudo (34). Estes dados sugerem que a hiperexpressão protéica não seja regulada exclusivamente pelo número de cópias e que mecanismos epigenéticos poderiam estar envolvidos nesse processo. Adicionalmente, a dosagem de SF-1 se correlaciona positivamente com proliferação celular, diminuição de apoptose de células adrenocorticais humanas e indução de tumores adrenocorticais em camundongos (149). Estes dados indicaram que a dosagem de SF-1 pode ser crítica para a tumorigênese adrenal e sugeriu que a modulação da atividade de SF-1 possa representar um alvo terapêutico importante em tumores adrenocorticais pediátricos.

Apesar da associação sugerida entre SF-1 e a tumorigênese adrenocortical, a expressão deste fator de transcrição foi determinada somente em séries com números pequenos de tumores adrenocorticais. Com isso, tivemos como um de nossos objetivos investigar a amplificação gênica de *SF1* pela técnica de MLPA em um grupo maior de pacientes com tumores adrenocorticais pediátricos e de adultos. Além disso, correlacionar o número de cópias com dados prévios de expressão gênica e protéica.

Identificamos um aumento da expressão do RNAm do gene *SF1* em 14% dos tumores adrenocorticais utilizando a técnica de PCR em tempo real, sistema Taqman (116). A prevalência da hiperexpressão do gene *SF1* foi semelhante nos tumores adrenocorticais em crianças e adultos (13 e 15%, respectivamente). O aumento da expressão do gene *SF1* foi identificado predominantemente nos adenomas adrenocorticais. Desta forma, a hiperexpressão do gene *SF1* em tumores adrenocorticais pode ser um marcador adicional de benignidade, contribuindo assim para a caracterização dos tumores adrenocorticais com critérios histopatológicos de malignidade limítrofes. Além disso, 103 tumores adrenocorticais foram avaliados quanto a expressão protéica de SF-1 por TMA e foi observada grande imunorreatividade em 20 (56%) de 26 e em 13 (19%) de 67 dos tumores pediátricos e de adultos, respectivamente (116).

Trinta e nove pacientes com tumores do córtex adrenal tiveram o número de cópias de *SF1* analisados por MLPA e PCR em tempo real. Neste grupo de tumores adrenocorticais foram identificadas 10 amplificações do gene *SF1*. Aumento no número de cópias foi observado em 8 (38,1%) de

21 e em 2 (11,1%) de 18 dos tumores adrenocorticais pediátricos e de adultos, respectivamente. Os valores de expressão gênica foram significativamente maiores em tumores associados com amplificação quando comparados com tumores sem amplificação gênica. Além disso, todos os tumores com aumento no número de cópias demonstraram imunorreatividade positiva para SF-1, no entanto, a maioria dos tumores sem amplificação demonstrou marcação fraca ou negativa (116). A frequência de hiperexpressão de SF-1 foi significativamente maior em tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças.

Modificações pós traducionais como acetilação, fosforilação e SUMOilação estão relacionadas com a atividade e capacidade transcricional de SF-1 (83). Portanto, mecanismos adicionais poderiam modular a expressão e atividade de SF-1 em tumores adrenocorticais pediátricos com e sem amplificação gênica. SF-1 claramente é submetido a uma regulação complexa, envolvendo fatores de transcrição gerais e tecido-específicos e mecanismos epigenéticos. Hipometilação do promotor é ativada em estágios iniciais em células que são programadas para expressar SF-1 (150) e provavelmente é o mecanismo regulatório que permite a expressão de SF-1 durante fases mais prematuras. As concentrações de SF-1 variam de acordo com o estágio de desenvolvimento, e com o tecido em questão e estão reguladas por um delicado equilíbrio de fatores de transcrição (83).

5.3 – *FGFR4*

FGFRs são expressos em diferentes tipos celulares e regulam importantes processos celulares por meio de respostas mitogênicas, angiogênicas e anti apoptóticas. A sinalização aberrante destes fatores é considerada característica crucial em processos tumorigênicos. Modelos tumorais *in vitro* e *in vivo* demonstraram que FGFs e FGFRs podem atuar como oncogenes (151).

Estudo realizado por nosso grupo em 57 tumores adrenocorticais demonstrou hiperexpressão gênica de *FGFR4* por PCR em tempo real em 20 (87%) de 23 e em 19 (55%) de 34 dos tumores diagnosticados em crianças e adultos, respectivamente (Brito LP, 2007- apresentado no ENDO 2007, Toronto, Canadá). Observou-se maior expressão de *FGFR4* nos carcinomas de adultos quando comparados aos adenomas (92,3% vs 33,3%) , no entanto, no grupo pediátrico essa diferença não foi verificada (100% vs 84%). Hiperexpressão gênica de *FGFR4* correlacionou-se com progressão tumoral em carcinomas hepatocelulares por meio de maiores taxas de proliferação celular e menores taxas de apoptose (107).

Assim como em *IGF1R* e *SF1*, não são conhecidos os mecanismos moleculares que promovem o aumento de expressão de *FGFR4*. Estudos realizados por hibridização genômica comparativa demonstraram que a região na qual está localizado o gene *FGFR4* está amplificada em tumores adrenocorticais (77, 79, 80, 102, 103). Deste modo, hipotetizamos que uma maior expressão deste receptor poderia estar relacionada à amplificação do

locus de *FGFR4*. A amplificação deste gene foi previamente demonstrada por Jaakkola *et al.* (152) em câncer de mama e tumor de ovário. No entanto, neste trabalho não foram avaliadas as expressões gênicas das amostras com amplificação.

Aumento no número de cópias de outros receptores do sistema FGF tem sido descrito. Amplificação da região 8p11-12, na qual está localizado *FGFR1*, é uma das regiões mais comumente amplificadas em câncer de mama e ocorre em aproximadamente 10% deste tipo tumoral (153). Amplificação deste receptor também foi demonstrada em carcinomas escamosos de mucosa oral (154), e, com menor incidência, em câncer de ovário, bexiga e rabdomiosarcomas. Hiperexpressão de *FGFR1* foi demonstrada em alguns tumores (100). Amplificação de *FGFR2* foi identificada em cerca de 10% de cânceres gástricos e foi relacionada a um pior prognóstico (155). Entretanto, não foi demonstrado aumento de expressão deste receptor de FGF (100). *FGFR3* teve seu número de cópias aumentado raramente em cânceres (100).

No atual estudo, analisamos sessenta e quatro tumores adrenocorticais por meio da técnica de MLPA. Amplificação gênica do *locus FGFR4* foi identificada em 12 tumores adrenocorticais (3 pediátricos e 9 de adultos). Nove destes tumores apresentaram hiperexpressão de *FGFR4*, sugerindo que nestes casos a amplificação poderia ser um dos mecanismos implicados no aumento de expressão. Adicionalmente, a maioria dos casos que apresentaram aumento no número de cópias foram associados a presença de tumores com secreção mista (n = 7), enquanto que a maioria

dos tumores diplóides para o *locus* 5q35 apresentaram síndrome de Cushing (44%, 23 de 52).

Observou-se ainda, que a amplificação do *locus FGFR4* e hiperexpressão deste gene foram significativamente mais relacionados aos carcinomas do que aos adenomas ($P = 0,009$; OR = 7,8 e $P = 0,002$, respectivamente), sugerindo que estas duas variáveis possam representar marcadores de malignidade. De fato, a análise de 28 amostras de tumores adrenocorticais demonstrou que *FGFR4* é um dos genes que se apresentam diferencialmente expressos em adenomas e carcinomas (108).

No restante dos casos em que foi detectada hiperexpressão gênica com ausência de amplificação outros mecanismos poderiam explicar essa falha na regulação transcricional de *FGFR4*. A transcrição é um mecanismo altamente regulado que pode ser alterado por modificações epigenéticas. Estas alteram o padrão de compactação da cromatina e, portanto, a acessibilidade de fatores e da maquinaria de transcrição. Hipometilação do DNA tem sido observada em células tumorais e pode estar relacionada a ativação de genes relacionados aos processos tumorigênicos (141). MicroRNAs também são importantes entidades que regulam a expressão gênica, no entanto, ainda não foram identificados microRNAs que poderiam ser potenciais reguladores de *FGFR4*.

Os achados do atual estudo demonstram a heterogeneidade das vias tumorigênicas em tumores adrenocorticais. Apesar de *IGF1R*, *SF1* e *FGFR4* estarem hiperexpressos nestes tumores e se relacionarem com processos proliferativos e anti apoptóticos, o padrão de amplificações encontradas são

bem distintos. Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos relacionados à falha na regulação de expressão e novos potenciais alvos terapêuticos.

6 – *Conclusões*

1 – Amplificação do gene *IGF1R* é um evento raro nos tumores adrenocorticais pediátricos e de adultos. A hiperexpressão de *IGF1R* não foi secundária à amplificação gênica em tumores adrenocorticais.

2 – Amplificação do gene *SF1* foi evidenciada predominantemente em tumores adrenocorticais pediátricos.

3 – Hiperexpressão gênica e protéica de SF-1 foi associada significativamente a tumores com amplificação gênica de *SF1*.

4 – Amplificação do *locus FGFR4* foi demonstrada predominantemente em tumores adrenocorticais de adultos. Amplificação e hiperexpressão de *FGFR4* foram mais associadas a carcinomas adrenocorticais, sugerindo que estas alterações possam ser marcadores de malignidade em tumores adrenocorticais.

7 – Anexos

Anexo 1 – Dados clínicos e moleculares de sessenta e quatro pacientes com tumor adrenocortical.

Paciente (nº)	Idade (anos)	Sexo	Clínica	Diagnóstico	Weiss	MacFarlane	P53 (p.R337H)	RNA _m <i>IGF1R</i>	RNA _m <i>SF1</i>	IHQ <i>SF-1</i> (%)	RNA _m <i>FGFR4</i>
1	1	F	C/V	Adenoma	3	II	presente	1,69	1,11	50	6,42
2	73	M	C	Adenoma	0	I	ausente	ND	ND	ND	ND
3	29	M	C	Carcinoma	8	IV	ausente	1,06	1,68	0	10,17
4	2,1	F	V	Adenoma	1	I	presente	5,27	2,66	100	15,61
5	36	F	C	Adenoma	1	II	presente	ND	ND	0	ND
6	17	F	C	Adenoma	2	I	ausente	1,21	0,75	ND	0,53
7	2,2	M	V	Adenoma	4	II	presente	1,63	1,33	83,33	13,14
8	52	F	C	Adenoma	2	I	ausente	ND	ND	3,33	ND
9	70	F	C	Adenoma	0	I	ausente	ND	ND	ND	ND
10	2,1	F	V	Adenoma	1	I	presente	1,11	0,96	35	0,43
11	2,1	M	V	Adenoma	5	II	presente	2,28	0,69	50	16,92
12	27	F	C	Adenoma	1	I	ausente	0,61	1,1	0	2,72
13	29	F	C/V	Carcinoma	4	II	ausente	1,69	0,98	10	14,95
14	52	F	NF	carcinoma	ND	IV	ausente	ND	ND	ND	ND
15	17	M	F	Carcinoma	7	II	ausente	1,32	0,31	20	39,42
16	46	F	C	Adenoma	0	II	ausente	ND	ND	ND	ND
17	22	F	C	Adenoma	2	I	ausente	ND	ND	ND	ND
18	1,1	M	C/V	Adenoma	1	I	presente	1,16	1,58	6,67	6,88
19	12	F	V	Adenoma	2	II	ausente	ND	ND	ND	ND
20	15	F	V	Carcinoma	6	IV	presente	9,95	1,47	33,3	17,6
21	33	M	NF	Carcinoma	5	IV	presente	0,46	0,51	ND	5,36
22	36	F	C/V	Adenoma	3	I	ausente	1,43	2,32	10	0,96

23	30	M	NF	Carcinoma	4	III	ausente	0,46	0,29	0	4,06
24	3	M	V	Carcinoma	7	III	presente	10,62	0,87	3,33	5,31
25	37	F	C	Adenoma	2	I	ausente	11,48	5,93	0	9,85
26	35	F	C	Adenoma	1	I	ausente	0,47	1,41	10	1,56
27	19	F	C	Carcinoma	6	2	ausente	ND	ND	0	ND
28	49	F	C	Adenoma	2	1	ausente	0,65	0,95	0	1,66
29	47	F	C	Adenoma	1	I	ausente	ND	ND	ND	ND
30	46	F	C/V	Carcinoma	7	III	ausente	5	0,3	0	8,53
31	23	F	C/V	Carcinoma	5	III	ausente	ND	ND	ND	ND
32	17	F	C/V	Carcinoma	7	IV	presente	ND	ND	ND	ND
33	34	M	C	Adenoma	1	I	ausente	ND	ND	ND	ND
34	2,5	F	V	Adenoma	7	II	presente	4,67	1,26	15	28,23
35	1,6	F	V	Adenoma	ND	I	presente	3,34	1,08	ND	17,73
36	1	F	C/V	Carcinoma	4	II	presente	4,04	1,08	26,67	8,22
37	19	F	C/V	Carcinoma	8	II	presente	3,43	1,22	73,33	13,76
38	23	F	C/V	Carcinoma	6	IV	presente	0,9	1,72	53,33	15,22
39	41	F	C/V	Adenoma	0	II	ausente	ND	ND	ND	ND
40	1,2	F	V	Adenoma	5	I	presente	2,62	0,85	55	9,17
41	64	F	C	Adenoma	0	I	ausente	2,67	1,15	10	1,72
42	31	F	C	Adenoma	2	I	ausente	ND	ND	ND	ND
43	27	F	C	Adenoma	1	I	ausente	1,89	2,81	0	2,51
44	28	F	C	Adenoma	0	1	ausente	0,45	0,84	0	1,24
45	39	F	C	Adenoma	1	I	ausente	0,77	0,35	45	0,79
46	26	F	C/V	Carcinoma	8	II	presente	ND	ND	ND	ND
47	66	F	NF	Adenoma	4	II	ausente	2,83	0,08	80	0,21
48	9	M	C	Adenoma	2	I	ausente	1,47	0,9	33,33	0,47
49	1,1	F	V	Adenoma	2	I	ausente	3,51	0,76	96,67	3,92
50	2	F	C/V	Adenoma	7	II	ausente	9,5	1,05	0	3,84

51	37	F	C	Carcinoma	3	II	ausente	ND	ND	ND	ND
52	2,6	M	V	Carcinoma	5	III	presente	7,4	1,01	56,67	8,51
53	45	F	NF	Adenoma	0	I	ausente	0,98	0,38	ND	1,33
54	17	F	V	Carcinoma	4	II	ausente	2,95	0,26	0	14,49
55	2,8	F	V	Adenoma	2	I	presente	2,1	1,6	70	10,72
56	2,2	F	V	Adenoma	2	II	presente	2,39	4,32	80	1,54
57	37	F	C/V	Carcinoma	6	II	ausente	ND	ND	0	ND
58	24	F	C	Adenoma	1	I	ausente	1,89	2,55	0	1,58
59	22	F	V	Carcinoma	7	III	ausente	0,83	1	ND	19,39
60	39	F	C	Adenoma	2	I	ausente	ND	ND	0	ND
61	41	F	C	Adenoma	1	I	ausente	1,22	1,91	ND	2
62	44	F	NF	Carcinoma	8	IV	ausente	2,62	0,22	20	3,7
63	2,5	F	V	Adenoma	1	I	presente	2,94	0,68	86,67	7,03
64	9	F	C/V	Adenoma	7	II	ausente	13	6,9	33,33	167

C: síndrome de Cushing, V: virilização, C/V: síndrome de Cushing e virilização, F: feminilização, NF: não funcionante, F: sexo feminino, M: sexo masculino, ND: dados não disponíveis

Anexo 2A – Lista das sondas presentes no ensaio de MLPA P217 IGF1R

Tamanho (pb)	Sondas	Localização cromossômica		
		Controle	<i>IGF1R</i>	<i>IGFBP3</i>
92	Sonda controle	2q14		
136	Sonda controle 3797-L04594	21q22		
148	Sonda IGF1R 7604-L09264		Exon 15	
160	Sonda IGF1R 7606-L07291		Exon 17	
172	Sonda IGF1R 7599-L07284		Exon 10	
184	Sonda IGF1R 7603-L07288		Exon 14	
190	Sonda IGF1R 4791-L04166		Exon 3	
196	Sonda IGF1R 7609-L07294		Exon 20	
208	Sonda controle 7794-L07530	8q24		
214	Sonda IGF1R 7610-L07295		Exon 21	
226	Sonda IGF1R 7597-L07282		Exon 8	
232	Sonda IGFBP3 7617-L09265			Exon 5
238	Sonda IGF1R 7598-L07283		Exon 9	
247	Sonda controle 2755-L02204	11p13		
256	Sonda IGF1R 7605-L08918		Exon 16	
265	Sonda IGF1R 4789-L04164		Exon 1	
274	Sonda IGF1R 7600-L07285		Exon 11	
283	Sonda IGF1R 7611-L07296		Exon 21	
292	Sonda controle 5296-L04684	3q11		
301	Sonda IGF1R 7601-L07286		Exon 12	
310	Sonda IGFBP3 7612-L08916			Exon 1
319	Sonda IGF1R 7602-L07287		Exon 13	
328	Sonda controle 2663-L02130	11q23		
337	Sonda controle 3264-L02701	3q29		
346	Sonda IGF1R 7608-L08917		Exon 19	
355	Sonda IGF1R 4790-L04165		Exon 2	
364	Sonda IGFBP3 7613-L08913			Exon 2
373	Sonda IGF1R 7595-L07280		Exon 6	
382	Sonda controle 1086-L00651	15q26 2,8 Mb telômero de <i>IGF1R</i>		
391	Sonda IGFBP3 7615-L09267			Exon 4
400	Sonda IGF1R 0445-L00018		Exon 21	
409	Sonda IGF1R 7594-L07279		Exon 5	
418	Sonda controle 1755-L01295	15q26 2,0 Mb telômero de <i>IGF1R</i>		
426	Sonda IGFBP3 7616-L09266			Exon 5
436	Sonda IGF1R 7596-L07281		Exon 7	
445	Sonda IGFBP3 7614-L07299			Exon 3
454	Sonda IGF1R 7607-L07292		Exon 18	
472	Sonda controle 4703-L04081	1p36		

Anexo 2B – Lista das sondas presentes no ensaio de MLPA P185-B1
Intersex

Tamanho (pb)	Sondas	Localização cromossômica		
		Controle	SOX9	Outras
130	Sonda controle 0797-L00463	5q31		
136	Sonda SOX9 7156-L06795		Exon 1	
142	Sonda controle 2956-L02388	7q31		
148	Sonda NR0B1 6048-L05503			Xp21.2 5' Exon 1
154	Sonda NR5A1 9676-L10048			Exon 5
160	Sonda SRY 2153-L00596			Yp11.3
166	Sonda SOX9 6051-L05506		Exon 1	
172	Sonda CYP21A2 1974-L01507			CYP21A2 Exon 3
178	Sonda controle 5976-L05401	20p12		
184	Sonda WNT4 6054-L05509			Exon 1
193	Sonda controle 1567-L01139	22q12		
202	Sonda CYP21A2 4804-L04179			CYP21A2 Exon 1
211	Sonda controle 1483-L01091	16q24		
220	Sonda SOX9 9604-L12188		17q24	
226	Sonda COL4A5 5874-L05274			Xq22
232	Sonda NR0B1 6049-L12569			Xp21.2 Exon 1
239	Sonda UTY 1071-L00464			Yq11
246	Sonda controle 2869-L02336	1p21		
255	Sonda SOX9 6052-L05507		Exon 2	
265	Sonda CYP21A1P 9536-04181			CYP21A1P Exon 1
274	Sonda WNT4 7159-L06798			Exon 4
283	Sonda NR5A1 9674-L12567			Exon 3
292	Sonda WNT4 6055-L05510			Exon 2
302	Sonda SOX9 11501-L09981		17q24	
310	Sonda NR0B1 6050-L05505			Xp21.2 Exon 2
319	Sonda SOX9 11500-L09982		17q24	
328	Sonda NR5A1 9677-L12238			Exon 6
337	Sonda SOX9 6053-L05508		Exon 3	
346	Sonda NR5A1 9673-L12239			Exon 1
353	Sonda CYP21A1P 4807-L04182			CYP21A1P Exon 10
364	Sonda controle 4357-L03777	7q21		
373	Sonda PHEX 07111-L06691			Xp22
382	Sonda SOX9 9607-L09980		17q24	
390	Sonda WNT4 6056-L05511			Exon 5
400	Sonda WNT4 7158-L06797			Exon 3
409	Sonda NR5A1 9675-L10047			Exon 4
418	Sonda SOX9 9606-L09979		17q24	
427	Sonda GJB1 6188-L02097			Xq13
436	Sonda PQBP1 7886-L07700			Xp11
445	Sonda controle 8793-L08817	10q21		

Anexo 2C – Lista das sondas presentes no ensaio de MLPA P026-C1 Sotos

Tamanho (pb)	Sondas	Localização cromossômica	
		Controle	NSD1
130	Sonda controle 0797-L00463	5q31	
136	Sonda controle 1662-L01237	11q23	
142	Sonda NSD1 2589-L11228		Exon 4
148	Sonda NSD1 2595-L11229		Exon 13
154	Sonda controle 2417-L01864	6p21	
160	Sonda NSD1 2597-L02068		Exon 16
166	Sonda NSD1 2602-L11230		Exon 1
172	Sonda controle 3087-L02487	3p22	
178	Sonda NSD1 1301-L11231		Exon 23
184	Sonda NSD1 2590-L11232		Exon 7
193	Sonda controle 1567-L01139	22q12	
202	Sonda NSD1 3225-L11233		Exon 10
211	Sonda NSD1 1303-L00855		Exon 17
220	Sonda controle 1119-L00559	10q22	
229	Sonda NSD1 1304-L00854		Exon 14
238	Sonda NSD1 2591-L02062		Exon 8
247	Sonda NSD1 1305-L00853		Exon 11
256	Sonda controle 1491-L01099	16q24	
265	Sonda NSD1 1306-L11227		Exon 6
274	Sonda controle 2406-L01852	16q22	
283	Sonda NSD1 1307-L00851		Exon 5
292	Sonda NSD1 2592-L02063		Exon 9
301	Sonda NSD1 1308-L11226		Exon 3
310	Sonda controle 2140-L01633	3p25	
319	Sonda NSD1 1309-L00849		Exon 23
328	Sonda controle 0962-L00549	3q12	
337	Sonda NSD1 1310-L11225		Exon 1
346	Sonda NSD1 2596-L11224		Exon 15
355	Sonda FGFR4 1311-L00859		
364	Sonda NSD1 2601-L02072		Exon 22
373	Sonda FGFR4 2243-L03902		
382	Sonda controle 0470-L00053	5q33	
391	Sonda FLT4 1137-L00695		
400	Sonda NSD1 2598-L02069		Exon 18
409	Sonda controle 0963-L09340	2p14	
418	Sonda NSD1 3350-L11223		Exon 20
427	Sonda NSD1 2599-L02070		Exon 19
436	Sonda controle 2188-L01686	1p36	
445	Sonda NSD1 2594-L11222		Exon 12
454	Sonda NSD1 2600-L02071		Exon 21
463	Sonda controle 1800-L01364	13q14	

Anexo 3 – Análises imunohistoquímicas de SF-1 em tumores adrenocorticais.

A: Carcinoma adrenocortical não funcionante diagnosticado em uma paciente adulta com imunorreatividade negativa para SF-1; **B:** Adenoma adrenocortical virilizante de uma paciente adulta com marcação nuclear fraca para SF-1; **C:** Adenoma adrenocortical virilizante diagnosticado em uma criança de 6 anos com imunorreatividade positiva para SF-1 no núcleo; **D:** Adenoma adrenocortical pediátrico virilizante com imunorreatividade nuclear expressiva para SF-1.

Anexo 4 – Artigo publicado.**Steroidogenic Factor 1 Overexpression and Gene Amplification Are More frequent in Adrenocortical Tumors from Children than from Adults**

Madson Q. Almeida, Ibere Cauduro Soares, Tamaya C. Ribeiro, Maria Candida B. V. Fragoso, Lidiane V. Marins, Alda Wakamatsu, Rodrigo A. Ressio, Mirian Y. Nishi, Alexander A. L. Jorge, Antonio M. Lerario, Venancio A. F. Alves, Berenice B. Mendonca e Ana Claudia Latronico

J Clin Endocrinol Metab, March 2010, 95(3):0000–0000

Steroidogenic Factor 1 Overexpression and Gene Amplification Are More Frequent in Adrenocortical Tumors from Children than from Adults

Madson Q. Almeida, Ibere Cauduro Soares, Tamaya C. Ribeiro, Maria Candida B. V. Fragoso, Lidianie V. Marins, Alda Wakamatsu, Rodrigo A. Ressio, Mirian Y. Nishi, Alexander A. L. Jorge, Antonio M. Lerario, Venancio A. F. Alves, Berenice B. Mendonca, and Ana Claudia Latronico

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (M.Q.A., T.C.R., M.C.B.V.F., M.Y.N., A.A.L.J., A.M.L., B.B.M., A.C.L.), Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/Laboratório de Investigação Médica 42) da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas, and Divisão de Anatomia Patologia, Laboratório de Patologia Hepática/LIM14 do Hospital das Clínicas (I.C.S., L.V.M., A.W., R.A.R., V.A.F.A.), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 05403-900 São Paulo, Brasil

Background: Steroidogenic factor 1 (SF-1) is a key determinant of endocrine development and function of adrenal cortex. SF-1 overexpression and gene amplification were previously demonstrated in a small group of pediatric adrenocortical tumors.

Objective: Our objective was to determine the frequency of SF-1 protein expression and gene amplification in a large cohort of pediatric and adult adrenocortical tumors.

Patients: SF-1 protein expression was assessed in a cohort of 103 adrenocortical tumors from 36 children and 67 adults, whereas gene amplification was studied in 38 adrenocortical tumors (17 from children).

Methods: Tissue microarray, multiplex ligation-dependent probe amplification, and quantitative real-time PCR were used.

Results: A strong nuclear SF-1 expression was detected by tissue microarray in 56% (20 of 36) and 19% (13 of 67) of the pediatric and adult adrenocortical tumors, respectively ($P = 0.0004$). Increased SF-1 copy number was identified in 47% (eight of 17) and 10% (two of 21) of the pediatric and adult adrenocortical tumors, respectively ($P = 0.02$). All adrenocortical tumors with SF-1 gene amplification showed a strong SF-1 staining, whereas most of the tumors (61%) without SF-1 amplification displayed a weak or negative staining ($P = 0.0008$). Interestingly, a strong SF-1 staining was identified in five (29%) pediatric adrenocortical tumors without SF-1 amplification. The frequency of SF-1 overexpression and gene amplification was similar in adrenocortical adenomas and carcinomas.

Conclusion: We demonstrated a higher frequency of SF-1 overexpression and gene amplification in pediatric than in adult adrenocortical tumors, suggesting an important role of SF-1 in pediatric adrenocortical tumorigenesis. (*J Clin Endocrinol Metab* 95: 0000–0000, 2010)

Adrenocortical carcinoma is a rare malignancy with incompletely understood pathogenesis and poor prognosis (1). However, a remarkably high annual incidence of adrenocortical tumors has been reported in chil-

dren younger than 15 yr from Southern Brazil, where a high prevalence of a germline mutation of the P53 tumor suppressor (p.R337H) was reported (2, 3). Besides important differences in prognosis, adrenocortical tumor-

igenesis also has distinct patterns between children and adults (4, 5).

Steroidogenic factor 1 (SF-1) is an orphan member of the nuclear receptor family of transcription factors and plays an important role in endocrine function, including the regulation of steroid hydroxylases, development and function of the adrenal cortex, and male sexual differentiation (6). *SF-1* maps to 9q33.3, a chromosomal region associated with amplification in pediatric adrenocortical tumors (7). *Sf-1* dosage regulates compensatory adrenal growth after unilateral adrenalectomy in mice (8). Furthermore, increased *SF-1* dosage promotes cell proliferation and triggers tumorigenesis in mice (9).

An increased *SF-1* copy number was detected in eight of nine adrenocortical tumors diagnosed in Brazilian children using fluorescence *in situ* hybridization, suggesting an association between *SF-1* gene amplification and pediatric adrenocortical tumorigenesis (10). All these adrenocortical tumors also had SF-1 protein overexpression (11). The aim of our study was to investigate SF-1 expression and gene amplification in a larger cohort of pediatric and adult adrenocortical tumors and evaluate the prognostic value of these findings.

Patients and Methods

The study was approved by the Ethics Committee of Hospital das Clínicas, Sao Paulo, Brazil, and informed written consent was obtained from all patients and/or parents. SF-1 protein expression was assessed in adrenocortical tumors obtained from 36 children (30 adenomas and six carcinomas) and 67 adults (40 adenomas and 27 carcinomas) (Table 1). Thirty-eight samples from these sporadic adrenocortical tumors (17 children and 21 adults; 22 adenomas and 16 carcinomas) were used to analyze *SF-1* amplification and gene expression. Endocrine syndromes were diagnosed in all children with adrenocortical tumors (isolated Cushing syndrome 8.3%, virilization 58.3%, and mixed 33.3%). Cushing syndrome was present in 48% of adults with

adrenocortical tumors, whereas 25% of adrenocortical tumors in this group were nonfunctioning. Virilization or mixed syndrome occurred in 9 and 18% of adrenocortical tumors in adults, respectively. The diagnosis of malignancy in the pediatric group was established by an advanced tumor stage (III or IV) and/or poor clinical outcome, whereas Weiss criteria were used in adult adrenocortical tumors.

Tissue microarray (TMA) and immunohistochemical analysis

Representative areas of the 109 adrenocortical tumors were identified on hematoxylin- and eosin-stained slides and marked on paraffin donor blocks. The spotted areas of donor blocks were punched (1.0 mm punch) and mounted into a recipient paraffin block using a precision microarray instrument (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). One set of three slides was selected (one slide from each TMA block of the triplicate) for staining with SF-1 monoclonal antibody (N1665 clone; PPMX Perseus Proteomics, Komaba, Japan) (12, 13). An immunoperoxidase immunohistochemical modified method with humid heat antigen retrieval was used as previously described (14). Loss of tissue sample occurred in 5.5% of the spots. Therefore, SF-1 immunoreactivity was analyzed in 103 tumor tissue samples. Two investigators (ICS and LVM), who were unaware of clinical data, independently evaluated SF-1 staining. The staining intensity and the percentage of positive tumor nuclei were calculated for each specimen to obtain a final semiquantitative H score, as previously described (15). The median H score value of 13 normal adrenals was chosen as the cutoff point for separating tumors with strong and weak SF-1 staining. The intra-observer variability was $8.4 \pm 2.5\%$. The inter-observer agreement was 0.89. The mean of the two evaluations was taken for statistical analysis.

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

SF-1 copy number was determined using the SALSA MLPA kit P185-B1 Intersex (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), which contains five probes for *SF-1* gene (exons 1 and 3–6). Genomic DNA from adrenocortical tumors and five normal adrenals was isolated using standard procedures. MLPA was performed as previously described (16). The tumor sample nor-

TABLE 1. Clinical characteristics of 103 patients with adrenocortical tumors according to SF-1 staining

	Children (n = 36)		Adults (n = 67)	
	Weak/negative SF-1 staining (n = 16)	Strong SF-1 staining (n = 20)	Weak/negative SF-1 staining (n = 54)	Strong SF-1 staining (n = 13)
Age (yr)	3.4 $\pm$ 1.2	3.8 $\pm$ 0.8	36.6 $\pm$ 1.7	39.1 $\pm$ 4.8
Sex (female to male)	3:1	2.3:1	6.8:1	12:1
Follow-up (months)	116.7 $\pm$ 21.4	72.5 $\pm$ 11.2	67.8 $\pm$ 8.4	53.5 $\pm$ 18.5
Clinical presentation				
Cushing	2 (12%)	1 (5%)	25 (46%)	7 (54%)
Virilizing	7 (44%)	14 (70%)	6 (11%)	0
Mixed	7 (44%)	5 (5%)	10 (19%)	2 (15%)
Nonfunctioning	0	0	13 (24%)	4 (31%)
Diagnosis				
Adenoma	13 (81%)	17 (85%)	33 (61%)	7 (54%)
Carcinoma	3 (19%)	3 (15%)	21 (39%)	6 (46%)

malized peak area was then divided by the average normalized peak area from normal adrenals. Dosage quotient areas outside the range 0.70–1.3 were considered abnormal.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

SF-1 amplification was also analyzed by qRT-PCR using SYBR Green in an ABI 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR cycling conditions were as follows: 2 min at 95 C, 40 cycles of 95 C for 15 sec and 60 C for 30 sec, and a final step at 72 C for 30 sec. The primer sequences for *SF-1* and *NPC-1* genes are available in supplemental Table 1 (published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>). A cycle threshold (C_T) value in the linear range of amplification was selected for each sample in triplicate and normalized to *NPC-1*. *SF-1* dosage was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. The normalized value (ΔC_T) for each tumor sample was then compared with the mean ΔC_T of five normal adrenals to produce a fold change ratio (normal = 1) and multiplied by 2 to generate a copy number (normal = 2).

After surgical resection, tumor fragments were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until total RNA extraction using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNA was generated using the High Capacity kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed using TaqMan Gene Expression Assays according to the manufacturer's instructions. The assay IDs were *SF-1*, Hs00610436_m1, and β -actin, 43263. The relative expression levels were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. The mean expression of the target genes in a pool of 61 normal adrenals (Clontech, Palo Alto, CA) was assigned an expression value of 1.0, and fold change in the *SF-1* expression levels was determined for each tumor sample.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with the SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL). Weighted κ -coefficient of agreement was used to evaluate the agreement between the observers. Categorical variables were compared using χ^2 test. Continuous data are expressed as mean $\pm$ SEM. Differences in expression levels were analyzed by the two-tailed Mann-Whitney *U* test. *P* values <0.05 were considered significant.

Results

The frequency of adrenocortical tumors showing strong SF-1 staining was 56% (20 of 36) and 19% (13 of 67) in children and adults, respectively ($\chi^2 = 12.1$; $P = 0.0004$) (Table 1 and Fig. 1). Pediatric adrenocortical tumors with strong SF-1 staining were more associated with isolated virilizing syndrome than pediatric adrenocortical tumors with weak SF-1 staining (70 vs. 44%, respectively) (Table 1).

On the other side, Cushing syndrome (isolated or associated with virilization) was more frequent in pediatric adrenocortical tumors with weak SF-1 staining when compared with SF-1-positive tumors in children (56 vs. 10%, respectively). In adults, the frequency of nonfunc-

FIG. 1. Immunohistochemical analysis for SF-1 in adrenocortical tumors. A, Nonfunctioning adrenocortical carcinoma diagnosed in an adult patient showing a negative SF-1 nuclear immunoreactivity; B, virilizing adrenocortical adenoma from an adult patient displaying a weak SF-1 staining on nuclei; C, virilizing adrenocortical adenoma diagnosed in a 6-yr-old girl showing a strong SF-1 staining on nuclei; D, pediatric adrenocortical adenoma from a patient with virilization displaying a strong nuclear SF-1 immunoreactivity (arrows indicate infiltration with inflammatory cells). Magnification, $\times 400$.

tioning tumors was not significantly different between adrenocortical tumors with weak and strong SF-1 staining (24 vs. 31%, respectively). In addition, SF-1 immunoreactivity was similar in adrenocortical adenomas and carcinomas diagnosed in children and adults (Table 1).

SF-1 gene amplification was detected in eight (47%) of 17 pediatric adrenocortical tumors and in two (10%) of 21 adult adrenocortical tumors ($\chi^2 = 5.02$; $P = 0.02$) (supplemental Fig. 1). *SF-1* amplification was detected in both adrenocortical adenomas ($n = 5$) and carcinomas ($n = 5$) (supplemental Table 2). Among the 10 cases with increased *SF-1* copy number, nine tumors showed three copies and one had four copies of the *SF-1* gene. An increased copy number of *SF-1* was detected by both MLPA and qRT-PCR in five of 10 adrenocortical tumors, whereas in the remaining adrenocortical tumors, *SF-1* amplification was demonstrated only by qRT-PCR ($n = 4$) or MLPA ($n = 1$). The *SF-1* mRNA levels were significantly higher in adrenocortical tumors associated with increased *SF-1* gene copies when compared with adrenocortical tumors without gene amplification (fold change, 2.3 ± 0.52 vs. 1.16 ± 0.18 , respectively; $P = 0.001$). In addition, all adrenocortical tumors with *SF-1* gene amplification showed a strong SF-1 staining, whereas most of the tumors (61%) without *SF-1* amplification displayed a weak or negative staining ($P = 0.0008$). Interestingly, a strong SF-1 staining was identified in five pediatric adrenocortical tumors (four adenomas and one carcinoma) without *SF-1* amplification. The R337H P53 mutation was

previously identified in seven of 10 patients (five children and two adults) with amplification of *SF-1* in adrenocortical tumors (3).

SF-1 deletion was detected only in a cortisol-secreting adrenocortical adenoma diagnosed in a 37-yr-old patient. Decreased mRNA levels and a negative immunoreactivity for SF-1 were demonstrated in this adrenocortical tumor with *SF-1* deletion.

Discussion

SF-1 is a key determinant of endocrine development, and its expression is mainly restricted to the gonads, adrenal cortex, anterior pituitary, and hypothalamus (6). The increased *SF-1* dosage modulates the expression of transcripts involved in cell cycle and apoptosis (9). High frequency of *SF-1* amplification and overexpression was previously demonstrated in a small group of pediatric adrenocortical tumors associated with 9q gain (10, 11). Here, we investigated protein expression and gene amplification of SF-1 in a larger cohort of pediatric tumors as well as in a cohort of adult adrenocortical tumors. The frequency of SF-1 nuclear overexpression was significantly higher in adrenocortical tumors diagnosed in children than in adults. Additionally, an increased copy number of *SF-1* was identified in 47% of pediatric adrenocortical tumors, whereas this finding was detected in only 10% of adult adrenocortical tumors. Therefore, our data confirm the importance of *SF-1* dosage in an expanded group of pediatric adrenocortical tumors.

Adrenocortical tumors with *SF-1* amplification showed high *SF-1* mRNA levels and protein expression. Interestingly, SF-1 nuclear overexpression was identified in pediatric adrenocortical tumors without *SF-1* amplification. Indeed, posttranslational modifications are known to influence the activity and transcriptional capacity of SF-1 (17, 18). Phosphorylation-dependent SF-1 activation is likely mediated by the MAPK signaling pathway (17). Recently, it was demonstrated that SF-1-mediated transcription in adrenocortical cancer cells is mediated through cyclin-dependent kinase 7 (CDK7)-induced phosphorylation (18). Cdk7 overexpression was identified in a wide range of cancer cell lines (19). Therefore, additional molecular mechanisms might modulate SF-1 expression and/or activity in childhood adrenocortical tumors without *SF-1* amplification.

SF-1 expression was previously demonstrated to be high in virilizing adrenocortical tumors and low in aldosteronomas (20). In this study, a strong SF-1 staining was associated with a higher frequency of isolated virilizing syndrome in children with adrenocortical tumors, whereas Cushing syndrome was more frequent in pediatric adre-

nocortical tumors with weak SF-1 expression. In adults, the hormonal status of adrenocortical tumors with strong, and weak SF-1 staining was similar. Additionally, SF-1 expression was not different between functioning and nonfunctioning adrenocortical tumors.

Increased *SF-1* dosage promotes proliferation of human adrenocortical cells as well as controls the expression of transcripts involved in the cell cycle, apoptosis, and cell adhesion (9). Although *SF-1* gene has been associated with pediatric adrenocortical tumorigenesis, its prognostic value was not previously investigated (10, 11). In this study, SF-1 nuclear immunoreactivity was similar in adrenocortical adenomas and carcinomas from children and adults, suggesting that this factor plays a role in both benign and malignant tumor pathogenesis.

In conclusion, overexpression and increased copy number of SF-1 were identified mainly in adrenocortical tumors diagnosed in children than in adults. These findings indicate a more important role of SF-1 in pediatric adrenocortical tumorigenesis. In addition, SF-1 expression was similar in adrenocortical adenomas and carcinomas diagnosed in both pediatric and adult patients.

Acknowledgments

We thank Dr. Maria Claudia Nogueira Zerbini from the Department of Pathology, School of Medicine, University of Sao Paulo, for her collaboration to obtain normal adrenal tissue samples.

Address all correspondence and requests for reprints to: Madson Q. Almeida, M.D., Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (Laboratório de Investigação Médica 42), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 20 andar Bloco 6, 05403-900 São Paulo, SP, Brasil. E-mail: madsonalmeida@usp.br.

This work was supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grants 05/04726-0 and 06/00244-3 (to M.Q.A.) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Grants 300209/2008-09 (to A.C.L.), 307951/06-5 (to A.A.L.J.), and 301339/2008-09 (to B.B.M.).

Disclosure Summary: We declare no duality of financial interest or direct or indirect conflict of interest on the part of any author of this manuscript.

References

1. Latronico AC, Chrousos GP 1997 Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1317–1324
2. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G, Cat I, Stratakis CA, Sandrini R 2001 An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9330–9335

3. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB 2001 An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4970–4973
4. Almeida MQ, Latronico AC 2007 The molecular pathogenesis of childhood adrenocortical tumors. *Horm Metab Res* 39:461–466
5. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, Costa MH, Lerario AM, Maciel CC, Mattos GE, Jorge AA, Mendonca BB, Latronico AC 2008 Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3524–3531
6. Parker KL, Schimmer BP 1997 Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 18:361–377
7. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, Young HM, Haddad BR 1999 Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1116–1121
8. Beuschlein F, Mutch C, Bavers DL, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Keegan C, Hammer GD 2002 Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology* 143:3122–3135
9. Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, Arhatte M, De Moura J, Cavalli LR, Virolle V, Barbry P, Zambetti GP, Figueiredo BC, Heckert LL, Lalli E 2007 Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol* 21:2968–2987
10. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, Zambetti G, DeLacerda L, Rodrigues GA, Haddad BR 2005 Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 90:615–619
11. Pianovski MA, Cavalli LR, Figueiredo BC, Santos SC, Doghman M, Ribeiro RC, Oliveira AG, Michalkiewicz E, Rodrigues GA, Zambetti G, Haddad BR, Lalli E 2006 SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer* 42:1040–1043
12. Suh JM, Yu CT, Tang K, Tanaka T, Kodama T, Tsai MJ, Tsai SY 2006 The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney. *Mol Endocrinol* 20:3412–3420
13. Qin J, Suh JM, Kim BJ, Yu CT, Tanaka T, Kodama T, Tsai MJ, Tsai SY 2007 The expression pattern of nuclear receptors during cerebellar development. *Dev Dyn* 236:810–820
14. Shi SR, Key ME, Kalra KL 1991 Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39:741–748
15. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC 2006 DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 355:983–991
16. De Luca A, Bottillo I, Dasdia MC, Morella A, Lanari V, Bernardini L, Divona L, Giustini S, Sinibaldi L, Novelli A, Torrente I, Schirinzi A, Dallapiccola B 2007 Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet* 44:800–808
17. Hammer GD, Krylova I, Zhang Y, Darimont BD, Simpson K, Weigel NL, Ingraham HA 1999 Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* 3:521–526
18. Yang WH, Heaton JH, Brevig H, Mukherjee S, Iñiguez-Lluhí JA, Hammer GD 2009 SUMOylation inhibits SF-1 activity by reducing CDK7-mediated serine 203 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 29:613–625
19. Bartkova J, Zemanova M, Bartek J 1996 Expression of CDK7/CAK in normal and tumor cells of diverse histogenesis, cell-cycle position and differentiation. *Int J Cancer* 66:732–737
20. Kiiveri S, Liu J, Arola J, Heikkilä P, Kuulasmaa T, Lehtonen E, Voutilainen R, Heikinheimo M 2005 Transcription factors GATA-6, SF-1, and cell proliferation in human adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* 233:47–56

8 – Referências

1. Abecassis M, McLoughlin MJ, Langer B, Kudlow JE. Serendipitous adrenal masses: prevalence, significance, and management. *Am J Surg* 1985 Jun;149(6):783-8.
 2. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* 2000 Feb 15;88(4):711-36.
 3. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Jul;82(7):2027-31.
 4. Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 May;82(5):1317-24.
 5. Thompson GB, Young WF, Jr. Adrenal incidentaloma. *Curr Opin Oncol* 2003 Jan;15(1):84-90.
 6. Young WF, Jr. Management approaches to adrenal incidentalomas. A view from Rochester, Minnesota. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000 Mar;29(1):159-85, x.
 7. Ng L, Libertino JM. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol* 2003 Jan;169(1):5-11.
 8. Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CA, Saldanha LB, Latronico AC, Zerbini C, et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol* 1995 Dec;154(6):2004-9.
 9. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol* 1984 Mar;8(3):163-9.
 10. Wieneke JA, Thompson LD, Heffess CS. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol* 2003 Jul;27(7):867-81.
 11. Macfarlane DA. Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. *Ann R Coll Surg Engl* 1958 Sep;23(3):155-86.
-

-
12. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. Adrenal cortical carcinoma. *J Urol*1978 Dec;120(6):660-5.
 13. Tauchmanova L, Colao A, Marzano LA, Sparano L, Camera L, Rossi A, et al. Adrenocortical carcinomas: twelve-year prospective experience. *World J Surg*2004 Sep;28(9):896-903.
 14. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*2000 Jan 7;100(1):57-70.
 15. Bertherat J, Bertagna X. Pathogenesis of adrenocortical cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*2009 Apr;23(2):261-71.
 16. Beuschlein F, Reincke M, Karl M, Travis WD, Jaursch-Hancke C, Abdelhamid S, et al. Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Res*1994 Sep 15;54(18):4927-32.
 17. Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, Louvel A, Chapuis Y, Luton JP, et al. Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*1994 Apr;40(4):465-77.
 18. Soon PS, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *Oncologist*2008 May;13(5):548-61.
 19. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*1991 Jul 5;253(5015):49-53.
 20. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*1991 Jun 6;351(6326):453-6.
 21. Birch JM, Blair V, Kelsey AM, Evans DG, Harris M, Tricker KJ, et al. Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene*1998 Sep 3;17(9):1061-8.
 22. Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol*1997 Jan;150(1):1-13.
 23. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-
-

specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jul 31;98(16):9330-5.

24. Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet* 2006 Jan;43(1):91-6.

25. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Oct;86(10):4970-3.

26. Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, Domenice S, Mendonca BB, Latronico AC. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004 Oct;48(5):647-50.

27. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol* 2002 Jan;9(1):12-6.

28. DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 1991 Feb 22;64(4):849-59.

29. Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E, Tycko B. Tumour-suppressor activity of H19 RNA. *Nature* 1993 Oct 21;365(6448):764-7.

30. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, et al. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995 Mar 15;9(6):650-62.

31. Ferguson-Smith AC, Sasaki H, Cattanaach BM, Surani MA. Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene. *Nature* 1993 Apr 22;362(6422):751-5.

32. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, Costa MH, et al. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 Sep;93(9):3524-31.

-
33. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, et al. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Feb;90(2):615-9.
 34. Pianovski MA, Cavalli LR, Figueiredo BC, Santos SC, Doghman M, Ribeiro RC, et al. SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer* 2006 May;42(8):1040-3.
 35. Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995 Feb;16(1):3-34.
 36. Werner H, Roberts CT, Jr. The IGF1 receptor gene: a molecular target for disrupted transcription factors. *Genes Chromosomes Cancer* 2003 Feb;36(2):113-20.
 37. Fottner C, Hoeflich A, Wolf E, Weber MM. Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis. *Horm Metab Res* 2004 Jun;36(6):397-405.
 38. Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res* 2008 Oct 15;14(20):6364-70.
 39. Werner H, Bruchim I. The insulin-like growth factor-I receptor as an oncogene. *Arch Physiol Biochem* 2009 May;115(2):58-71.
 40. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 2007 Feb;28(1):20-47.
 41. Ryan PD, Goss PE. The emerging role of the insulin-like growth factor pathway as a therapeutic target in cancer. *Oncologist* 2008 Jan;13(1):16-24.
 42. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 2000 Sep 20;92(18):1472-89.
 43. Baserga R, Rubin R. Cell cycle and growth control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1993;3(1):47-61.
 44. Ilvesmaki V, Kahri AI, Miettinen PJ, Voutilainen R. Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in
-

functional adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*1993 Sep;77(3):852-8.

45. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science*1998 Jan 23;279(5350):563-6.

46. Voutilainen R, Miller WL. Developmental and hormonal regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and steroidogenic enzymes in human fetal adrenals and gonads. *DNA*1988 Jan-Feb;7(1):9-15.

47. Weber MM, Kiess W, Beikler T, Simmler P, Reichel M, Adelmann B, et al. Identification and characterization of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II/mannose-6-phosphate (IGF-II/M6P) receptors in bovine adrenal cells. *Eur J Endocrinol*1994 Mar;130(3):265-70.

48. Weber MM, Simmler P, Fottner C, Engelhardt D. Insulin-like growth factor II (IGF-II) is more potent than IGF-I in stimulating cortisol secretion from cultured bovine adrenocortical cells: interaction with the IGF-I receptor and IGF-binding proteins. *Endocrinology*1995 Sep;136(9):3714-20.

49. Fottner C, Engelhardt D, Weber MM. Regulation of steroidogenesis by insulin-like growth factors (IGFs) in adult human adrenocortical cells: IGF-I and, more potently, IGF-II preferentially enhance androgen biosynthesis through interaction with the IGF-I receptor and IGF-binding proteins. *J Endocrinol*1998 Sep;158(3):409-17.

50. Hesse V, Jahreis G, Schambach H, Vogel H, Vilser C, Seewald HJ, et al. Insulin-like growth factor I correlations to changes of the hormonal status in puberty and age. *Exp Clin Endocrinol*1994;102(4):289-98.

51. Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci*2000 Jul;57(7):1050-93.

52. De Meyts P, Wallach B, Christoffersen CT, Urso B, Gronskov K, Latus LJ, et al. The insulin-like growth factor-I receptor. Structure, ligand-binding mechanism and signal transduction. *Horm Res*1994;42(4-5):152-69.

53. Butler AA, Yakar S, Gewolb IH, Karas M, Okubo Y, LeRoith D. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*1998 Sep;121(1):19-26.

-
54. Pappano WN, Jung PM, Meulbroek JA, Wang YC, Hubbard RD, Zhang Q, et al. Reversal of oncogene transformation and suppression of tumor growth by the novel IGF1R kinase inhibitor A-928605. *BMC Cancer*2009;9:314.
55. Abbott AM, Bueno R, Pedrini MT, Murray JM, Smith RJ. Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J Biol Chem*1992 May 25;267(15):10759-63.
56. Werner H, Hernandez-Sanchez C, Karnieli E, Leroith D. The regulation of IGF-I receptor gene expression. *Int J Biochem Cell Biol*1995 Oct;27(10):987-94.
57. Riedemann J, Macaulay VM. IGF1R signalling and its inhibition. *Endocr Relat Cancer*2006 Dec;13 Suppl 1:S33-43.
58. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev*1995 Apr;16(2):143-63.
59. Werner H, Stannard B, Bach MA, Roberts CT, Jr., LeRoith D. Regulation of insulin-like growth factor I receptor gene expression in normal and pathological states. *Adv Exp Med Biol*1991;293:263-72.
60. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*1993 Oct 8;75(1):59-72.
61. Sell C, Rubini M, Rubin R, Liu JP, Efstratiadis A, Baserga R. Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*1993 Dec 1;90(23):11217-21.
62. Habuchi T. Common genetic polymorphisms and prognosis of sporadic cancers: prostate cancer as a model. *Future Oncol*2006 Apr;2(2):233-45.
63. Wagner K, Hemminki K, Israelsson E, Grzybowska E, Soderberg M, Pamula J, et al. Polymorphisms in the IGF-1 and IGFBP 3 promoter and the risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*2005 Jul;92(2):133-40.
64. Werner H, LeRoith D. The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. *Adv Cancer Res*1996;68:183-223.
-

-
65. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Akiyama M, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell*2004 Mar;5(3):221-30.
66. Leboulleux S, Gaston V, Boulle N, Le Bouc Y, Gicquel C. Loss of heterozygosity at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor locus: a frequent but late event in adrenocortical tumorigenesis. *Eur J Endocrinol*2001 Feb;144(2):163-8.
67. Belfiore A. The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *Curr Pharm Des*2007;13(7):671-86.
68. Sachdev D, Yee D. Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. *Mol Cancer Ther*2007 Jan;6(1):1-12.
69. Sciacca L, Mineo R, Pandini G, Murabito A, Vigneri R, Belfiore A. In IGF-I receptor-deficient leiomyosarcoma cells autocrine IGF-II induces cell invasion and protection from apoptosis via the insulin receptor isoform A. *Oncogene*2002 Nov 28;21(54):8240-50.
70. Nakae J, Kido Y, Accili D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev*2001 Dec;22(6):818-35.
71. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev*1999 Dec;20(6):761-87.
72. Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, et al. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*1996 Jun;28(6):619-37.
73. Collett-Solberg PF, Cohen P. The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. *Endocrinol Metab Clin North Am*1996 Sep;25(3):591-614.
74. Parker KL. The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. *Mol Cell Endocrinol*1998 Oct 25;145(1-2):15-20.
75. Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol*1992 Aug;6(8):1249-58.
-

-
76. Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev*1997 Jun;18(3):361-77.
77. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab*1999 Mar;84(3):1116-21.
78. James LA, Kelsey AM, Birch JM, Varley JM. Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer*1999 Sep;81(2):300-4.
79. Zhao J, Speel EJ, Muletta-Feurer S, Rutimann K, Saremaslani P, Roth J, et al. Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions. Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis. *Am J Pathol*1999 Oct;155(4):1039-45.
80. Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P. Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer*2000 Jun;28(2):145-52.
81. Oba K, Yanase T, Nomura M, Morohashi K, Takayanagi R, Nawata H. Structural characterization of human Ad4bp (SF-1) gene. *Biochem Biophys Res Commun*1996 Sep 4;226(1):261-7.
82. Giguere V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev*1999 Oct;20(5):689-725.
83. Hoivik EA, Lewis AE, Aumo L, Bakke M. Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Mol Cell Endocrinol*2009 Jul 16.
84. Biason-Lauber A, Schoenle EJ. Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. *Am J Hum Genet*2000 Dec;67(6):1563-8.
85. Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan MP, Parker KL. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol*1993 Jul;7(7):852-60.
-

-
86. Sasano H, Shizawa S, Suzuki T, Takayama K, Fukaya T, Morohashi K, et al. Ad4BP in the human adrenal cortex and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab*1995 Aug;80(8):2378-80.
87. Takayama K, Sasano H, Fukaya T, Morohashi K, Suzuki T, Tamura M, et al. Immunohistochemical localization of Ad4-binding protein with correlation to steroidogenic enzyme expression in cycling human ovaries and sex cord stromal tumors. *J Clin Endocrinol Metab*1995 Sep;80(9):2815-21.
88. Asa SL, Bamberger AM, Cao B, Wong M, Parker KL, Ezzat S. The transcription activator steroidogenic factor-1 is preferentially expressed in the human pituitary gonadotroph. *J Clin Endocrinol Metab*1996 Jun;81(6):2165-70.
89. Morohashi K, Iida H, Nomura M, Hatano O, Honda S, Tsukiyama T, et al. Functional difference between Ad4BP and ELP, and their distributions in steroidogenic tissues. *Mol Endocrinol*1994 May;8(5):643-53.
90. Roselli CE, Jorgensen EZ, Doyle MW, Ronnekleiv OK. Expression of the orphan receptor steroidogenic factor-1 mRNA in the rat medial basal hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*1997 Feb;44(1):66-72.
91. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*1994 May 20;77(4):481-90.
92. Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Clements MA, Tourtellotte LM, et al. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*1995 Nov 21;92(24):10939-43.
93. Achermann JC, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet*1999 Jun;22(2):125-6.
94. Correa RV, Domenice S, Bingham NC, Billerbeck AE, Rainey WE, Parker KL, et al. A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*2004 Apr;89(4):1767-72.
-

-
95. Gospodarowicz D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 1974 May 10;249(453):123-7.
96. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005 Apr;16(2):139-49.
97. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001;2(3):REVIEWS3005.
98. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000 Sep;7(3):165-97.
99. Knights V, Cook SJ. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther* Jan;125(1):105-17.
100. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* Feb;10(2):116-29.
101. Kostrzewa M, Muller U. Genomic structure and complete sequence of the human FGFR4 gene. *Mamm Genome* 1998 Feb;9(2):131-5.
102. Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Hoog A, Farnebo LO, Auer G, et al. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res* 1996 Sep 15;56(18):4219-23.
103. Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Jul;87(7):3467-74.
104. Khnykin D, Troen G, Berner JM, Delabie J. The expression of fibroblast growth factors and their receptors in Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 2006 Feb;208(3):431-8.
105. Sahadevan K, Darby S, Leung HY, Mathers ME, Robson CN, Gnanapragasam VJ. Selective over-expression of fibroblast growth factor receptors 1 and 4 in clinical prostate cancer. *J Pathol* 2007 Sep;213(1):82-90.
-

-
106. Shah RN, Ibbitt JC, Alitalo K, Hurst HC. FGFR4 overexpression in pancreatic cancer is mediated by an intronic enhancer activated by HNF1alpha. *Oncogene* 2002 Nov 28;21(54):8251-61.
107. Ho HK, Pok S, Streit S, Ruhe JE, Hart S, Lim KS, et al. Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention. *J Hepatol* 2009 Jan;50(1):118-27.
108. Laurell C, Velazquez-Fernandez D, Lindsten K, Juhlin C, Enberg U, Geli J, et al. Transcriptional profiling enables molecular classification of adrenocortical tumours. *Eur J Endocrinol* 2009 Jul;161(1):141-52.
109. Bange J, Pechtl D, Cheburkin Y, Specht K, Harbeck N, Schmitt M, et al. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res* 2002 Feb 1;62(3):840-7.
110. Wang J, Stockton DW, Ittmann M. The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clin Cancer Res* 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6169-78.
111. Spinola M, Leoni V, Pignatiello C, Conti B, Ravagnani F, Pastorino U, et al. Functional FGFR4 Gly388Arg polymorphism predicts prognosis in lung adenocarcinoma patients. *J Clin Oncol* 2005 Oct 10;23(29):7307-11.
112. Spinola M, Leoni VP, Tanuma J, Pettinicchio A, Frattini M, Signoroni S, et al. FGFR4 Gly388Arg polymorphism and prognosis of breast and colorectal cancer. *Oncol Rep* 2005 Aug;14(2):415-9.
113. Jezequel P, Campion L, Joalland MP, Millour M, Dravet F, Classe JM, et al. G388R mutation of the FGFR4 gene is not relevant to breast cancer prognosis. *Br J Cancer* 2004 Jan 12;90(1):189-93.
114. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002 Jun 15;30(12):e57.
115. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8.
-

-
116. Almeida MQ, Soares IC, Ribeiro TC, Fragoso MC, Marins LV, Wakamatsu A, et al. Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;95(3):1458-62.
117. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006 Feb;7(2):85-97.
118. Shlien A, Tabori U, Marshall CR, Pienkowska M, Feuk L, Novokmet A, et al. Excessive genomic DNA copy number variation in the Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Aug 12;105(32):11264-9.
119. Vasudevan SA, Nuchtern JG, Shohet JM. Gene profiling of high risk neuroblastoma. *World J Surg* 2005 Mar;29(3):317-24.
120. Ionita-Laza I, Rogers AJ, Lange C, Raby BA, Lee C. Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. *Genomics* 2009 Jan;93(1):22-6.
121. Korbelt JO, Kim PM, Chen X, Urban AE, Weissman S, Snyder M, et al. The current excitement about copy-number variation: how it relates to gene duplications and protein families. *Curr Opin Struct Biol* 2008 Jun;18(3):366-74.
122. Werner H, Maor S. The insulin-like growth factor-I receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action. *Trends Endocrinol Metab* 2006 Aug;17(6):236-42.
123. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2004 Jul;4(7):505-18.
124. Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S, et al. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet* 2009 Jul;41(7):843-8.
125. Kim SY, Toretsky JA, Scher D, Helman LJ. The role of IGF-1R in pediatric malignancies. *Oncologist* 2009 Jan;14(1):83-91.
126. Zhang J, Trent JM, Meltzer PS. Rapid isolation and characterization of amplified DNA by chromosome microdissection: identification of IGF1R amplification in malignant melanoma. *Oncogene* 1993 Oct;8(10):2827-31.
-

-
127. Almeida A, Muleris M, Dutrillaux B, Malfoy B. The insulin-like growth factor I receptor gene is the target for the 15q26 amplicon in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*1994 Sep;11(1):63-5.
128. Armengol G, Knuutila S, Lluís F, Capella G, Miro R, Caballín MR. DNA copy number changes and evaluation of MYC, IGF1R, and FES amplification in xenografts of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*2000 Jan 15;116(2):133-41.
129. Sugimoto N, Imoto I, Fukuda Y, Kurihara N, Kuroda S, Tanigami A, et al. IQGAP1, a negative regulator of cell-cell adhesion, is upregulated by gene amplification at 15q26 in gastric cancer cell lines HSC39 and 40A. *J Hum Genet*2001;46(1):21-5.
130. Bridge JA, Liu J, Qualman SJ, Suijkerbuijk R, Wenger G, Zhang J, et al. Genomic gains and losses are similar in genetic and histologic subsets of rhabdomyosarcoma, whereas amplification predominates in embryonal with anaplasia and alveolar subtypes. *Genes Chromosomes Cancer*2002 Mar;33(3):310-21.
131. Natrajan R, Reis-Filho JS, Little SE, Messahel B, Brundler MA, Dome JS, et al. Blastemal expression of type I insulin-like growth factor receptor in Wilms' tumors is driven by increased copy number and correlates with relapse. *Cancer Res*2006 Dec 1;66(23):11148-55.
132. Tarn C, Rink L, Merkel E, Flieder D, Pathak H, Koumbi D, et al. Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*2008 Jun 17;105(24):8387-92.
133. Storchova Z, Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*2004 Jan;5(1):45-54.
134. Storchova Z, Kuffer C. The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J Cell Sci*2008 Dec 1;121(Pt 23):3859-66.
135. Draviam VM, Xie S, Sorger PK. Chromosome segregation and genomic stability. *Curr Opin Genet Dev*2004 Apr;14(2):120-5.
136. Limon J, Dal Cin P, Gaeta J, Sandberg AA. Translocation t(4;11)(q35;p13) in an adrenocortical carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*1987 Oct;28(2):343-8.
-

-
137. Mertens F, Kullendorff CM, Moell C, Alumets J, Mandahl N. Complex karyotype in a childhood adrenocortical carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*1998 Sep;105(2):190-2.
138. Werner H, Shalita-Chesner M, Abramovitch S, Idelman G, Shaharabani-Gargir L, Glaser T. Regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene by oncogenes and antioncogenes: implications in human cancer. *Mol Genet Metab*2000 Sep-Oct;71(1-2):315-20.
139. Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ, LeRoith D. Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*1996 Aug 6;93(16):8318-23.
140. Ohlsson C, Kley N, Werner H, LeRoith D. p53 regulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1. *Endocrinology*1998 Mar;139(3):1101-7.
141. Worm J, Guldberg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med*2002 Sep;31(8):443-9.
142. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*2004 Mar 2;101(9):2999-3004.
143. Shi B, Sepp-Lorenzino L, Prisco M, Linsley P, deAngelis T, Baserga R. Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells. *J Biol Chem*2007 Nov 9;282(45):32582-90.
144. Hanley NA, Rainey WE, Wilson DI, Ball SG, Parker KL. Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. *Mol Endocrinol*2001 Jan;15(1):57-68.
145. Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP. Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology*2005 Mar;146(3):1018-24.
146. Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol*1995 Apr;9(4):478-86.
-

-
147. Shinoda K, Lei H, Yoshii H, Nomura M, Nagano M, Shiba H, et al. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev Dyn*1995 Sep;204(1):22-9.
148. Beuschlein F, Mutch C, Bavers DL, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Keegan C, et al. Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology*2002 Aug;143(8):3122-35.
149. Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, Arhatte M, De Moura J, Cavalli LR, et al. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol*2007 Dec;21(12):2968-87.
150. Hoivik EA, Aumo L, Aesoy R, Lillefosse H, Lewis AE, Perrett RM, et al. Deoxyribonucleic acid methylation controls cell type-specific expression of steroidogenic factor 1. *Endocrinology*2008 Nov;149(11):5599-609.
151. Jeffers M, LaRoche WJ, Lichenstein HS. Fibroblast growth factors in cancer: therapeutic possibilities. *Expert Opin Ther Targets*2002 Aug;6(4):469-82.
152. Jaakkola S, Salmikangas P, Nylund S, Partanen J, Armstrong E, Pyrhonen S, et al. Amplification of fgfr4 gene in human breast and gynecological cancers. *Int J Cancer*1993 May 28;54(3):378-82.
153. Courjal F, Cuny M, Simony-Lafontaine J, Louason G, Speiser P, Zeillinger R, et al. Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups. *Cancer Res*1997 Oct 1;57(19):4360-7.
154. Freier K, Schwaenen C, Sticht C, Flechtenmacher C, Muhling J, Hofele C, et al. Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Oral Oncol*2007 Jan;43(1):60-6.
155. Kunii K, Davis L, Gorenstein J, Hatch H, Yashiro M, Di Bacco A, et al. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. *Cancer Res*2008 Apr 1;68(7):2340-8.
-

Steroidogenic Factor 1 Overexpression and Gene Amplification Are More Frequent in Adrenocortical Tumors from Children than from Adults

Madson Q. Almeida, Ibere Cauduro Soares, Tamaya C. Ribeiro, Maria Candida B. V. Fragoso, Lidianie V. Marins, Alda Wakamatsu, Rodrigo A. Ressio, Mirian Y. Nishi, Alexander A. L. Jorge, Antonio M. Lerario, Venancio A. F. Alves, Berenice B. Mendonca, and Ana Claudia Latronico

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (M.Q.A., T.C.R., M.C.B.V.F., M.Y.N., A.A.L.J., A.M.L., B.B.M., A.C.L.), Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/Laboratório de Investigação Médica 42) da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas, and Divisão de Anatomia Patologia, Laboratório de Patologia Hepática/LIM14 do Hospital das Clínicas (I.C.S., L.V.M., A.W., R.A.R., V.A.F.A.), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 05403-900 São Paulo, Brasil

Background: Steroidogenic factor 1 (SF-1) is a key determinant of endocrine development and function of adrenal cortex. SF-1 overexpression and gene amplification were previously demonstrated in a small group of pediatric adrenocortical tumors.

Objective: Our objective was to determine the frequency of SF-1 protein expression and gene amplification in a large cohort of pediatric and adult adrenocortical tumors.

Patients: SF-1 protein expression was assessed in a cohort of 103 adrenocortical tumors from 36 children and 67 adults, whereas gene amplification was studied in 38 adrenocortical tumors (17 from children).

Methods: Tissue microarray, multiplex ligation-dependent probe amplification, and quantitative real-time PCR were used.

Results: A strong nuclear SF-1 expression was detected by tissue microarray in 56% (20 of 36) and 19% (13 of 67) of the pediatric and adult adrenocortical tumors, respectively ($P = 0.0004$). Increased SF-1 copy number was identified in 47% (eight of 17) and 10% (two of 21) of the pediatric and adult adrenocortical tumors, respectively ($P = 0.02$). All adrenocortical tumors with SF-1 gene amplification showed a strong SF-1 staining, whereas most of the tumors (61%) without SF-1 amplification displayed a weak or negative staining ($P = 0.0008$). Interestingly, a strong SF-1 staining was identified in five (29%) pediatric adrenocortical tumors without SF-1 amplification. The frequency of SF-1 overexpression and gene amplification was similar in adrenocortical adenomas and carcinomas.

Conclusion: We demonstrated a higher frequency of SF-1 overexpression and gene amplification in pediatric than in adult adrenocortical tumors, suggesting an important role of SF-1 in pediatric adrenocortical tumorigenesis. (*J Clin Endocrinol Metab* 95: 0000–0000, 2010)

Adrenocortical carcinoma is a rare malignancy with incompletely understood pathogenesis and poor prognosis (1). However, a remarkably high annual incidence of adrenocortical tumors has been reported in chil-

dren younger than 15 yr from Southern Brazil, where a high prevalence of a germline mutation of the P53 tumor suppressor (p.R337H) was reported (2, 3). Besides important differences in prognosis, adrenocortical tumor-

igenesis also has distinct patterns between children and adults (4, 5).

Steroidogenic factor 1 (SF-1) is an orphan member of the nuclear receptor family of transcription factors and plays an important role in endocrine function, including the regulation of steroid hydroxylases, development and function of the adrenal cortex, and male sexual differentiation (6). *SF-1* maps to 9q33.3, a chromosomal region associated with amplification in pediatric adrenocortical tumors (7). *Sf-1* dosage regulates compensatory adrenal growth after unilateral adrenalectomy in mice (8). Furthermore, increased *SF-1* dosage promotes cell proliferation and triggers tumorigenesis in mice (9).

An increased *SF-1* copy number was detected in eight of nine adrenocortical tumors diagnosed in Brazilian children using fluorescence *in situ* hybridization, suggesting an association between *SF-1* gene amplification and pediatric adrenocortical tumorigenesis (10). All these adrenocortical tumors also had SF-1 protein overexpression (11). The aim of our study was to investigate SF-1 expression and gene amplification in a larger cohort of pediatric and adult adrenocortical tumors and evaluate the prognostic value of these findings.

Patients and Methods

The study was approved by the Ethics Committee of Hospital das Clínicas, Sao Paulo, Brazil, and informed written consent was obtained from all patients and/or parents. SF-1 protein expression was assessed in adrenocortical tumors obtained from 36 children (30 adenomas and six carcinomas) and 67 adults (40 adenomas and 27 carcinomas) (Table 1). Thirty-eight samples from these sporadic adrenocortical tumors (17 children and 21 adults; 22 adenomas and 16 carcinomas) were used to analyze *SF-1* amplification and gene expression. Endocrine syndromes were diagnosed in all children with adrenocortical tumors (isolated Cushing syndrome 8.3%, virilization 58.3%, and mixed 33.3%). Cushing syndrome was present in 48% of adults with

adrenocortical tumors, whereas 25% of adrenocortical tumors in this group were nonfunctioning. Virilization or mixed syndrome occurred in 9 and 18% of adrenocortical tumors in adults, respectively. The diagnosis of malignancy in the pediatric group was established by an advanced tumor stage (III or IV) and/or poor clinical outcome, whereas Weiss criteria were used in adult adrenocortical tumors.

Tissue microarray (TMA) and immunohistochemical analysis

Representative areas of the 109 adrenocortical tumors were identified on hematoxylin- and eosin-stained slides and marked on paraffin donor blocks. The spotted areas of donor blocks were punched (1.0 mm punch) and mounted into a recipient paraffin block using a precision microarray instrument (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). One set of three slides was selected (one slide from each TMA block of the triplicate) for staining with SF-1 monoclonal antibody (N1665 clone; PPMX Perseus Proteomics, Komaba, Japan) (12, 13). An immunoperoxidase immunohistochemical modified method with humid heat antigen retrieval was used as previously described (14). Loss of tissue sample occurred in 5.5% of the spots. Therefore, SF-1 immunoreactivity was analyzed in 103 tumor tissue samples. Two investigators (ICS and LVM), who were unaware of clinical data, independently evaluated SF-1 staining. The staining intensity and the percentage of positive tumor nuclei were calculated for each specimen to obtain a final semiquantitative H score, as previously described (15). The median H score value of 13 normal adrenals was chosen as the cutoff point for separating tumors with strong and weak SF-1 staining. The intra-observer variability was $8.4 \pm 2.5\%$. The inter-observer agreement was 0.89. The mean of the two evaluations was taken for statistical analysis.

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

SF-1 copy number was determined using the SALSA MLPA kit P185-B1 Intersex (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), which contains five probes for *SF-1* gene (exons 1 and 3–6). Genomic DNA from adrenocortical tumors and five normal adrenals was isolated using standard procedures. MLPA was performed as previously described (16). The tumor sample nor-

TABLE 1. Clinical characteristics of 103 patients with adrenocortical tumors according to SF-1 staining

	Children (n = 36)		Adults (n = 67)	
	Weak/negative SF-1 staining (n = 16)	Strong SF-1 staining (n = 20)	Weak/negative SF-1 staining (n = 54)	Strong SF-1 staining (n = 13)
Age (yr)	3.4 $\pm$ 1.2	3.8 $\pm$ 0.8	36.6 $\pm$ 1.7	39.1 $\pm$ 4.8
Sex (female to male)	3:1	2.3:1	6.8:1	12:1
Follow-up (months)	116.7 $\pm$ 21.4	72.5 $\pm$ 11.2	67.8 $\pm$ 8.4	53.5 $\pm$ 18.5
Clinical presentation				
Cushing	2 (12%)	1 (5%)	25 (46%)	7 (54%)
Virilizing	7 (44%)	14 (70%)	6 (11%)	0
Mixed	7 (44%)	5 (5%)	10 (19%)	2 (15%)
Nonfunctioning	0	0	13 (24%)	4 (31%)
Diagnosis				
Adenoma	13 (81%)	17 (85%)	33 (61%)	7 (54%)
Carcinoma	3 (19%)	3 (15%)	21 (39%)	6 (46%)

malized peak area was then divided by the average normalized peak area from normal adrenals. Dosage quotient areas outside the range 0.70–1.3 were considered abnormal.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

SF-1 amplification was also analyzed by qRT-PCR using SYBR Green in an ABI 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR cycling conditions were as follows: 2 min at 95 C, 40 cycles of 95 C for 15 sec and 60 C for 30 sec, and a final step at 72 C for 30 sec. The primer sequences for *SF-1* and *NPC-1* genes are available in supplemental Table 1 (published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>). A cycle threshold (C_T) value in the linear range of amplification was selected for each sample in triplicate and normalized to *NPC-1*. *SF-1* dosage was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. The normalized value (ΔC_T) for each tumor sample was then compared with the mean ΔC_T of five normal adrenals to produce a fold change ratio (normal = 1) and multiplied by 2 to generate a copy number (normal = 2).

After surgical resection, tumor fragments were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until total RNA extraction using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNA was generated using the High Capacity kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed using TaqMan Gene Expression Assays according to the manufacturer's instructions. The assay IDs were *SF-1*, Hs00610436_m1, and β -actin, 43263. The relative expression levels were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. The mean expression of the target genes in a pool of 61 normal adrenals (Clontech, Palo Alto, CA) was assigned an expression value of 1.0, and fold change in the *SF-1* expression levels was determined for each tumor sample.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with the SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL). Weighted κ -coefficient of agreement was used to evaluate the agreement between the observers. Categorical variables were compared using χ^2 test. Continuous data are expressed as mean $\pm$ SEM. Differences in expression levels were analyzed by the two-tailed Mann-Whitney *U* test. *P* values <0.05 were considered significant.

Results

The frequency of adrenocortical tumors showing strong SF-1 staining was 56% (20 of 36) and 19% (13 of 67) in children and adults, respectively ($\chi^2 = 12.1$; $P = 0.0004$) (Table 1 and Fig. 1). Pediatric adrenocortical tumors with strong SF-1 staining were more associated with isolated virilizing syndrome than pediatric adrenocortical tumors with weak SF-1 staining (70 vs. 44%, respectively) (Table 1).

On the other side, Cushing syndrome (isolated or associated with virilization) was more frequent in pediatric adrenocortical tumors with weak SF-1 staining when compared with SF-1-positive tumors in children (56 vs. 10%, respectively). In adults, the frequency of nonfunc-

FIG. 1. Immunohistochemical analysis for SF-1 in adrenocortical tumors. A, Nonfunctioning adrenocortical carcinoma diagnosed in an adult patient showing a negative SF-1 nuclear immunoreactivity; B, virilizing adrenocortical adenoma from an adult patient displaying a weak SF-1 staining on nuclei; C, virilizing adrenocortical adenoma diagnosed in a 6-yr-old girl showing a strong SF-1 staining on nuclei; D, pediatric adrenocortical adenoma from a patient with virilization displaying a strong nuclear SF-1 immunoreactivity (arrows indicate infiltration with inflammatory cells). Magnification, $\times 400$.

tioning tumors was not significantly different between adrenocortical tumors with weak and strong SF-1 staining (24 vs. 31%, respectively). In addition, SF-1 immunoreactivity was similar in adrenocortical adenomas and carcinomas diagnosed in children and adults (Table 1).

SF-1 gene amplification was detected in eight (47%) of 17 pediatric adrenocortical tumors and in two (10%) of 21 adult adrenocortical tumors ($\chi^2 = 5.02$; $P = 0.02$) (supplemental Fig. 1). *SF-1* amplification was detected in both adrenocortical adenomas ($n = 5$) and carcinomas ($n = 5$) (supplemental Table 2). Among the 10 cases with increased *SF-1* copy number, nine tumors showed three copies and one had four copies of the *SF-1* gene. An increased copy number of *SF-1* was detected by both MLPA and qRT-PCR in five of 10 adrenocortical tumors, whereas in the remaining adrenocortical tumors, *SF-1* amplification was demonstrated only by qRT-PCR ($n = 4$) or MLPA ($n = 1$). The *SF-1* mRNA levels were significantly higher in adrenocortical tumors associated with increased *SF-1* gene copies when compared with adrenocortical tumors without gene amplification (fold change, 2.3 ± 0.52 vs. 1.16 ± 0.18 , respectively; $P = 0.001$). In addition, all adrenocortical tumors with *SF-1* gene amplification showed a strong SF-1 staining, whereas most of the tumors (61%) without *SF-1* amplification displayed a weak or negative staining ($P = 0.0008$). Interestingly, a strong SF-1 staining was identified in five pediatric adrenocortical tumors (four adenomas and one carcinoma) without *SF-1* amplification. The R337H P53 mutation was

previously identified in seven of 10 patients (five children and two adults) with amplification of *SF-1* in adrenocortical tumors (3).

SF-1 deletion was detected only in a cortisol-secreting adrenocortical adenoma diagnosed in a 37-yr-old patient. Decreased mRNA levels and a negative immunoreactivity for SF-1 were demonstrated in this adrenocortical tumor with *SF-1* deletion.

Discussion

SF-1 is a key determinant of endocrine development, and its expression is mainly restricted to the gonads, adrenal cortex, anterior pituitary, and hypothalamus (6). The increased *SF-1* dosage modulates the expression of transcripts involved in cell cycle and apoptosis (9). High frequency of *SF-1* amplification and overexpression was previously demonstrated in a small group of pediatric adrenocortical tumors associated with 9q gain (10, 11). Here, we investigated protein expression and gene amplification of SF-1 in a larger cohort of pediatric tumors as well as in a cohort of adult adrenocortical tumors. The frequency of SF-1 nuclear overexpression was significantly higher in adrenocortical tumors diagnosed in children than in adults. Additionally, an increased copy number of *SF-1* was identified in 47% of pediatric adrenocortical tumors, whereas this finding was detected in only 10% of adult adrenocortical tumors. Therefore, our data confirm the importance of *SF-1* dosage in an expanded group of pediatric adrenocortical tumors.

Adrenocortical tumors with *SF-1* amplification showed high *SF-1* mRNA levels and protein expression. Interestingly, SF-1 nuclear overexpression was identified in pediatric adrenocortical tumors without *SF-1* amplification. Indeed, posttranslational modifications are known to influence the activity and transcriptional capacity of SF-1 (17, 18). Phosphorylation-dependent SF-1 activation is likely mediated by the MAPK signaling pathway (17). Recently, it was demonstrated that SF-1-mediated transcription in adrenocortical cancer cells is mediated through cyclin-dependent kinase 7 (CDK7)-induced phosphorylation (18). Cdk7 overexpression was identified in a wide range of cancer cell lines (19). Therefore, additional molecular mechanisms might modulate SF-1 expression and/or activity in childhood adrenocortical tumors without *SF-1* amplification.

SF-1 expression was previously demonstrated to be high in virilizing adrenocortical tumors and low in aldosteronomas (20). In this study, a strong SF-1 staining was associated with a higher frequency of isolated virilizing syndrome in children with adrenocortical tumors, whereas Cushing syndrome was more frequent in pediatric adre-

nocortical tumors with weak SF-1 expression. In adults, the hormonal status of adrenocortical tumors with strong, and weak SF-1 staining was similar. Additionally, SF-1 expression was not different between functioning and nonfunctioning adrenocortical tumors.

Increased *SF-1* dosage promotes proliferation of human adrenocortical cells as well as controls the expression of transcripts involved in the cell cycle, apoptosis, and cell adhesion (9). Although *SF-1* gene has been associated with pediatric adrenocortical tumorigenesis, its prognostic value was not previously investigated (10, 11). In this study, SF-1 nuclear immunoreactivity was similar in adrenocortical adenomas and carcinomas from children and adults, suggesting that this factor plays a role in both benign and malignant tumor pathogenesis.

In conclusion, overexpression and increased copy number of SF-1 were identified mainly in adrenocortical tumors diagnosed in children than in adults. These findings indicate a more important role of SF-1 in pediatric adrenocortical tumorigenesis. In addition, SF-1 expression was similar in adrenocortical adenomas and carcinomas diagnosed in both pediatric and adult patients.

Acknowledgments

We thank Dr. Maria Claudia Nogueira Zerbini from the Department of Pathology, School of Medicine, University of Sao Paulo, for her collaboration to obtain normal adrenal tissue samples.

Address all correspondence and requests for reprints to: Madson Q. Almeida, M.D., Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (Laboratório de Investigação Médica 42), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 20 andar Bloco 6, 05403-900 São Paulo, SP, Brasil. E-mail: madsonalmeida@usp.br.

This work was supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grants 05/04726-0 and 06/00244-3 (to M.Q.A.) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Grants 300209/2008-09 (to A.C.L.), 307951/06-5 (to A.A.L.J.), and 301339/2008-09 (to B.B.M.).

Disclosure Summary: We declare no duality of financial interest or direct or indirect conflict of interest on the part of any author of this manuscript.

References

1. Latronico AC, Chrousos GP 1997 Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1317–1324
2. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G, Cat I, Stratakis CA, Sandrini R 2001 An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9330–9335

3. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB 2001 An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4970–4973
4. Almeida MQ, Latronico AC 2007 The molecular pathogenesis of childhood adrenocortical tumors. *Horm Metab Res* 39:461–466
5. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, Costa MH, Lerario AM, Maciel CC, Mattos GE, Jorge AA, Mendonca BB, Latronico AC 2008 Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3524–3531
6. Parker KL, Schimmer BP 1997 Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 18:361–377
7. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, Young HM, Haddad BR 1999 Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1116–1121
8. Beuschlein F, Mutch C, Bavers DL, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Keegan C, Hammer GD 2002 Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology* 143:3122–3135
9. Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, Arhatte M, De Moura J, Cavalli LR, Virolle V, Barbry P, Zambetti GP, Figueiredo BC, Heckert LL, Lalli E 2007 Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol* 21:2968–2987
10. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, Zambetti G, DeLacerda L, Rodrigues GA, Haddad BR 2005 Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 90:615–619
11. Pianovski MA, Cavalli LR, Figueiredo BC, Santos SC, Doghman M, Ribeiro RC, Oliveira AG, Michalkiewicz E, Rodrigues GA, Zambetti G, Haddad BR, Lalli E 2006 SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer* 42:1040–1043
12. Suh JM, Yu CT, Tang K, Tanaka T, Kodama T, Tsai MJ, Tsai SY 2006 The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney. *Mol Endocrinol* 20:3412–3420
13. Qin J, Suh JM, Kim BJ, Yu CT, Tanaka T, Kodama T, Tsai MJ, Tsai SY 2007 The expression pattern of nuclear receptors during cerebellar development. *Dev Dyn* 236:810–820
14. Shi SR, Key ME, Kalra KL 1991 Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39:741–748
15. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC 2006 DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 355:983–991
16. De Luca A, Bottillo I, Dasdia MC, Morella A, Lanari V, Bernardini L, Divona L, Giustini S, Sinibaldi L, Novelli A, Torrente I, Schirinzi A, Dallapiccola B 2007 Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet* 44:800–808
17. Hammer GD, Krylova I, Zhang Y, Darimont BD, Simpson K, Weigel NL, Ingraham HA 1999 Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* 3:521–526
18. Yang WH, Heaton JH, Brevig H, Mukherjee S, Iñiguez-Lluhí JA, Hammer GD 2009 SUMOylation inhibits SF-1 activity by reducing CDK7-mediated serine 203 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 29:613–625
19. Bartkova J, Zemanova M, Bartek J 1996 Expression of CDK7/CAK in normal and tumor cells of diverse histogenesis, cell-cycle position and differentiation. *Int J Cancer* 66:732–737
20. Kiiveri S, Liu J, Arola J, Heikkilä P, Kuulasmaa T, Lehtonen E, Voutilainen R, Heikinheimo M 2005 Transcription factors GATA-6, SF-1, and cell proliferation in human adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* 233:47–56