ANDRÉ MURAD FARIA

**Papel do LIN28, uma proteína ligadora de RNAs, na
tumorigênese adrenocortical**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia e Metabologia

Orientador: Dr. Madson Queiroz de Almeida

**SÃO PAULO
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Faria, André Murad

Papel do LIN28, uma proteína ligadora de RNAs, na tumorigênese
adrenocortical / André Murad Faria. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia e Metabologia.

Orientador: Madson Queiroz de Almeida.

Descritores: 1.Carcinoma adrenocortical/genética 2.Expressão gênica
3.MicroRNAs/genética 4.Carcinogênese/genética 5.Regulação neoplásica da
expressão gênica/genética 6.Proteínas de neoplasias/genética 7.Marcadores
biológicos de tumor/genética 8.Prognóstico 9.Sobrevida 10.Proteínas de ligação a
RNA/metabolismo

USP/FM/DBD-154/14

*A vida é combate,
Que os fracos abate,
Que os fortes, os bravos
Só pode exaltar.*

Gonçalves Dias

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo nº. 2011/09092-0) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; processo nº. 470428/2013-9).

Aos meus pais, Manuel e Thelma, e aos meus irmãos, Igor e Juliana, pelo exemplo de ética, correção e determinação, que mutuamente nos guia e nos mantém unidos em nossas trajetórias de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Madson Queiroz de Almeida, por todos os ensinamentos e orientações na trajetória desse projeto nos últimos quatro anos. Sinto-me honrado por ter sido seu primeiro aluno de Doutorado – Madson é, de fato, orientador na concepção semântica da palavra, e não apenas no papel. Demonstra um talento e capacidade ímpar para a pesquisa científica em uma idade bastante precoce, típicos das pessoas que nascem com o dom, mas que, obviamente, só chegam aos seus objetivos graças a muito esforço e dedicação. É jovem na idade, e já um veterano em suas conquistas.

Às Professoras Titulares da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Prof^{as}. Dr^{as}. Berenice Bilharinho de Mendonça e Ana Claudia Latronico, por todo apoio e incentivo indispensáveis nessa etapa da formação. Exemplos de médicas assistencialistas, pesquisadoras, educadoras, comportamento ético, liderança, pragmatismo e meritocracia. Estabelecem-se, a despeito de inúmeros obstáculos, como profissionais internacionalmente reconhecidas capazes de atingir feitos impressionantes, em um país onde muitas vezes a transpiração necessita superar a inspiração.

Aos pacientes com tumores adrenocorticais, por serem amáveis com seus cuidadores mesmo nos momentos mais difíceis de suas vidas, além de contribuírem para o aprendizado de dezenas de gerações de médicos dessa instituição.

À Dr^a. Maria Cândida Barisson Villares Fragoso, por seu estímulo e participação nesse projeto de pesquisa. É um exemplo, hoje em dia cada vez mais escasso, no tocante aos cuidados, dedicação, solidariedade e comprometimento com todos os pacientes os quais se presta a assistir.

Ao Dr. Iberê Cauduro Soares e à Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Nogueira Zerbini, por toda paciência e colaboração na análise e leitura dos estudos de imunohistoquímica.

Às colegas Beatriz Marinho de Paula Mariani e Tamaya Castro Ribeiro, exímias biólogas do LIM42, pelas dezenas de horas despendidas comigo no desenvolvimento de importantes etapas do projeto na bancada, bem como pela paciência em transmitir a mim diversos conhecimentos do mundo da biologia molecular.

À Sr^a. Alda Wakamatsu, funcionária do LIM14, pela sua sempre prontidão, boa vontade e esmero no processamento das lâminas de imunohistoquímica.

Ao Prof. Martin Fassnacht e ao Dr. Silviu Sbiera, da Universidade de Wuerzburg – Alemanha, pela valiosa colaboração e aumento da casuística da imunohistoquímica desse projeto com mais de uma centena de casos de carcinoma adrenocortical de adultos.

A todos os funcionários do LIM42, em especial à Nilda, Cidinha, Fran e Mariana Funari, por todo trabalho e suporte indispensáveis para o ótimo funcionamento do laboratório.

Aos colegas pós-graduandos e assistente da Unidade de Suprarrenal, Gabriela Resende Vieira de Sousa, Guilherme Asmar Alencar e Antônio Marcondes Lerário, pela harmoniosa e agradável convivência nos ambulatórios de quarta-feira.

Ao colega, Daniel Soares Freire, e à Prof^a., Maria Adelaide Albergaria Pereira, pela ajuda no levantamento de dados clínicos de pacientes que em muito enriqueceram a casuística deste trabalho.

Ao amigo e professor, Dr. Malebranche Berardo Carneiro da Cunha Neto, pelos laços de amizade cada vez mais estreitos, ensinamentos clínicos e oportunidades que sempre me proporcionou desde que nos conhecemos.

Aos colegas de profissão e especialidade, Ricardo Perez, Daniela Iguchi, Danilo Vieira, Bruno Halpern e Cecília Amabilini, e todos os outros colegas com os quais tive o privilégio e a felicidade de conviver durante todo o período de formação da residência médica e pós-graduação no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Tenham certeza que todos os momentos de descontração, comemorações, e as centenas de conversas no “cafezinho” dos intervalos de trabalho foram fundamentais para minha trajetória até aqui nessa terra que tão bem me acolheu.

A toda minha família, tios e primos, em especial aos tios Roosevelt, Ceres, Carlos, Fátima, Fernando (*in memoriam*), Célia, Aníbal (*in memoriam*), Helena, Geraldo, Graça, Tereza, Alexandre, Lúcia e Nagib, e aos primos, Osmir, Maria da Graça, Marco Aurélio, Gustavo, Rebeca, Eric, Nagib Filho, David, Felipe e Daniel pelos constantes incentivos e vibração mútua em importantes etapas profissionais da minha vida.

Aos meus avós (*in memoriam*), Manuel e Áurea, Jamil e Clóris, por terem disseminado em seus filhos valiosos princípios que tendem a ser perpetuados em todas as gerações vindouras.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Tumores Adrenocorticais	2
1.2 Patogênese molecular dos TACs.....	8
1.3 Pluripotencialidade Celular, Lin28 e miRNAs Regulatórios.....	18
2 OBJETIVOS	25
3 MÉTODOS.....	27
3.1 Considerações Éticas.....	28
3.2 Casuística	28
3.2.1 População dos estudos moleculares	29
3.2.2 População para avaliação da expressão proteica do LIN28 e Ki67	31
3.3 Métodos.....	33
3.3.1 Imunohistoquímica e Micromatriz Tecidual (TMA)	33
3.3.2 Estudos moleculares.....	36
3.3.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA	36
3.3.2.2 RT-PCR quantitativa em tempo real	37
3.3.2.3 Expressão de miRNAs por RT-PCR em tempo real	41
3.3.2.4 <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	57
3.4 Análise estatística.....	59
4 RESULTADOS.....	61
4.1 TACs Pediátricos	62
4.1.1 Expressão gênica do <i>LIN28A</i> e <i>LIN28B</i>	62
4.1.2 Expressão proteica do LIN28.....	64
4.1.3 Expressão proteica do Ki67	66
4.2 TACs de Adultos.....	67
4.2.1 Expressão gênica do <i>LIN28A</i> e <i>LIN28B</i>	67
4.2.2 Expressão proteica do LIN28.....	68
4.2.3 Expressão proteica do Ki67	71
4.2.4 Análise univariada e multivariada de sobrevida	73
4.3 Análise da variação do número de cópias do <i>LIN28A</i> e <i>LIN28B</i>	74
4.4 Expressão dos miRNAs reguladores do LIN28	76
5 DISCUSSÃO.....	81
6 CONCLUSÕES	89

7	ANEXOS	91
8	REFERÊNCIAS	111
9	APÊNDICES.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$2^{-\Delta\Delta CT}$	- Método de quantificação relativa
ACTH	- Hormônio Adrenocorticotrófico
CAPPesq	- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	- Fita complementar de DNA
CGA	- Campos de grande aumento
C_T	- Ciclo em que cada curva de amplificação ultrapassa o limiar de detecção da fluorescência
<i>CTNNB1</i>	- Gene codificador da β -catenina
DHEA	- Dehidroepiandrosterona
DHEAS	- Sulfato de DHEA
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
EGFR	- Receptor do fator epitelial de crescimento
EP	- Erro padrão
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IC 95%	- Intervalo de confiança 95%
<i>IGF-1R</i>	- Gene do receptor tipo 1 de IGFs
<i>IGF-2</i>	- Gene do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
Ki67	- Marcador de proliferação celular Ki67
<i>let-7a</i>	- microRNA <i>let-7a</i>
<i>let-7b</i>	- microRNA <i>let-7b</i>
<i>let-7c</i>	- microRNA <i>let-7c</i>
<i>let-7d</i>	- microRNA <i>let-7d</i>
<i>let-7e</i>	- microRNA <i>let-7e</i>
<i>let-7f</i>	- microRNA <i>let-7f</i>
<i>let-7g</i>	- microRNA <i>let-7g</i>
Lin28	- Proteína Lin28 (espécie animal não especificada)
LIN28	- Proteína LIN28 humana
<i>LIN28A</i>	- Gene do homólogo A da proteína LIN28
<i>LIN28B</i>	- Gene do homólogo B da proteína LIN28
<i>mir-125a-3p</i>	- microRNA 125a-3p

<i>mir-125a-5p</i>	- microRNA 125a-5p
<i>mir-125b</i>	- microRNA 125b
<i>mir-30b</i>	- microRNA 30b
<i>mir-30c</i>	- microRNA 30c
<i>mir-98</i>	- microRNA 98
miRNA	- microRNA
MLPA	- <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mTOR	- Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
PCR	- Reação em cadeia de polimerase
RNA	- Ácido ribonucleico
RNA _m	- RNA mensageiro
RR	- Risco relativo
RT	- Transcrição Reversa
SF-1	- Fator esteroideogênico 1
TACs	- Tumores adrenocorticais
TMA	- Micromatriz Tecidual
TUTase	- Transferase uridilil terminal
VEGF	- Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - miRNAs são pequenos RNAs não-codificáveis com cerca de 20-25 nucleotídeos que desempenham um importante papel na regulação da expressão gênica. Eles são expressos no núcleo como qualquer outro gene. O transcrito primário (Pri-miRNA) é clivado no núcleo pela enzima Drosha, dando origem à molécula precursora de miRNA (Pré-miRNA). O Pré-miRNA é exportado ao citoplasma pela proteína Exportina 5, onde sofre processamento pela enzima Dicer para formar o miRNA maduro, que então interage com o RISC e se liga à sequência complementar de RNAm alvos, finalmente levando a bloqueio da expressão proteica, por meio de repressão translacional ou clivagem do RNAm 14
- Figura 2 - A célula de origem de um câncer é provavelmente uma célula progenitora com ação precoce no processo de diferenciação das células-tronco embrionárias. O acúmulo de eventos genéticos ou epigenéticos em uma célula, proveniente da população anormal de células em proliferação durante a progressão tumoral, resultará na emergência de uma subpopulação celular com vantagens adicionais de proliferação e sobrevivência (célula tronco tumoral ou *cancer stem cell*, CSC), que se tornam responsáveis pela propagação do tumor 18
- Figura 3 - Em circunstâncias normais, o *let-7* sofre o processamento normal dos miRNAs, e o *let-7* maduro inibe vários oncogenes, incluindo fatores pró-mitogênicos e genes relacionados ao ciclo celular (painel à esquerda), o que o implica classicamente como um miRNA supressor tumoral. O Lin28 age bloqueando o processamento normal do *let-7*, inibindo a formação do pré-*let-7* e do *let-7* maduro (painel ao centro). Ao reprimir o *let-7*, o Lin28, consequentemente, ativa as vias oncogênicas acima descritas, contribuindo para manutenção de células em estado indiferenciado. Há, ainda, uma alça regulatória inversa, em que o *let-7* se liga à região 3' não traduzível do RNAm do Lin28, bloqueando a sua expressão⁹². Embora não demonstrado na figura, é sabido que o *mir-9*, *mir-30* e *mir-125* também são importantes reguladores do Lin28⁹⁹ 20

- Figura 4 - (A) O Lin28 é altamente expresso em fases precoces do desenvolvimento, em oposição ao *let-7*. À medida que as células vão se tornando mais diferenciadas, os níveis de Lin28 decrescem, em paralelo a um aumento concomitante do *let-7*. Embora aqui não representado, é esperado comportamento semelhante dos outros miRNAs reguladores do Lin28 (*mir-9*, *mir-30* e *mir-125*); (B) Tumores que expressam Lin28 podem surgir de duas maneiras: a partir de células-tronco ou progenitoras que expressam Lin28 e sofrem transformação por meio de aquisição de diversas mutações genéticas ou, de forma alternativa, a partir de uma célula somática que tenha sofrido transformação pela aquisição de mutações genéticas, levando à ativação do Lin28 por meio de mecanismos genéticos ou epigenéticos, nos estágios mais tardios da tumorigênese..... 22
- Figura 5 - (A) Tumor virilizante adrenocortical de uma criança de 2,1 anos (Anexo D, caso n° 4) com evolução benigna mostrando forte imunorreatividade para o LIN28 (280x). (B) Tumor adrenocortical misto com imunorreatividade negativa para o LIN28 (280x) de uma paciente de 35 anos que desenvolveu metástase após 21 meses de seguimento (Anexo F, caso n° 85) 65
- Figura 6 - A: Carcinoma adrenocortical produtor de cortisol de um homem de 53 anos (Anexo F, caso n° 79) que veio a óbito após 10 meses de seguimento, mostrando forte imunorreatividade para o marcador de proliferação nuclear Ki67 (280x). B: Adenoma adrenocortical produtor de cortisol de uma mulher de 33 anos com imunorreatividade negativa para o Ki67 (280x) 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes com tumores adrenocorticais (n = 86)	29
Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes com tumores adrenocorticais (n = 200) (Coorte Brasileira, USP)	32
Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes com carcinomas adrenocorticais (n = 110) (Coorte Alemã, Universidade de Wuerzburg)	32
Tabela 4 - Relação entre expressão proteica do LIN28 e características clínicas e patológicas basais dos pacientes adultos com carcinoma adrenocortical (somente amostras de tumor derivadas de cirurgia primária) (n = 188)	69
Tabela 5 - Fatores prognósticos de sobrevida global e livre de doença em adultos com carcinoma adrenocortical (somente amostras de tumor derivadas de cirurgia primária)	74
Tabela 6 - Relação entre expressão do <i>mir-9</i> e características clínicas e patológicas basais dos pacientes adultos com carcinoma adrenocortical (somente amostras de tumor derivadas de cirurgia primária)(n = 28)	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>LIN28A</i> em relação aos genes endógenos (A, β -actina; B, β -glicuronidase)	39
Gráfico 2 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>LIN28B</i> em relação aos genes endógenos (A, β -actina; B, β -glicuronidase)	40
Gráfico 3 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>let-7a</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	43
Gráfico 4 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>let-7b</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	44
Gráfico 5 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>let-7c</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	45
Gráfico 6 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>let-7d</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	46
Gráfico 7 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>let-7e</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	47
Gráfico 8 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>let-7f</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	48
Gráfico 9 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>let-7g</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	49
Gráfico 10 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>mir-98</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	50
Gráfico 11 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>mir-9</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	51
Gráfico 12 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>mir-30b</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	52
Gráfico 13 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>mir-30c</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	53
Gráfico 14 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>mir-125a-3p</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	54
Gráfico 15 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>mir-125a-5p</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	55

Gráfico 16 - Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>mir-125b</i> em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48).....	56
Gráfico 17 - Expressão do gene <i>LIN28B</i> e sobrevida livre de doença em TACs pediátricos com Weiss ≥ 3 ; n = 16 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos, somente pacientes com ressecção completa.....	63
Gráfico 18 - Expressão do gene <i>LIN28B</i> e sobrevida global em TACs pediátricos com Weiss ≥ 3 ; n = 17 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos.....	63
Gráfico 19 - Expressão proteica do Ki67 e sobrevida global em TACs pediátricos com Weiss ≥ 3 ; n = 36 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos.....	66
Gráfico 20 - Expressão proteica do Ki67 e sobrevida livre de doença em TACs pediátricos com Weiss ≥ 3 ; n = 34 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos, somente pacientes com ressecção completa.....	67
Gráfico 21 - Expressão relativa do gene <i>LIN28A</i> em adenomas (n = 31), carcinomas não agressivos (n = 15) e carcinomas agressivos (n = 15) de pacientes adultos. Os valores de mediana são representados pelas linhas pretas. Valores nulos não são representados em uma escala logarítmica	68
Gráfico 22 - Impacto da expressão proteica do LIN28 na sobrevida livre de doença em pacientes adultos com carcinoma adrenocortical; n = 124 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos, somente pacientes com ressecção completa.....	70
Gráfico 23 - Impacto da expressão proteica do LIN28 na sobrevida global em pacientes adultos com carcinoma adrenocortical; n=188 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos.....	70
Gráfico 24 - Impacto da expressão proteica do Ki67 na sobrevida global em pacientes adultos com carcinoma adrenocortical; n = 158 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos	72
Gráfico 25 - Impacto da expressão proteica do Ki67 na sobrevida livre de doença em pacientes adultos com carcinoma adrenocortical; n = 107 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos, somente pacientes com ressecção completa.....	72
Gráfico 26 - Representação dos resultados de MLPA obtidos a partir de DNA de tecido de córtex adrenal normal (painel A) e de um TAC pediátrico com amplificação do gene <i>LIN28B</i> (Anexo D, caso nº 4) (painel B). As setas vermelhas demonstram alguns exemplos de sondas amplificadas	75

Gráfico 27 - Representação dos resultados de MLPA obtidos a partir de DNA de tecido de córtex adrenal normal (painel A) e de um carcinoma adrenocortical de paciente adulto com amplificação do gene <i>LIN28B</i> (Anexo F, Caso nº 88) (painel B). As setas vermelhas demonstram alguns exemplos de sondas deletadas	75
Gráfico 28 - Expressão relativa do <i>mir-9</i> em adenomas (n = 13), carcinomas não agressivos (n = 13) e carcinomas agressivos (n = 15) de pacientes adultos. Os valores de mediana são representados pelas linhas pretas. A mediana de todas as amostras é representada pela linha tracejada	77
Gráfico 29 - Impacto da expressão do <i>mir-9</i> na sobrevida global em pacientes adultos com carcinoma adrenocortical; n = 28 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos.....	79
Gráfico 30 - Impacto da expressão do <i>mir-9</i> na sobrevida livre de doença em pacientes adultos com carcinoma adrenocortical; n = 18 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos, somente pacientes com ressecção completa	79
Gráfico 31 - Expressão relativa do <i>mir-9</i> em TACs pediátricos clinicamente benignos (n = 18) e TACs clinicamente malignos (n = 6). Os valores de mediana são representados pelas linhas pretas. A mediana de todas as amostras é representada pela linha tracejada	80

RESUMO

Faria AM. *Papel do LIN28, uma proteína ligadora de RNAs, na tumorigênese adrenocortical* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: O carcinoma adrenocortical é uma neoplasia rara que carrega um prognóstico reservado. Recentemente, uma série de estudos demonstrou o potencial do perfil de miRNAs na diferenciação entre adenomas e carcinomas adrenocorticais, estratificação de risco e prognóstico. Entretanto, pouco se sabe ainda sobre a regulação pós-transcricional de miRNAs. Nesse contexto, o LIN28 é uma proteína ligadora de RNAs altamente conservada que surgiu como um modulador do *let-7*, uma importante família de miRNAs amplamente conhecida por seus efeitos supressivos tumorais. Além do *let-7*, o LIN28 também mostrou regular e ser regulado pelo *mir-9*, *mir-30* e *mir-125*. **OBJETIVOS:** Analisar a expressão gênica e proteica do LIN28 em uma grande coorte de tumores adrenocorticais (TACs) de adultos e pediátricos, além de investigar a variação no número de cópias dos genes *LIN28A* e *LIN28B* e a expressão dos miRNAs regulatórios do LIN28 (família *let-7*, *mir-9*, *mir-30* e *mir-125*) em um subgrupo desta coorte. **MÉTODOS:** A expressão proteica do LIN28 foi avaliada em um total de 266 TACs de adultos (78 adenomas e 188 carcinomas) e 44 pediátricos (35 clinicamente benignos e 9 clinicamente malignos). A expressão dos genes *LIN28A* e *LIN28B* foi avaliada em um subgrupo de 86 TACs adultos e pediátricos e a análise da variação no número de cópias destes genes em 58 TACs. O estudo de expressão das famílias dos miRNAs *let-7*, *mir-9*, *mir-30* e *mir-125* foi realizado em 28 carcinomas adrenocorticais de adultos. **RESULTADOS:** Em adultos, o gene *LIN28A* mostrou-se hiperexpresso em carcinomas agressivos quando comparado a adenomas [7,0 (0 a 174,3) vs. 3,6 (0 a 18,3); $p = 0,006$, respectivamente] e observou-se uma tendência a maior expressão quando comparados a carcinomas não agressivos [7,0 (0 a 174,3) vs. 7,1 (0 a 17,1); $p = 0,092$]. A expressão do *LIN28B* foi negativa na grande maioria (92%) dos TACs de adultos. Curiosamente, uma imunorreatividade fraca para o LIN28 foi significativamente associada com diminuição da sobrevida livre de doença nessa população ($p = 0,01$), mas para sobrevida global apenas uma tendência foi observada ($p = 0,117$). Na análise multivariada, somente o índice Ki67 $\geq 10\%$ (RR 5,7, 95% IC 3,0-10,8; $p = 0,0001$) e imunorreatividade fraca para o LIN28 (RR 2,3, 95% IC 1,2-4,4; $p = 0,008$) foram preditores independentes de recorrência em adultos. De forma interessante, a expressão do *mir-9*, um regulador negativo do *LIN28A/B*, foi significativamente maior em carcinomas agressivos quando comparados a não agressivos [2076 (36 a 9307) vs. 133,4 (2,4 a 5193); $p = 0,011$] e fortemente associada com a redução da sobrevida global ($p = 0,01$) e livre de doença ($p = 0,01$). Na população pediátrica, não se observou diferença significativa entre expressão da

proteína LIN28, assim como dos genes *LIN28A* e *mir-9*, entre tumores clinicamente benignos e malignos. Nas crianças, a hiperexpressão do *LIN28B* foi significativamente associada com redução da sobrevida livre de doença ($p = 0,026$), mas não da sobrevida global ($p = 0,406$). A análise da variação do número de cópias mostrou que somente uma criança com tumor virilizante benigno apresentou amplificação do *LIN28B* e uma mulher com carcinoma adrenocortical metastático apresentou deleção do *LIN28B*. Não houve variação no número de cópias para o gene *LIN28A*. Um índice de Ki67 $\geq 20\%$ nas crianças foi capaz de discriminar pacientes com pior prognóstico: houve uma associação significativa tanto com diminuição da sobrevida global ($p = 0,015$) como da sobrevida livre de doença ($p = 0,001$) em 36 TACs pediátricos com Weiss ≥ 3 . **CONCLUSÕES:** A imunorreatividade fraca para o LIN28 foi associada à diminuição da sobrevida livre de doença em uma grande coorte de carcinomas adrenocorticais de adultos. O gene *LIN28A* teve expressão aumentada em carcinomas agressivos de adultos, sugerindo uma regulação pós-transcricional negativa da expressão proteica do LIN28. A hiperexpressão do *mir-9*, um regulador negativo do LIN28, mostrou-se um importante preditor de desfecho desfavorável nos adultos. Adicionalmente, a hiperexpressão do gene *LIN28B* mostrou-se um potencial marcador de mau prognóstico na população pediátrica. Um índice de Ki67 $\geq 10\%$ em adultos e $\geq 20\%$ em crianças foram associados a mau prognóstico.

Descritores: Carcinoma adrenocortical. Expressão gênica. MicroRNAs. Carcinogênese. Regulação neoplásica da expressão gênica. Proteínas de neoplasias. Marcadores biológicos de tumor. Prognóstico. Sobrevida. Proteínas de ligação a RNA.

SUMMARY

Faria AM. *Role of LIN28, an RNA-binding protein, in adrenocortical tumorigenesis* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUCTION: Adrenocortical carcinoma is a rare neoplasm with overall poor prognosis. Recently, several studies demonstrated the potential of miRNA profiling in differentiating between adrenocortical adenomas and carcinomas, risk stratification and prognosis. Nevertheless, little is known about posttranscriptional regulation of miRNAs. LIN28 is a highly conserved RNA-binding protein that has emerged as a modulator of the processing of *let-7*, an important family of miRNAs widely known for its tumor-suppressive effects. Besides from *let-7*, LIN28 has also shown to regulate and be regulated by *mir-9*, *mir-30* and *mir-125*. **OBJECTIVES:** To analyze LIN28 gene and protein expression in a large cohort of adult and pediatric adrenocortical tumors (ACTs), and investigate the copy number variation analysis for *LIN28A* and *LIN28B* genes and the expression of LIN28 regulatory microRNAs (*let-7* family, *mir-9*, *mir-30* e *mir-125*) in a subgroup of this cohort. **METHODS:** LIN28 protein expression was assessed in a total of 266 adult (78 adenomas and 188 carcinomas) and 44 pediatric ACTs (35 clinically benign and 9 clinically malignant). *LIN28A* and *LIN28B* gene expression was evaluated in a subgroup of 86 adult and pediatric ACTs and copy number variation analysis of these genes in 58 ACTs. The expression of *let-7* family, *mir-9*, *mir-30* and *mir-125* was performed in 28 adult carcinomas. **RESULTS:** In adults, *LIN28A* gene was overexpressed in aggressive carcinomas when compared with adenomas [7.0 fold change (from 0 to 174.3) vs. 3.6 (from 0 to 18.3); $p = 0.006$, respectively] and a trend towards greater expression when compared with non-aggressive carcinomas [7.0 (from 0 to 174.3) vs. 7.1 (from 0 to 17.1); $p = 0.092$]. *LIN28B* expression was undetectable in the great majority (92%) of adult ACTs. Surprisingly, weak LIN28 staining was significantly associated with reduced disease-free survival in this population ($p = 0.01$), but for overall survival only a trend was detectable ($p = 0.117$). In the multivariate analysis, only Ki67 index $\geq 10\%$ (HR 5.7, 95% CI 3.0-10.8; $p = 0.0001$) and weak LIN28 staining (HR 2.3, 95% CI 1.2-4.4; $p = 0.008$) were independent predictors of recurrence in adult patients. Interestingly, *mir-9* expression, a negative *LIN28A/B* regulator, was significantly higher in aggressive than in non-aggressive ACCs [2076 (from 36 to 9307) vs. 133.4 (from 2.4 to 5193); $p = 0.011$] and was highly associated with reduced overall survival ($p = 0.01$) and disease-free survival ($p = 0.01$). In the pediatric population, no significant difference

was observed in the expression of LIN28 protein and *LIN28A* and *mir-9* gene expression between clinically benign and clinically malignant tumors. Additionally, overexpression of *LIN28B* was significantly associated with reduced disease-free survival ($p = 0.026$), but not with overall survival ($p = 0.406$). Copy number variation analysis showed that only a child with a virilizing benign tumor had *LIN28B* amplification and a woman with a metastatic adrenocortical carcinoma had *LIN28B* deletion. No *LIN28A* copy number variation was detected. A Ki67 $\geq 20\%$ in children was able to discriminate patient with worse prognosis: there was a significant association with reduced overall ($p = 0.015$) and disease-free survival ($p = 0.001$) in 36 pediatric ACTs with Weiss ≥ 3 . **CONCLUSIONS:** Weak LIN28 staining was associated with reduced disease-free survival in a large cohort of adult adrenocortical carcinoma. *LIN28A* had higher expression in aggressive carcinomas in adults, suggesting there might be negative posttranscriptional regulation of LIN28 protein expression. Interestingly, overexpression of *mir-9*, a negative *LIN28A* regulator, predicted poor outcome in adult patients. In addition, *LIN28B* overexpression was an potential marker of poor prognosis in the pediatric population. A Ki67 index $\geq 10\%$ in adults and $\geq 20\%$ in children were associated with poor prognosis.

Descriptors: Adrenocortical carcinoma. Gene expression. MicroRNAs. Carcinogenesis. Neoplastic regulation of gene expression. Neoplasm proteins. Tumor biologic markers. Prognosis. Survival. RNA-binding protein.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumores Adrenocorticais

A frequência de tumores adrenocorticais (TACs) na população geral é elevada, sendo estes comumente descobertos ao acaso, como incidentalomas em investigação médica por motivos não relacionados. A prevalência de incidentalomas adrenais tem sido estimada por volta de 1% a 7% da população geral, sendo a incidência aumentada com o avançar da idade^{1,2}. Classicamente, os TACs apresentam-se como massas unilaterais e a maioria são adenomas adrenocorticais não-funcionantes (lesões benignas)¹. Entretanto, TACs podem causar secreção hormonal excessiva e alguns podem ser malignos. Os TACs malignos, os chamados carcinomas adrenocorticais, são raros, com uma prevalência estimada em 0,5-2 casos por milhão por ano^{3,4}. Seu diagnóstico apresenta uma distribuição bimodal, com um primeiro pico tipicamente acometendo pacientes na infância e um segundo pico na quarta a quinta década de vida⁴. No sudeste brasileiro, há um aumento da incidência destes tumores em crianças para cerca de 12 casos por milhão por ano, decorrente da elevada frequência da mutação germinativa Arg337His (R337H) no gene supressor tumoral *TP53*^{5,6}.

Os carcinomas adrenocorticais costumam ser tumores agressivos e apresentam um prognóstico bem reservado, com a maior parte das séries relatando taxas de sobrevida em cinco anos inferiores a 35%^{7,8}. Esse prognóstico ruim é resultante de um rápido crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases à distância, notadamente

para o fígado, pulmões e, em menor escala, para os ossos. A secreção de níveis anormais de hormônios esteroidais – tipicamente glicocorticoides, androgênios ou precursores esteroidais no caso de tumores malignos – pode também ser responsável por morbidade considerável, podendo levar a complicações metabólicas e cardiovasculares importantes (ex: hiperglicemia severa, hipertensão arterial de difícil controle), além de maior predisposição a infecções graves, hipocalcemia e miopatia, notadamente quando há falência nas terapias empregadas para controle hormonal⁷.

Embora o prognóstico em pacientes com carcinoma adrenocortical em geral seja muito ruim, há uma considerável heterogeneidade entre os indivíduos, com a extensão do tumor no momento do diagnóstico representando um importante fator associado à mortalidade global. A sobrevida em pacientes com carcinoma adrenocortical restrito à glândula suprarrenal (Estadiamento ENSAT 1 e 2, quando ≤ 5 cm ou > 5 cm, respectivamente) é consideravelmente maior do que em pacientes com tumores com estadiamento ENSAT 3 ou 4 (isto é, tumores que se disseminaram além da cápsula adrenal e de tumores que apresentam metástase à distância, respectivamente), principalmente em relação àqueles que já metastatizaram⁸ (Apêndice A). Todavia, a sobrevida global em pacientes com tumores metastáticos é bem variável⁹. Ademais, mesmo em pacientes com carcinomas adrenocorticais inicialmente restritos à glândula suprarrenal, a taxa de recorrência após remoção cirúrgica completa é variável⁹. Essa heterogeneidade nos desfechos dessa doença aponta para a existência de diferentes classes de tumores com aberrações biológicas distintas, provavelmente refletindo mecanismos oncogênicos subjacentes variáveis.

Como consequência dessa heterogeneidade, o diagnóstico de malignidade torna-se difícil em pacientes com TACs localizados dependendo, assim, de

investigações hormonais e de imagem prévias à cirurgia, juntamente com a análise patológica pós-operatória do tecido tumoral adrenocortical. Para os patologistas, o diagnóstico dos carcinomas adrenocorticais, assim como ocorre em outras neoplasias endócrinas, pode ser particularmente difícil, devido às limitações inerentes à patologia. De fato, o critério diagnóstico mais comumente utilizado para análise patológica de rotina é o escore de Weiss, proposto há mais de 30 anos¹⁰. Esse sistema de escore histopatológico é baseado na soma de nove itens, que incluem: grau nuclear alto (3 ou 4), índice mitótico (> 5 mitoses por 50 campos de grande aumento), mitoses atípicas, proporção de células claras $< 25\%$, arquitetura difusa, necrose, invasão venosa, invasão capsular e invasão sinusoidal¹⁰ (Apêndice B). Qualquer tumor que combine três ou mais critérios é considerado maligno. No entanto, a análise pelo sistema de escore de Weiss demanda tempo, requer experiência considerável pelo patologista e sofre de limitações que podem comprometer seu desempenho¹¹. Por exemplo, a reprodutibilidade do escore de Weiss, mesmo entre patologistas experientes, é limitada¹². Embora a popularidade do sistema de Weiss na avaliação de TACs possa ser amplamente atribuída a sua confiabilidade, reprodutibilidade e relativa simplicidade comparada com outros sistemas propostos, diversos autores acreditam que o reconhecimento e interpretação de alguns dos critérios histopatológicos de Weiss são difíceis e sujeitos a variabilidade interindividual¹¹. Em 2002, Aubert *et al.*¹³ propuseram simplificar o sistema de Weiss eliminando critérios que eram considerados mais subjetivos ou difíceis de interpretar (Apêndice C). Utilizando uma análise de regressão passo a passo, um sistema de escore modificado foi criado usando cinco critérios: 2x índice mitótico + 2x células claras + mitoses atípicas + necrose + invasão capsular. Estes

cinco critérios histológicos foram incluídos nesse sistema baseado em elevada concordância interobservador. Para um dado tumor, cada critério recebe um escore de 0, se ausente, e 1, quando presente, produzindo um escore global que varia de 0 a 7. À semelhança do sistema de Weiss original, um escore de 3 ou mais é considerado indicativo de malignidade. Esse sistema modificado se correlacionou bem com o sistema de Weiss original e pode ser mais fácil de utilizar na prática, já que apenas cinco características histológicas são avaliadas, ao invés de nove. Um estudo recente confirmou a validade diagnóstica do sistema de Weiss modificado para avaliação de malignidade em neoplasias adrenocorticais e também demonstrou que esse sistema correlaciona-se significativamente com tempo de sobrevida em pacientes com carcinoma adrenocortical¹⁴. Em nosso serviço, utilizamos rotineiramente o sistema de Weiss clássico para distinção entre adenomas e carcinomas em adultos, porém a presença de alguns critérios tais como índice mitótico, invasão capsular e necrose são importantes fatores considerados na decisão da terapia adjuvante com mitotane.

Diferentemente dos adultos, os TACs pediátricos com prognóstico aparentemente desfavorável, baseado nos critérios histopatológicos de Weiss, geralmente apresentam melhor evolução clínica¹⁵⁻¹⁷. As manifestações clínicas e o comportamento biológico dos TACs pediátricos são consideravelmente distintos das lesões homólogas na população adulta, tornando equívocos os critérios patológicos para distinção entre lesões benignas e malignas. Wieneke *et al.*¹⁵ conduziram um importante estudo de avaliação histopatológica e seguimento de 83 crianças com neoplasias adrenocorticais. Dentre as crianças com Weiss maior ou igual a 3, apenas 31% apresentaram comportamento clínico maligno com desenvolvimento de recorrência e/ou metástases. Algumas características foram associadas com uma maior

probabilidade de comportamento clínico maligno, dentre elas: peso tumoral maior que 400 g, tamanho tumoral maior que 10,5 cm, invasão de veia cava, invasão capsular e/ou vascular, extensão para tecido adiposo periadrenal, necrose confluyente, atipia nuclear severa, mais que 15 figuras mitóticas por 20 campos de grande aumento e a presença de mitoses atípicas. Na análise multivariada, invasão de veia cava inferior, necrose e índice mitótico aumentado foram independentemente associados com comportamento clínico maligno. Diante desses achados e observações, embora rotineiramente utilizamos em nosso serviço o sistema de Weiss para pontuar os TACs pediátricos, optamos por utilizar as nomenclaturas “cl clinicamente benignos” e “cl clinicamente malignos” para classificação dos mesmos.

Atualmente, a ressecção cirúrgica completa de doença limitada à glândula suprarrenal permanece como o único procedimento potencialmente curativo¹⁸. Opções terapêuticas para doença mais avançada ainda são bastante restritas. A maioria dos dados publicados indicam alta taxa de recorrência mesmo após ressecção completa, o que claramente sugere uma necessidade de tratamentos adjuvantes. A droga mitotane (o, p'-DDD) é uma isoforma do inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) e é a única droga aprovada para o tratamento do carcinoma adrenocortical. Ela é utilizada para bloqueio hormonal de neoplasias funcionantes avançadas e possui também atividade adrenolítica direta¹⁹⁻²¹. A melhor evidência para o papel de tratamentos adjuvantes é derivada de um grande estudo retrospectivo desenvolvido por Terzolo *et al.*²². Neste estudo multicêntrico, com dois grupos controles independentes, o risco de recorrência e morte foi reduzido significativamente com o uso adjuvante do agente adrenolítico mitotane (mediana de recorrência de sobrevida livre de doença de 42 meses *versus* 10 e 25 meses nos dois grupos controles; $p < 0,01$).

A maioria dos centros especializados ao redor do mundo, portanto, recomendam o uso de mitotane adjuvante após a ressecção completa em pacientes de alto risco (tumor ≥ 8 cm, presença de invasão capsular ou vascular, Ki67 $\geq 10\%$). Um estudo randomizado chamado ADIUVO (*Efficacy of Adjuvant Mitotane Treatment*) encontra-se em andamento para elucidar o papel do mitotane em uma população de pacientes de risco baixo a intermediário (www.adiuvo-trial.org).

Em pacientes com doença avançada e/ou rapidamente progressiva não responsiva ao mitotane, geralmente é indicado o uso de quimioterapia citotóxica, embora a taxa de resposta e eficácia tem se mostrado muito limitadas²³. O estudo FIRM-ACT (*First International Randomized Trial in Locally Advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment*) foi o primeiro estudo multicêntrico internacional randomizado comparando dois regimes diferentes de quimioterapia citotóxica (etoposídeo, doxorrubicina, cisplatina + mitotane ou estreptozotocina + mitotane) em pacientes com carcinoma adrenocortical avançado ou metastático²⁴. As taxas de resposta e sobrevida livre de doença foram significativamente maiores no primeiro grupo, embora do ponto de vista absoluto essa eficácia tenha sido muito modesta (mediana de sobrevida livre de doença 5 meses *versus* 2,1 meses).

Novas terapias-alvo também já foram testadas em pacientes com carcinoma adrenocortical, porém os resultados tem se mostrado bastante decepcionantes. A inibição do EGFR e do VEGF não resultaram em benefícios substanciais em pacientes com doença avançada²⁵⁻²⁸. Resultados igualmente desanimadores foram observados com o uso do sunitinib²⁹, um inibidor de tirosina quinase, e do everolimus³⁰, um inibidor da mTOR. Em contraste, resultados preliminares de um estudo fase I com um inibidor do IGF-1R (OSI-906) mostraram-se promissores. Em

cinco de dezesseis pacientes adultos com carcinoma adrenocortical, atingiu-se estabilização da progressão da doença por mais de 12 semanas, incluindo um paciente que apresentou mais de 80% de redução de massa tumoral³¹. Um estudo multicêntrico internacional fase III com essa droga como terapia de segunda ou terceira linha encontra-se em andamento, com término previsto para 2014 (GALACCTIC, NCT00924989).

1.2 Patogênese molecular dos TACs

Progressos consideráveis foram feitos no entendimento dos mecanismos moleculares de tumores esporádicos baseado em estudos de síndromes genéticas raras associadas com carcinoma adrenocortical e estudos de perfil genético desses tumores. Alterações genéticas, tais como ganhos ou perdas cromossômicas completas ou parciais, foram identificadas utilizando hibridização genômica comparativa ou marcadores de microssatélite. Perdas cromossômicas nas regiões 1p, 17p, 22p, 22q, 2q e 11q foram determinadas por hibridização genômica comparativa em até 62% dos pacientes com carcinoma adrenocortical esporádico³², enquanto que marcadores de microssatélite revelaram uma alta prevalência de perda de heterozigosidade ou desbalanço nos cromossomos 11q13 ($\geq 90\%$), 17p13 ($\geq 85\%$) e 2p16 (92%) em pacientes com essa doença^{22,34}. Esses dados demonstram que há uma ampla e quase constante perturbação genética nesses tumores. Muitos desses genes correspondem a oncogenes ou genes supressores tumorais. Além disso, algumas das alterações genéticas são relevantes não somente do ponto de vista da patogênese, mas também possuem potencial valor diagnóstico, terapêutico e prognóstico, como, por exemplo, no caso do IGF-2 e do SF-1.

A sinalização da via IGF é envolvida tanto no desenvolvimento como na manutenção de funções adrenocorticais diferenciadas. Um papel fisiopatológico desta via de sinalização já foi bem documentada em TACs³⁴. O gene *IGF-2*, localizado no cromossomo 11p15, codifica um fator de crescimento fetal que é expresso exclusivamente do alelo paterno herdado, em virtude de *imprinting* materno³⁵. Defeitos genéticos ou epigenéticos na região de *imprinting* do 11p15 podem aumentar a expressão do *IGF-2*, como ocorre em pacientes portadores da síndrome de Beckwith-Wiedemann, que apresentam macrosomia, organomegalia e predisposição ao desenvolvimento de múltiplos tumores, incluindo carcinoma adrenocortical³⁶. A hiperexpressão do RNAm do *IGF-2* é observada na maioria dos carcinomas adrenocorticais³⁷⁻³⁹. Ela ocorre principalmente por perda do alelo materno e duplicação do alelo paterno, conhecida como isodissomia paterna, ou, menos frequentemente, por perda do *imprinting* materno³⁸. O efeito de crescimento parácrino e autócrino do IGF-2 é mediado pelo IGF-1R⁴⁰. A ativação do IGF-1R via IGF-2 tem um papel fundamental na tumorigênese de forma geral, proliferação e disseminação de vários cânceres⁴¹. A análise de loco 11p15 nos TACs é útil, visto que a perda de heterozigosidade do 11p15 é significativamente mais frequente em carcinomas do que em adenomas adrenocorticais (78,5% *versus* 9,5%) e está associada como maior risco de recorrência tumoral³⁴. Em contraste com os TACs em adultos, os transcritos do *IGF-2* são hiperexpressos em ambos os adenomas e carcinomas adrenocorticais pediátricos³⁹. Além disso, a hiperexpressão do *IGF-1R* foi demonstrada em TACs pediátricos clinicamente malignos³⁹. Interessantemente, demonstrou-se que um inibidor seletivo de IGF-1R quinase possui atividade antitumoral *in vitro*³⁹. A inibição do IGF-1R levou a bloqueio da proliferação celular de uma forma dose e tempo-dependente, por meio de

aumento significativo de apoptose tanto em células NCIH295 como em uma linhagem celular de TAC pediátrico. Um outro estudo em camundongos demonstrou que a inibição do IGF-1R também levava a redução tumoral *in vivo*, sendo a magnitude de supressão amplificada pelo uso combinado de mitotane⁴².

Alterações genéticas da via de sinalização Wnt, que inicialmente foram identificadas em pacientes com polipose adenomatose familiar, já foram demonstradas em uma série de outros cânceres humanos⁴³. A via de sinalização Wnt encontra-se ativa durante o desenvolvimento embrionário normal, sendo a β -catenina um componente chave dessa via. A ativação constitutiva da β -catenina é a alteração mais frequente em TACs benignos e malignos^{44,45}. Em um subgrupo desses tumores, mutações somáticas do gene da β -catenina (*CTNNB1*) inativam o sítio de fosforilação da glicogênio sintase quinase 3 β ⁴⁴. A sinalização da via Wnt se correlaciona com a concentração intracelular de β -catenina. Em um modelo de camundongo transgênico, a ativação constitutiva da β -catenina induziu hiperplasia adrenal e promoveu desenvolvimento de câncer adrenocortical⁴⁶. Um estudo franco-alemão envolvendo 79 adultos com carcinoma adrenocortical revelou que pacientes que tinham mutação do gene *CTNNB1* (prevalência de 18%) e/ou expressão anômala de β -catenina (expressão nuclear) apresentavam estadiamento tumoral mais avançado (ENSAT III ou IV), escore de Weiss mais elevado, maior frequência de necrose e mitoses, além de estarem significativamente associados com diminuição de sobrevida global e livre de doença⁴⁷. Outro estudo, envolvendo um centro de referência nos Estados Unidos e outro no Brasil, mostrou prevalência semelhante de mutação do *CTNNB1* em adultos com carcinoma adrenocortical (23%), e a expressão anômala de β -catenina, definida por imunorreatividade

citoplasmática ou nuclear, também foi significativamente associada com desfecho desfavorável⁴⁸. Nesse estudo, não houve diferença significativa entre adenomas e carcinomas quanto à frequência de expressão anômala de β -catenina (24% *versus* 30%) ou mutação do *CTNNB1* (22% *versus* 23%), sugerindo que a via Wnt exerce papel-chave, mas que provavelmente múltiplas outras alterações são necessárias nos mecanismos de tumorigênese adrenocortical e agressividade tumoral. Pesquisadores de outro centro especializado brasileiro demonstraram que a prevalência de mutação do *CTNNB1* foi significativamente menor nos TACs pediátricos quando comparados aos adultos (6% *versus* 32%), mas também se correlacionou com prognóstico desfavorável na população pediátrica⁴⁹.

O SF-1 é um membro órfão da família de receptores nucleares de fatores de transcrição e desempenha um importante papel em funções endócrinas, incluindo regulação de hidroxilases esteroidais, desenvolvimento e função do córtex adrenal e diferenciação sexual masculina⁵⁰⁻⁵². Estudos prévios demonstraram hiperexpressão do *SF-1* na maioria dos casos pediátricos^{53,54}, mas também em muitos dos TACs em adultos^{54,55}. Além disso, a maior expressão de SF-1 leva ao aumento da proliferação de células adrenocorticais humanas *in vitro* e induzem tumorigênese em camundongos^{56,57}. Em conformidade com esses dados, a proliferação de células adrenocorticais estimuladas por SF-1 foi inibida *in vitro* por agonistas inversos de SF-1⁵⁸. Digno de nota, aumento da expressão proteica do SF-1 foi significativamente associado com desfecho desfavorável em uma coorte bastante expressiva de adultos⁵⁵. Em contraste com as crianças⁵⁴, os adultos com carcinoma adrenocortical e imunorreatividade forte para o SF-1 apresentaram diminuição significativa de sobrevida global e livre de doença⁵⁵.

Mutações germinativas no gene *TP53*, localizado no cromossomo 17p13, estão presentes em 70% das famílias com a síndrome de Li-Fraumeni. Esta síndrome confere susceptibilidade ao carcinoma de mama, sarcoma de tecidos moles, tumores cerebrais, osteosarcoma, leucemia e carcinoma adrenocortical⁵⁹. Esses tumores tem uma apresentação precoce e afetam principalmente crianças e adultos jovens. Mutações germinativas no *TP53* foram observadas em 50-86% das crianças com carcinoma adrenocortical aparentemente esporádico^{6,49,60} e, apenas em cerca de 4% a 7,5% em adultos^{61,62}, embora, em nosso meio, essa prevalência definitivamente é maior que a média mundial, variando entre 13% a 28%, considerando apenas mutações do códon R337H^{6,48}. Em adultos, mutações somáticas do *TP53* são vistas em 20% a 35% dos casos de carcinoma adrenocortical esporádico⁶³⁻⁶⁵ e podem estar associadas com tumores mais avançados e agressivos⁶⁵. A perda de heterozigosidade no loco 17p13 foi reportada mais frequentemente em pacientes com carcinomas do que em adenomas adrenocorticais (85% *versus* 30%) e é um preditor independente de recorrência após remoção cirúrgica completa de tumores localizados³⁴.

Por meio de estudos de expressão gênica de larga escala, conhecidos como análise de transcriptoma, foi demonstrado que o perfil de expressão gênica de TACs benignos diferem significativamente dos carcinomas adrenocorticais^{66,67}, o que sugere que esse tipo de análise pode oferecer novas ferramentas diagnósticas. A análise do transcriptoma de TACs confirmou que o *IGF-2* é o gene mais hiperexpresso nos carcinomas adrenocorticais quando comparados a adenomas ou a glândula adrenal normal⁶⁶. Além disso, esses achados foram confirmados por outra análise de *microarray*, que também revelou ativação frequente de genes-alvo da via de sinalização do Wnt em carcinomas adrenocorticais⁶⁷. Um outro estudo

envolvendo 34 carcinomas adrenocorticais mostrou que a diferença na expressão dos genes *BUB1B* e *PINK1* foi o preditor mais significativo de redução de sobrevida global⁶⁸. Ademais, análises independentes levaram a classificação de dois grupos distintos de carcinomas adrenocorticais, com prognóstico bom ou ruim, indicando que a análise do transcriptoma poderá também revelar novos fatores prognósticos^{68,69}. Uma metanálise de estudos de expressão gênica por *microarray* e hibridização genômica comparativa revelou três principais vias patogênicas na tumorigênese adrenocortical: primeiro, danos do ciclo celular; segundo, alteração na sinalização do ácido retinoico; e terceiro, alteração na apresentação antigênica e do sistema complemento⁷⁰.

Na última década, novos protagonistas conhecidos como microRNAs (miRNAs), que possuem papel fundamental na regulação da expressão gênica global, tem sido amplamente estudados visando melhor entendimento da patogênese de uma série de doenças. Os miRNAs constituem uma classe de pequenos RNAs não-codificáveis capazes de reprimir a expressão de determinados genes alvo, ao ligarem-se à sequências complementares existentes na região 3' não-traduzível do RNA mensageiro (RNAm)⁷¹. Eles formam uma importante classe de reguladores que participam de inúmeras funções biológicas, incluindo desenvolvimento, proliferação celular, diferenciação e apoptose (Figura 1).

Onde: *Pri-miRNA* - transcrito primário de miRNA; *Pre-miRNA* - molécula precursora de miRNA; dsRNA - RNA de dupla hélice; siRNA - pequeno RNA de interferência. RISC - complexo silenciador induzido por ribossomo; ORF - fase de leitura aberta.

Figura 1 - miRNAs são pequenos RNAs não-codificáveis com cerca de 20-25 nucleotídeos que desempenham um importante papel na regulação da expressão gênica. Eles são expressos no núcleo como qualquer outro gene. O transcrito primário (*Pri-miRNA*) é clivado no núcleo pela enzima Drosha, dando origem à molécula precursora de miRNA (*Pré-miRNA*). O *Pré-miRNA* é exportado ao citoplasma pela proteína Exportina 5, onde sofre processamento pela enzima Dicer para formar o miRNA maduro, que então interage com o RISC e se liga à sequência complementar de RNAm alvos, finalmente levando a bloqueio da expressão proteica, por meio de repressão translacional ou clivagem do RNAm [Adaptado de He e Hannon⁷²]

O estudo dos miRNAs em diversas neoplasias humanas trouxe à tona novos entendimentos sobre o papel dessas moléculas na iniciação e na progressão tumoral. O perfil de expressão de miRNAs em diversos tumores humanos tem permitido a identificação de assinaturas associadas a diagnóstico, estadiamento, progressão, prognóstico e resposta ao tratamento. Recentemente, vários estudos de perfil de expressão de miRNAs demonstraram o potencial de diferenciação entre adenomas e carcinomas adrenocorticais, estratificação de risco e prognóstico⁷³⁻⁷⁶. Seis estudos até o momento focaram em perfil de expressão de miRNA em TACs em adultos (Quadro 1)^{74,75,77-80}.

Quadro 1 - Resumo dos principais estudos que avaliaram perfil de expressão de microRNAs em TACs de adultos

Estudo	Tumores	miRNAs desregulados	Achados principais
Patterson <i>et al.</i> ⁷⁴	26 adenomas / 10 carcinomas / 21 córtex normais	mir-483-5p , <i>mir-195</i> , <i>mir-125b</i> , <i>mir-100</i>	Hiperexpressão do <i>mir-483-5p</i> foi capaz de diagnosticar carcinomas. O <i>mir-483-5p</i> e <i>IGF-2</i> foram coexpressos
Soon <i>et al.</i> ⁷⁵	27 adenomas / 22 carcinomas / 6 córtex normais	<i>mir-195</i> , <i>mir-335</i> , <i>mir-7</i>	Níveis elevados do <i>mir-483-5p</i> e níveis reduzidos do <i>mir-195</i> foram preditores de pior sobrevida global
Tömböl <i>et al.</i> ⁷⁷	8 adenomas / 4 carcinomas / 4 córtex normais	mir-184 , mir-210 , mir-503 , <i>mir-214</i> , <i>mir-511</i>	Diferença entre $\Delta\text{Ct mir-511}$ e $\Delta\text{Ct mir-503}$ foi capaz de diferenciar carcinomas de adenomas
Schmitz <i>et al.</i> ⁷⁸	9 adenomas / 4 carcinomas / 4 córtex normais	<i>mir-675</i> , <i>mir-335</i>	Hipoexpressão do <i>mir-675</i> e/ou do <i>mir-335</i> é associada a malignidade
Özata <i>et al.</i> ⁷⁹	26 adenomas / 22 carcinomas / 10 córtex normais	mir-483-3p , mir-483-5p , mir-210 , mir-21 , <i>mir-1974</i> , <i>mir-195</i> , <i>mir-497</i>	Hipoexpressão do <i>mir-483-3p</i> e hiperexpressão do <i>mir-195</i> e <i>mir-497</i> induziram apoptose <i>in vitro</i>
Chabre <i>et al.</i> ⁸⁰	16 adenomas / 30 carcinomas	mir-483-5p , <i>mir-195</i> , <i>mir-335</i>	Níveis circulantes elevados do <i>mir-483-5p</i> ou níveis reduzidos do <i>mir-195</i> foram preditores de diminuição de sobrevida global e livre de doença

*miRNAs em negrito são hiperexpressos e os regulares hipoexpressos em carcinomas comparados a adenomas

Esses estudos revelaram que diversos miRNAs são diferencialmente expressos em carcinomas adrenocorticais quando comparados a adenomas, sendo a hiperexpressão do *mir-483-5p* o achado mais consistente^{74,75,79,80}. Curiosamente, o gene codificador deste miRNA localiza-se dentro do loco do *IGF-2*, um gene que é hiperexpresso em carcinomas adrenocorticais de forma consistente⁶⁷. Além disso, os níveis de expressão do *mir-483-5p* correlacionam-se positivamente com a expressão do *IGF-2*. MiRNAs com expressão diminuída em carcinomas adrenocorticais também já foram identificados como, por exemplo, o *mir-195* e o *mir-335*^{74,75,78-80}. Embora a relevância desses miRNAs, especialmente do *mir-483-5p*, para o diagnóstico dos TACs, comparados com a patologia convencional ou outros marcadores moleculares, ainda precisa ser

determinada, eles podem, no mínimo, ter um valor diagnóstico potencial. O resultado de dois estudos sugerem que níveis de expressão de miRNAs selecionados podem identificar subtipos de câncer associados com diferentes sobrevidas em pacientes com carcinoma adrenocortical^{75,79}. Análises de agrupamento utilizando perfil de expressão de miRNA obtido por *microarray* foi capaz de distinguir três subgrupos de tumores, cada um associado a taxas de sobrevida diferentes⁷⁹. Além disso, a análise de expressão por RT-PCR no tecido tumoral mostrou que níveis aumentados do *mir-483-5p* e níveis reduzidos do *mir-195* foram associados com aumento da mortalidade⁷⁵. Em uma recente publicação, Chabre *et al.* avaliaram se o perfil de miRNAs séricos circulantes poderia fornecer algum valor prognóstico⁸⁰. Seus resultados mostraram uma associação importante dos níveis de expressão do *mir-483-5p* e do *mir-195* em amostras de soro de pacientes com fenótipo agressivo de carcinoma adrenocortical e que apresentaram alta taxa de mortalidade. O *mir-195* mostrou-se o melhor biomarcador na distinção entre TACs benignos e malignos, enquanto que o *mir-483-5p* foi capaz de diferenciar tumores recorrentes de tumores não recorrentes. Esses achados são de extremo interesse no que diz respeito à utilidade do rastreamento de pacientes utilizando a dosagem sérica desses miRNAs. Dois outros estudos que avaliaram níveis de miRNAs séricos em pacientes portadores de TACs mostraram, de forma consistente, que o *mir-483-5p* encontra-se hiperexpresso nos carcinomas quando comparados a adenomas^{81,82}. Até o momento, apenas um único trabalho avaliou o perfil de expressão de miRNAs na população pediátrica. Doghman *et al.*⁷⁶ analisaram 25 TACs pediátricos e cinco amostras de tecido adrenocortical normal pareados pela idade. O *mir-483-3p* mostrou-se elevado tanto em TACs benignos como em malignos, o que é consistente com o achado de que o *IGF-2* encontra-se hiperexpresso em TACs pediátricos independente do comportamento clínico

e agressividade³⁹. O *mir-99a* e do *mir-100* estavam entre os miRNAs menos expressos nos TACs pediátricos em comparação ao tecido adrenocortical normal⁷⁶. Esses autores verificaram ainda que a hipoexpressão do *mir-100*, em uma linhagem celular de carcinoma adrenocortical, promoveu um aumento significativo da expressão do IGF-1R, sugerindo ser este um dos mecanismos que explicam a hiperexpressão do *IGF-1R* nos TACs pediátricos.

Um importante estudo recente envolvendo uma força-tarefa de múltiplos centros europeus realizou uma análise genômica integrada de 45 pacientes com carcinoma adrenocortical, por meio de técnicas de larga escala, incluindo sequenciamento exômico paralelo, SNP *array*, análise de metilação de DNA, *arrays* de expressão de RNAm e sequenciamento de miRNA⁸³. Alterações recorrentes foram encontradas em vários genes já sabidamente envolvidos na tumorigênese adrenocortical (*CTNNB1*, *TP53*, *CDKN2A*, *RBI* e *MEN1*), mas também em outros não previamente reportados (*ZNRF3*, *DAXX*, *TERT* e *MED12*). Os novos genes identificados foram validados em uma coorte independente de 77 carcinomas adrenocorticais. O *ZNRF3*, que codifica uma ligase ubiquitina E3 de superfície celular, foi o gene mais frequentemente alterado (21%), constituindo um potencial novo gene supressor tumoral relacionado à via da β -catenina. A análise genômica integrada permitiu, ainda, a identificação de dois subgrupos moleculares distintos com evoluções opostas. O grupo C1A, de pior prognóstico, apresentou inúmeras mutações e alterações de metilação de DNA, enquanto que o grupo C1B, de boa evolução clínica, apresentou desregulação específica de dois *clusters* de miRNA. Esses autores concluem, portanto, que carcinomas adrenocorticais agressivos e indolentes correspondem a duas entidades moleculares distintas dirigidas por diferentes alterações oncogênicas.

1.3 Pluripotencialidade Celular, Lin28 e miRNAs Regulatórios

Os tumores malignos, de um modo geral, apresentam uma grande heterogeneidade na morfologia celular, índices de proliferação, alterações genéticas e respostas terapêuticas. Os mecanismos celulares e moleculares relacionados à heterogeneidade tumoral são provavelmente decorrentes de diferenças nas células de origem tumoral e nos mecanismos que selecionam as células-tronco tumorais, uma subpopulação celular com vantagens adicionais de proliferação e sobrevivência, que se tornam responsáveis pela propagação do tumor⁸⁴ (Figura 2).

Figura 2 - A célula de origem de um câncer é provavelmente uma célula progenitora com ação precoce no processo de diferenciação das células-tronco embrionárias. O acúmulo de eventos genéticos ou epigenéticos em uma célula, proveniente da população anormal de células em proliferação durante a progressão tumoral, resultará na emergência de uma subpopulação celular com vantagens adicionais de proliferação e sobrevivência (célula tronco tumoral ou *cancer stem cell*, *CSC*), que se tornam responsáveis pela propagação do tumor [Adaptado de Visvader⁸⁴]

Desde 1950, vários estudos têm demonstrado que células provenientes da região subcapsular da glândula suprarrenal se deslocam centripetamente para promover a regeneração das células corticais⁸⁵. Mais recentemente, estudos genéticos identificaram na região subcapsular uma população celular com funções de célula-tronco embrionária ou progenitora, que tem sido considerada como as prováveis

células de origem dos tumores adrenocorticais⁸⁵⁻⁸⁷.

A reprogramação de fibroblastos humanos adultos em células-tronco pluripotentes pode ser induzida por uma combinação de fatores (OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC), originalmente usada para reprogramar fibroblastos de camundongos de volta a um estado pluripotente⁸⁸⁻⁸⁹. De forma interessante, o LIN28 (também conhecido como LIN28A), uma proteína reguladora de microRNAs (miRNAs), associado a outros fatores de transcrição (OCT4, SOX2, NANOG) foi capaz de promover a reprogramação nuclear de fibroblastos humanos adultos em células-tronco pluripotentes⁹⁰.

Recentes evidências sugerem que a biogênese dos miRNAs pode ser regulada por meio de mecanismos pós-transcricionais^{91,92}. O Lin28, uma proteína ligadora de RNA altamente conservada, surgiu como um importante modulador do processamento do miRNA *let-7*⁹². A interação entre o Lin28 e o *let-7* é o exemplo melhor caracterizado entre a relação de um miRNA e seu regulador pós-transcricional. O papel do Lin28 como repressor do processamento da família de miRNAs *let-7* sugere que a repressão do *let-7* é importante no estabelecimento do estado de pluripotencialidade⁹².

O Lin28 foi primeiramente caracterizado no *Caenorhabditis elegans* como um importante regulador do processo de desenvolvimento embrionário desta larva^{93,94}. Mutações no gene *lin28* modificam o desenvolvimento normal da larva, fazendo com que determinados eventos aconteçam mais precocemente ou tardiamente do que o normal. Os homólogos mamíferos do *Lin28*, Lin28 e Lin28b, se ligam à alça terminal dos precursores da família de microRNAs do *let-7*, bloqueando seu processamento em miRNAs maduros^{91,95-98} (Figura 3).

Onde: TUT-4, transferase uridilil terminal tipo 4

Figura 3 - Em circunstâncias normais, o *let-7* sofre o processamento normal dos miRNAs, e o *let-7* maduro inibe vários oncogenes, incluindo fatores pró-mitogênicos e genes relacionados ao ciclo celular (painel à esquerda), o que o implica classicamente como um miRNA supressor tumoral. O Lin28 age bloqueando o processamento normal do *let-7*, inibindo a formação do pré-*let-7* e do *let-7* maduro (painel ao centro). Ao reprimir o *let-7*, o Lin28, consequentemente, ativa as vias oncogênicas acima descritas, contribuindo para manutenção de células em estado indiferenciado. Há, ainda, uma alça regulatória inversa, em que o *let-7* se liga à região 3' não traduzível do RNAm do Lin28, bloqueando a sua expressão⁹². Embora não demonstrado na figura, é sabido que o *mir-9*, *mir-30* e *mir-125* também são importantes reguladores do Lin28⁹⁹ [Adaptado de Viswanathan e Daley⁹²]

Relatos recentes sugerem que o Lin28 interage com a Transferase Uridilil Terminal (TUTase) no bloqueio da produção do *let-7* maduro. O Lin28 e Lin28b possuem uma atividade TUTase que resulta na adição de uma cauda poli-U ao precursor do *let-7*, o pré-*let-7*⁹⁵. O pré-*let-7* uridilado não processado de maneira eficiente pela enzima *Dicer* e é, então, direcionado para a degradação. Um importante estudo demonstrou que, além da família *let-7*, os miRNAs *mir-9*, *mir-30* e *mir-125*, também são importantes reguladores pós-transcricionais dos genes *LIN28A* e *LIN28B*⁹⁹.

A redução da capacidade de regeneração de células-tronco embrionárias diminui, aparentemente devido a um aumento do *let-7* e a uma diminuição correspondente na expressão do Lin28 e *HMG2*, que são silenciados pelo *let-7*^{92,100} (Figura 4A). Os miRNAs maduros da família do *let-7* são pouco expressos em células-tronco

embrionárias, mas seus precursores primários são facilmente detectados¹⁰¹. No processo de reprogramação celular, o LIN28 reestabelece funcionalmente o c-MYC, um alvo conhecido do *let-7*, sugerindo que o LIN28 promove a reprogramação por meio da inibição da produção do *let-7* maduro^{102,103}. Adicionalmente ao c-MYC, diversos outros oncogenes são alvos conhecidos do *let-7*, incluindo o K-Ras e a ciclina D1¹⁰⁴. Vários relatos também indicam que o Lin28 pode alterar a expressão proteica por meio da regulação da estabilidade do RNAm¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, por exemplo, aumentando diretamente a eficiência de tradução do *OCT4*¹⁰⁷, além de modular a proliferação celular ao promover a tradução de uma série de reguladores do ciclo celular em células-tronco embrionárias de camundongos¹⁰⁶. O Lin28, portanto, pode promover a reprogramação celular através de vias dependentes e independentes de miRNAs.

Viswanathan *et al.*¹⁰⁸ demonstraram que o LIN28/LIN28B podem promover transformação maligna e que a ativação destes genes ocorrem em diversos tumores humanos, em uma frequência aproximada de 15%. É interessante destacar que todos os fatores de reprogramação celular descritos até hoje – OCT4, SOX2, KLF-4, c-MYC, NANOG e LIN28 – já foram relacionados à oncogênese⁹². Isto reforça a ideia de que a complexa reprogramação genômica, que acompanha os mecanismos de pluripotencialidade induzida, compartilha muitas semelhanças com a complexa, embora aberrante, reprogramação genômica que acompanha o processo de transformação neoplásica. Ressalte-se que o LIN28 e LIN28B são hiperexpressos especificamente nos subgrupos de tumores pouco diferenciados e que apresentam um pior prognóstico¹⁰⁸. De fato, demonstrou-se que diversos tipos de tumores agressivos e pouco diferenciados, como o câncer de mama basal-símile e o carcinoma de bexiga de alto grau, expressam uma assinatura genética semelhante às células-tronco embrionárias⁹⁴.

Tumores pouco diferenciados podem surgir a partir de células-tronco ou progenitoras que adquirem mutações adicionais ou a partir de células somáticas que sofrem processo de desdiferenciação por meio da ativação de componentes da maquinaria de pluripotencialidade (Figura 4B). Amplificações raras ou eventos de translocação podem explicar a hiperexpressão do *LIN28B* em algumas neoplasias, como tumor de Wilms¹⁰⁸.

Figura 4 - (A) O Lin28 é altamente expresso em fases precoces do desenvolvimento, em oposição ao *let-7*. À medida que as células vão se tornando mais diferenciadas, os níveis de Lin28 decrescem, em paralelo a um aumento concomitante do *let-7*. Embora aqui não representado, é esperado comportamento semelhante dos outros miRNAs reguladores do Lin28 (*mir-9*, *mir-30* e *mir-125*); (B) Tumores que expressam Lin28 podem surgir de duas maneiras: a partir de células-tronco ou progenitoras que expressam Lin28 e sofrem transformação por meio de aquisição de diversas mutações genéticas ou, de forma alternativa, a partir de uma célula somática que tenha sofrido transformação pela aquisição de mutações genéticas, levando à ativação do Lin28 por meio de mecanismos genéticos ou epigenéticos, nos estágios mais tardios da tumorigênese [Adaptado de Viswanathan e Daley⁹²]

A maneira exata pela qual o LIN28 contribui para a tumorigênese permanece um enorme campo a ser investigado. A redução da expressão do *let-7* correlacionou-se com radiorresistência em estudos *in vitro*¹⁰⁹. O bloqueio da expressão do LIN28 em uma linhagem de células de câncer de pulmão radiorresistentes levou ao aumento dos níveis de *let-7* e redução da expressão do *K-RAS*, resultando em maior radiosensibilidade¹¹⁰.

Diversos estudos colocam o Lin28/Lin28b dentro de uma importante rede regulatória envolvendo o c-Myc e o *let-7*. O Lin28/Lin28b reprime o *let-7*, que por sua vez é capaz de reprimir o Lin28/Lin28b, ao se ligar à região 3' não traduzível dos transcritos do *Lin28/Lin28b*, assim formando uma alça de duplo *feedback* negativo. Uma segunda alça de *feedback* existe entre o Lin28 e o c-Myc: o Lin28/Lin28b estimula o c-Myc por meio da inibição do *let-7*, e o c-Myc ativa a transcrição do Lin28 e Lin28b^{111,112}. De modo importante, a estimulação do c-Myc pode também contribuir para reprimir a transcrição de vários miRNAs e ativar a transcrição de determinados miRNAs oncogênicos¹¹³. Dessa forma, esta alça Lin28/*let-7*/c-Myc pode, em parte, explicar a desregulação generalizada de miRNAs constatada em vários cânceres humanos¹¹⁴.

Recentemente, foi demonstrado ainda que a hiperexpressão do LIN28B correlaciona-se com uma maior expressão de IGF-2 em câncer epitelial de ovário¹¹⁵. O LIN28 pode se ligar ao RNAm do *IGF-2* aumentando a eficiência da sua transcrição¹⁰⁵. Digno de nota, o *IGF-1R* é um importante alvo da família *let-7*, e alguns estudos têm demonstrado aumento de sua expressão em tumores que hiperexpressam LIN28B, tais como carcinoma hepatocelular¹¹⁶ e carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço¹¹⁷.

A expressão do LIN28 foi recentemente correlacionada com prognóstico ruim em diversos cânceres humanos^{108,118}. No entanto, o papel do LIN28, um importante regulador da reprogramação celular e do processamento de miRNAs, assim como de seus miRNAs regulatórios (família *let-7*, *mir-9*, *mir-30* e *mir-125*), não foram ainda estudados em TACs diagnosticados em crianças e adultos.

2 OBJETIVOS

- a) Determinar a expressão gênica dos genes *LIN28A* e *LIN28B* em 86 tumores adrenocorticais benignos e malignos de crianças e adultos.
- b) Correlacionar os dados de expressão com as características hormonais, diagnóstico histológico e evolução dos tumores adrenocorticais.
- c) Avaliar a imunorreatividade para o LIN28 utilizando uma micromatriz tecidual (TMA) com 200 casos de tumores adrenocorticais.
- d) Avaliar a imunorreatividade para o LIN28 em uma casuística externa (TMA contendo 110 carcinomas adrenocorticais) da Universidade de Wurzburg, Alemanha.
- e) Investigar amplificação ou deleção dos genes *LIN28A* e *LIN28B* pela técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA).
- f) Estudar a expressão da família *let-7*, *mir-9*, *mir-30* e *mir-125*, importantes miRNAs reguladores pós-transcricionais dos genes *LIN28A* e *LIN28B*.

3 MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

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 (FMUSP) (0429/11) (Anexo A) e pelo Comitê de Ética da Universidade de Wuerzburg. As avaliações hormonais da casuística brasileira e os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 da FMUSP, e as avaliações hormonais da casuística alemã foram realizadas no Hospital Universitário da Universidade de Wuerzburg.

Todos os pacientes participantes do estudo e/ou responsáveis preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B) ou o termo de assentimento (Anexo C), quando indicado.

3.2 Casuística

Foram estudados um total de 46 TACs pediátricos (Anexo D), 87 adenomas adrenocorticais (Anexo E) e 219 carcinomas adrenocorticais em adultos (Anexo F).

3.2.1 População dos estudos moleculares

Oitenta e seis pacientes não relacionados, adultos ou crianças de ambos os sexos, com TAC foram estudados quanto à expressão dos genes *LIN28A* e *LIN28B*. Os TACs esporádicos foram diagnosticados em 25 crianças e 61 adultos (Tabela 1).

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes com tumores adrenocorticais (n = 86)

	Crianças		Adultos	
	CB (n = 19)	CM (n = 6)	Adenomas (n = 31)	Carcinomas (n = 30)
Idade (anos) ^(A)	3,0 ± 0,7	3,8 ± 1,2	38,1 ± 2,6	35,3 ± 2,9
Sexo (F:M)	2,2 : 1	2,0 : 1	14,5 : 1	4,0 : 1
Seguimento (meses) ^(A)	95 ± 14	55 ± 26	76 ± 12	53 ± 13
Síndrome clínica n				
Cushing	1	0	18	6
Virilizante	13	3	1	4
Mista	5	3	1	13
Não funcionante	0	0	7	4
Outras	0	0	0	2
Não disponível	0	0	4	1

(A) Média ± EP; CB, clinicamente benigno; CM, clinicamente maligno.

Os pacientes foram submetidos à avaliação hormonal e realização de exames de imagem (ultrassonografia, tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética). O diagnóstico de TAC funcionante foi estabelecido a partir da determinação do cortisol urinário em amostras de 24 horas, avaliação da supressão do cortisol sérico após 1 mg de dexametasona (ou 20 mcg/kg para crianças), concentrações plasmáticas de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), andrógenos [testosterona, androstenediona, dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu composto sulfatado], precursores esteroidais (17-hidroxiprogesterona e 11-desoxicortisol), estradiol, aldosterona e atividade plasmática de renina.

O prognóstico dos pacientes foi avaliado a partir do estadiamento ENSAT⁸. Os TACs em pacientes adultos foram classificados de acordo com os critérios histopatológicos de Weiss: 31 adenomas adrenocorticais (escore de Weiss ≤ 2) e 30 carcinomas adrenocorticais (escore de Weiss ≥ 3) (10). No grupo pediátrico, observamos que aproximadamente 75% dos pacientes com escore de Weiss ≥ 3 apresentaram evolução clínica benigna com seguimento mínimo de 24 meses, confirmando que os critérios histopatológicos de Weiss não são bons preditivos de malignidade em crianças^{15,119,120}. Consequentemente, os TACs pediátricos foram classificados em clinicamente benignos ou clinicamente malignos¹⁵. O comportamento clínico de malignidade foi estabelecido em seis de 25 TACs pediátricos a partir de um estadiamento avançado (III ou IV) ou evolução clínica desfavorável. A mutação germinativa R337H do p53 foi identificada em 77% e 12% das crianças e adultos, respectivamente. A presença de metástases à distância ou recorrência local foi avaliada no momento do diagnóstico e durante as consultas de seguimento, através de tomografia computadorizada do tórax e abdome a cada três meses no primeiro ano, e a cada seis meses a partir do segundo ano. Os carcinomas em adultos foram ainda classificados em agressivos ou não agressivos de acordo com a presença de recorrência local e/ou metástases à distância diagnosticadas nos primeiros 12 meses de seguimento após a cirurgia (pacientes com carcinomas que não apresentaram metástases e tinham menos de 12 meses de seguimento foram excluídos dessa análise).

Adicionalmente, avaliou-se ainda a expressão de 14 miRNAs reguladores pós-transcricionais do LIN28 (*let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, *mir-98*, *mir-9*, *mir-30b*, *mir-30c*, *mir-125b*, *mir-125a-3p* e *mir-125a-5p*) em um subgrupo de

28 carcinomas adrenocorticais em adultos (três tumores dos 31 utilizados para análise de expressão gênica não tinham mais amostra disponível). Posteriormente, procedeu-se ainda com a determinação da expressão do *mir-9* em 13 adenomas de adultos e em 24 TACs pediátricos. Por fim, avaliou-se a variação no número de cópias dos genes *LIN28A* e *LIN28B* em um subgrupo de 58 TACs (39 adultos e 19 crianças). O estudo do número de cópias não foi realizado em todos os tumores, pois a alteração do número de cópias dos genes *LIN28A* ou *LIN28B* mostrou-se um evento muito raro.

3.2.2 População para avaliação da expressão proteica do LIN28 e Ki67

Para análise da expressão proteica do LIN28, foram selecionados 200 casos de TACs da Universidade de São Paulo, no período de 1979 a 2012 (Tabela 2), e 110 casos de carcinomas adrenocorticais da Universidade de Wuerzburg, Alemanha (*German ACC Registry*) (Tabela 3). A expressão proteica do LIN28 foi realizada em um TMA da coorte brasileira e em um TMA distinto alemão. Adicionalmente, avaliou-se a expressão proteica do Ki67 nos 200 pacientes do TMA Brasileiro e em 80 lâminas inteiras de pacientes oriundos do Registro Alemão de Carcinoma Adrenocortical (*German ACC Registry*).

Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes com tumores adrenocorticais (n = 200) (Coorte Brasileira, USP)

	Crianças		Adultos	
	CB (n = 35)	CM (n = 9)	Adenomas (n = 78)	Carcinomas (n = 78)
Idade (anos) ^(A)	2,6 ± 0,4	3,7 ± 0,8	44 ± 1,9	40 ± 1,8
Sexo (F:M)	1,7 : 1	2 : 1	6,8 : 1	3,6 : 1
Seguimento (meses) ^(A)	131 ± 14	42 ± 18	77 ± 7	54 ± 7
Síndrome clínica <i>n</i>				
Cushing	1	0	49	14
Virilizante	25	3	3	9
Mista	9	6	0	33
Não funcionante	0	0	22	15
Outras	0	0	0	2
Não disponível	0	0	4	5

(A) Média ± EP; CB, clinicamente benigno; CM, clinicamente maligno.

Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes com carcinomas adrenocorticais (n = 110) (Coorte Alemã, Universidade de Wuerzburg)

	Carcinomas (n = 110)
Idade (anos) ^(A)	50 ± 1,6
Sexo (F:M)	1,8 : 1
Seguimento (meses) ^(A)	49 ± 5
Síndrome clínica <i>n</i>	
<u>Secreção de cortisol</u>	
Presente	41
Ausente	22
Não disponível	47

(A) Média ± EP.

3.3 Métodos

3.3.1 Imunohistoquímica e Micromatriz Tecidual (TMA)

Na coorte brasileira, cortes histológicos representativos dos casos, corados pela Hematoxilina e Eosina foram revisados e as áreas de interesse foram selecionadas nas lâminas. As mesmas áreas foram marcadas nos respectivos blocos de parafina doadores dos tecidos. Cilindros de 1,0 mm de diâmetro das áreas marcadas nos blocos de parafina doadores foram transportados para um bloco de parafina receptor por meio de um sistema mecanizado de precisão (*Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA*), com um intervalo de 0,3 mm entre os cilindros. Cada cilindro foi alocado numa posição do bloco receptor definida em um sistema cartesiano de coordenadas, com o conjunto das amostras constituindo uma micromatriz tecidual com 13 linhas e 16 colunas. No total, o TMA construído contém 208 posições (205 amostras de 200 casos, com uma amostra por caso, tendo três pacientes amostras em duplicata, um paciente com perda de representatividade por tratar-se de tecido hepático e outra paciente excluída da análise por insuficiência de dados clínicos). Duas amostras de tecido renal normal foram usadas para determinar o posicionamento do TMA. O bloco de TMA foi então cortado em secções histológicas numeradas e consecutivas de 3 μ m (*Leica Instruments, Singapore*). Outros dois blocos de TMA semelhantes foram feitos para obter-se uma triplicata.

Para a imunohistoquímica, um conjunto de três lâminas (uma lâmina de cada bloco de TMA da triplicata) para cada um dos marcadores examinados foi escolhido. O método imunohistoquímico realizado foi de imunoperoxidase com recuperação antigênica pelo calor úmido ou digestão enzimática modificada¹²¹. A técnica consiste em desparafinização e hidratação das lâminas contendo os cortes histológicos dos

blocos de TMA. Foi então realizada recuperação antigênica com tampão citrato 10 mM pH 6,0 para o anticorpo anti-LIN28 (título 1:100; 11724-1-AP, *ProteinTech Group Inc, Chicago, IL, USA*) em panela a vapor por 40 minutos a cerca de 95 °C. Após lavagens em PBS pH 7,4, seguiu-se etapa de bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 20V, 1:1 em solução de metanol, repetida três vezes por 10 minutos em temperatura ambiente (esta etapa foi realizada antes da recuperação antigênica para as lâminas tripsinizadas). Após lavagens em PBS pH 7,4, foi realizado bloqueio inespecífico de carga com CASBlock™ (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) por 10 minutos a 37 °C. Após a retirada do excesso, cada conjunto de três lâminas foi incubado por 30 minutos a 37 °C, seguida por incubação *overnight* a 4 °C, com um dos anticorpos primários, em título definido previamente no laboratório com controles positivos. Em um conjunto extra de três lâminas foram omitidos os anticorpos primários, permanecendo as lâminas em incubação com PBS pH 7,4 com soroalbumina bovina 1% e Na₃N 0,1%, servindo como controles negativos. Após lavagens em PBS pH 7,4, foi realizada incubação com o sistema secundário Novolink (*Vision Biosystems™, Newcastle, GRB*) de tipo polímero curto acoplado a peroxidase por 30 minutos a 37 °C. Após novas lavagens em PBS pH 7,4, seguiu-se revelação com o substrato enzimático 3,3'-diaminobenzidina (0,6 mg/mL) em PBS pH 7,4 por cinco minutos a 37 °C, com posterior lavagens em PBS pH 7,4, água corrente e água destilada. Posteriormente, foi realizada contra-coloração com hematoxilina de Harris por 1 min em temperatura ambiente, desidratação e montagem das lâminas com resina sintética Entellan (*Merck, Darmstadt, Germany*). Os procedimentos acima descritos foram realizados no LIM14 (Laboratório de Investigação em Patologia Hepática) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Em cada cilindro de amostras tumorais, foi avaliado o compartimento citoplasmático para o anticorpo anti-LIN28. A intensidade da imunorreatividade foi avaliada em uma escala de zero a três. O percentual de células tumorais positivas foi calculado para cada amostra tumoral e deste percentual estabeleceu-se o seguinte escore: 0%, escore 0; 1 a 9%, escore 0,1; 10 a 49%, escore 0,5; $\geq 50\%$, escore 1,0. Este escore, que representa o percentual de positividade, foi multiplicado pela intensidade de imunorreatividade (zero a três) a fim de se obter um escore final semiquantitativo (escore H, variando de zero a três)¹²². Como cada reação foi analisada em triplicata, a média dos três valores obtidos representou o escore H de imunorreatividade de cada amostra de TAC analisado.

Os mesmos procedimentos técnicos de reação de imunohistoquímica para coloração do LIN28 acima descritos foram realizados em três lâminas de TMA com amostras tumorais em quintuplicata de 110 carcinomas adrenocorticais da coorte alemã da Universidade de Wuerzburg, tendo sido calculada a média do escore H de cada caso. As lâminas foram enviadas pelos colaboradores internacionais via serviço expresso de remessas rápidas internacionais e processadas no LIM14 pela mesma técnica de laboratório que realizou o procedimento no TMA da coorte brasileira. Tanto a coorte brasileira como a alemã foram analisadas de forma cega por dois observadores independentes (Dr. Iberê Cauduro Soares, USP; Dr. Silviu Sbiera, Universidade de Wuerzburg), tendo sido realizada a média das duas avaliações para fins de análise estatística. A mediana do escore H de cada coorte foi escolhida como ponto de corte para separação de tumores com imunorreatividade fraca ou forte para LIN28. O coeficiente de concordância interobservador para análise do LIN28 foi de 0,71.

Além disso, mais uma triplicata de lâminas foi corada com anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano contra o antígeno Ki67 (título 1:40, clone MIB-1, código M7240, *Dako, Denmark*). A imunorreatividade nuclear para o Ki67 na coorte brasileira foi determinada de forma cega por dois observadores independentes (Dr. Iberê Cauduro Soares e Dr^a. Maria Cláudia Nogueira Zerbini), tendo sido realizada a média das duas avaliações da triplicata de lâminas para fins de análise estatística. O coeficiente de concordância interobservador para análise do Ki67 foi de 0,9. Cada amostra tumoral foi categorizada por avaliação subjetiva baseada em estimativa visual do percentual de núcleos positivos, do seguinte modo: 0% - 9%; 10% - 19%; 20% - 29%; 30% - 39%; 40% - 49%; 50% - 59%; 60% - 69%; 70% - 79%; 80% - 89%, e $\geq 90\%$. Na coorte alemã, a análise do Ki67 de 80 pacientes foi realizada em lâminas inteiras coradas com anticorpo monoclonal anti-humano contra o Ki67 (título 1:100, clone MIB-1, *Dosseheim, DE*). A leitura da imunorreatividade nuclear foi realizada pelo patologista chefe do Registro Alemão de Carcinoma Adrenocortical (Dr. Wolfgang Saeger), com avaliação subjetiva de contagem de núcleos positivos e reportados em relação ao número de campos de grande aumento.

3.3.2 Estudos moleculares

3.3.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Os tecidos tumorais foram obtidos durante procedimento cirúrgico habitual e armazenados em nitrogênio líquido até a realização da extração de RNA. O RNA total das amostras foi extraído a partir dos tecidos congelados em nitrogênio líquido utilizando-se o método do Trizol Reagente (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). A qualidade do RNA extraído foi avaliada a partir da relação de absorbância $A_{260/280}$ e da

integridade das bandas de RNA ribossômico em gel de agarose 1% após eletroforese. A relação de absorbância $A_{260/280}$ foi maior que 1,8 em todas as amostras. As concentrações das amostras de RNA total foram determinadas em espectrofotômetro. As amostras de RNA foram tratadas com DNase utilizando procedimento padrão. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por Transcrição Reversa (RT) utilizando-se o produto comercial *Superscript III First Strand S (Invitrogen)*.

3.3.2.2 RT-PCR quantitativa em tempo real

Oitenta e seis pacientes não relacionados, 61 adultos e 25 crianças de ambos os sexos, com TAC foram estudados quanto à expressão dos genes *LIN28A* e *LIN28B*. A quantificação do cDNA foi realizada no aparelho ABI Prism 7000 (*Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA*) utilizando-se ensaios 5' nuclease do sistema *Taqman (Applied Biosystems)*. Foram utilizados os seguintes ensaios *Taqman*: genes alvos (*LIN28A*, Hs04189307_g1; *LIN28B*, Hs01013729_m1) e endógenos (*ACTB*, β -actina, 4310881E e *GUSB*, β -glicuronidase, 4310888E). As sondas dos genes alvos são marcadas com a fluorescência FAM, enquanto a sonda da β -actina e β -glicuronidase é marcada com VIC. Estas sondas emitem comprimentos de ondas distintos, que emitem sinais captados pelo aparelho. A escolha dos genes endógenos β -actina e β -glicuronidase foi baseada na variabilidade de diversos genes endógenos dentre os TACs da nossa casuística. A seleção dos genes endógenos ideais foi feita utilizando o programa *GeNorm*.

Durante a reação de PCR, o ciclo em que cada curva de amplificação ultrapassou o limiar de detecção da fluorescência (C_T) foi determinado e utilizado para quantificação da expressão gênica. As reações de amplificação foram realizadas em

uma etapa inicial de 95° C por 10 minutos, seguida de 50 ciclos de 95° C por 15 s e 60° C por 10 minutos. A amplificação dos genes alvos foi normalizada pelas condições de amplificação da β -actina e β -glicuronidase (controles endógenos) em cada amostra tumoral. Um grupo comercial de 14 tecidos adrenocorticais normais (*Human Adrenal Cortex Poly A⁺ RNA, Clontech, Mountain View, CA, USA*) foi utilizado como amostra de referência na análise da quantificação relativa. A quantificação relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ¹²³, onde o ΔC_T representa a diferença de expressão entre o gene alvo e o endógeno (média dos dois genes usados) de uma determinada amostra (tumor ou calibrador) e o $\Delta\Delta C_T$ corresponde à diferença entre o ΔC_T de uma amostra tumoral e o ΔC_T do calibrador. Os valores da expressão gênica representam o número de vezes em que o gene alvo está expresso no tecido tumoral em relação ao grupo de tecidos adrenocorticais normais. O aumento ou redução da expressão gênica em relação à mediana de expressão dos 86 tumores adrenocorticais foi utilizado como ponto de corte para definir hiper ou hipoexpressão gênica.

A validação do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ foi realizada pela construção de curvas de amplificação com concentrações progressivamente maiores de cDNA, a fim de avaliar se as eficiências de amplificação dos genes alvos e endógeno eram comparáveis (inclinação da reta do $\Delta C_T < 0,1$). A eficiência de amplificação dos genes *LIN28A* (Gráfico 1) e *LIN28B* (Gráfico 2) foram comparáveis à da β -actina e β -glicuronidase nas reações em *singleplex* (oligonucleotídeos e sondas do gene alvo e endógeno em poços distintos).

Gráfico 1 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *LIN28A* em relação aos genes endógenos (A, β -actina; B, β -glicuronidase)

Gráfico 2 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *LIN28B* em relação aos genes endógenos (A, β -actina; B, β -glicuronidase)

3.3.2.3 Expressão de miRNAs por RT-PCR em tempo real

A expressão de 14 miRNAs reguladores pós-transcricionais do LIN28 (*let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, *mir-98*, *mir-9*, *mir-30b*, *mir-30c*, *mir-125b*, *mir-125a-3p* e *mir-125a-5p*) foi avaliada em um subgrupo de 28 carcinomas adrenocorticais em adultos. Posteriormente, procedeu-se ainda com a determinação da expressão do *mir-9* em 13 adenomas de adultos e em 24 TACs pediátricos.

O cDNA de cada amostra tumoral foi sintetizado a partir de 1 mcg de RNA total por meio do ensaio *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription* (PN 4366596, *Applied Biosystems*) e dos primers *Megaplex RT, Human Pool A v2.1* (PN 4399966, *Applied Biosystems*). Os produtos da PCR foram amplificados utilizando o *Taqman Universal Master Mix II, no UNG* (PN 4440040, *Applied Biosystems*). Cada oligonucleotídeo iniciador presente neste ensaio é complementar a um único miRNA maduro. Durante a reação, os oligonucleotídeos específicos assumem uma configuração em grampo (“*stem-loop*”) ao hibridizarem no miRNA-alvo e promovem um alongamento das moléculas que serão sintetizadas. As moléculas de cDNA resultantes da reação de transcrição reversa são mais longas que os miRNAs e podem então ser utilizadas como moldes para o ensaio *TaqMan*. O cDNA sintetizado para cada amostra tumoral foi então utilizado para determinar a expressão dos seguintes miRNAs: *let-7a* (000377), *let-7b* (002619), *let-7c* (000379), *let-7d* (002283), *let-7e* (002406), *let-7f* (000382), *let-7g* (002282), *mir-98* (000577), *mir-9* (000583), *mir-30b* (000602), *mir-30c* (000419), *mir-125a-3p* (002199), *mir-125a-5p* (002198) e *mir-125b* (000449). Os pequenos RNAs nucleolares, RNU44 (001094) e RNU48 (001006), foram utilizados como controles endógenos para a normalização. A partir desta etapa, a metodologia seguiu o que foi descrito anteriormente na seção sobre RT-PCR quantitativo em tempo real.

A validação do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ foi realizada pela construção de curvas de amplificação com concentrações progressivamente maiores de cDNA a fim de avaliar se as eficiências de amplificação dos microRNAs alvos e endógeno eram comparáveis (inclinação da reta do $\Delta C_T < 0,1$). A eficiência de amplificação dos microRNAs *let-7a* (Gráfico 3), *let-7b* (Gráfico 4), *let-7c* (Gráfico 5), *let-7d* (Gráfico 6), *let-7e* (Gráfico 7), *let-7f* (Gráfico 8), *let-7g* (Gráfico 9), *mir-98* (Gráfico 10), *mir-9* (Gráfico 11), *mir-30b* (Gráfico 12), *mir-30c* (Gráfico 13), *mir-125a-3p* (Gráfico 14), *mir-125a-5p* (Gráfico 15) e *mir-125b* (Gráfico 16) foram comparáveis ao do RNU44 e RNU48 nas reações em *singleplex* (oligonucleotídeos e sondas do microRNA alvo e endógeno em poços distintos).

Gráfico 3 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *let-7a* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 4 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *let-7b* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 5 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *let-7c* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 6 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *let-7d* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 7- Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *let-7e* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 8 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *let-7f* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 9 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *let-7g* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 10 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *mir-98* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 11 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *mir-9* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 12 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *mir-30b* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 13 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *mir-30c* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 14 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *mir-125a-3p* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 15 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *mir-125a-5p* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

Gráfico 16 - Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* do *mir-125b* em relação aos controles endógenos (A, RNU44; B, RNU48)

3.3.2.4 *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

A determinação do número de cópias dos genes *LIN28A* e *LIN28B* foi estudada em um subgrupo de 58 TACs (39 adultos e 19 crianças). Aproximadamente 200 ng de DNA genômico das amostras tumorais foram diluídos em água ultrapura em um volume final de 5 µL. Em termociclador modelo 9700 (*Applied Biosystem, Foster City, CA, USA*) os tubos com 5 µL de DNA diluído foram incubados por cinco minutos a 98 °C, a fim de ocorrer a desnaturação. A temperatura foi diminuída para 25 °C e foram acrescentados 3 µL do mix de sondas, preparado a partir de 1,5 µL do SALSA probe mix e 1,5 µL 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 hibridizassem aos seus respectivos alvos.

Após a hibridação das sondas, a temperatura foi reduzida para 54 °C e então adicionados 32 µL da mistura de Ligase-65 (3 µL do tampão ligase-65 A, 3 µL do tampão ligase-65 B, 1 µL Ligase-65 e 25 µL 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).

Dez µL do produto de ligação foram transferidos para um novo tubo contendo 30 µL do mix PCR, preparado a partir de 4 µL do tampão SALSA PCR e 26 µL 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, deu-se 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 (um minuto), e um ciclo final de extensão a 72 °C por 20 minutos.

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.

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) corresponde ao número de cópias estimado de cada sonda. Uma determinada região analisada foi considerada normal quando a média das proporções estivesse entre 0,7 e 1,3; com diminuição no número de cópias quando era inferior a 0,7, e com aumento no número de cópias quando era superior a 1,3. Um ensaio foi considerado válido somente quando os controles eram diploides para as sondas analisadas e quando as amostras tumorais também apresentavam duas cópias na maioria das sondas controles.

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando os programas SPSS (*PASW version 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL*) e GraphPad Prism (*GraphPad Software, Inc., version 6, La Jolla, CA*). Dados contínuos foram expressos por valores de mediana (do mínimo ao máximo). Diferenças nos níveis de expressão entre dois grupos foram analisadas por meio do teste Mann-Whitney *U* de cauda dupla ou pelo teste de Kruskal Wallis (para análise incluindo mais de dois grupos). Para comparação entre três grupos, empregou-se o modelo de ANOVA *one-way* seguido pelo teste de Bonferroni *post-hoc*. O teste exato de Fisher ou o teste do χ^2 foi utilizado para investigação de variáveis dicotômicas. Na população adulta, pacientes com carcinomas que não apresentaram metástases e tinham menos de 12 meses de seguimento foram excluídos das análises comparativas entre carcinomas agressivos e não agressivos. A sobrevida global foi definida como o tempo entre a data do diagnóstico primário e a data do óbito relacionado ao carcinoma adrenocortical ou última visita de seguimento. A sobrevida livre de doença foi definida como o tempo entre a data da ressecção tumoral completa e a data da primeira evidência radiológica de recorrência local ou à distância. Na população pediátrica, análises comparativas entre TACs clinicamente benignos e clinicamente malignos foram feitas utilizando toda a casuística disponível dessa faixa etária, independente do escore de Weiss. Entretanto, nas análises de sobrevida global e livre de doença, apenas TACs pediátricos com Weiss ≥ 3 foram incluídos. Todas as curvas de sobrevida foram obtidas por estimativas de Kaplan-Meier e as diferenças entre curvas de sobrevida foram avaliadas pelo teste de *log-rank* Mantel-Cox. Nesse contexto, a expressão proteica (escore H), do RNAm e do miRNA foram consideradas como variáveis

categóricas, sendo escolhido o valor da mediana de todas as amostras da avaliação imunohistoquímica e de cada RNAm e miRNA como o ponto de corte para definição de hiper ou hipoexpressão. Fatores preditores de prognóstico foram identificados por meio dos modelos de regressão de riscos proporcionais de Cox, que foi utilizado para estimativa do risco relativo (RR) e seus intervalos de confiança 95% (IC 95%) em análises univariadas e multivariadas. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 TACs Pediátricos

4.1.1 Expressão gênica *LIN28A* e *LIN28B*

Tanto os níveis de *LIN28A* [mediana 6,6 (0 a 19,8) vs. 2,97 (0 a 174,3); $p = 0,003$] como de *LIN28B* [292,5 (0 a 4988) vs. 0 (0 a 250); $p = 0,0001$] foram significativamente maiores em crianças quando comparados aos adultos. O gene *LIN28B* foi quase exclusivamente expresso na população pediátrica: a frequência de expressão positiva foi de 68% (17/25) em crianças contra apenas 8% (5/61) dos adultos ($X^2 = 31,6$; $p = 0,0001$). Não se observou diferença nos níveis de *LIN28A* entre tumores clinicamente benignos e clinicamente malignos [6,6 (3,3 a 19,8) vs. 7,9 (0 a 19,8); $p = 0,89$]. Um achado de muita relevância foi que a hiperexpressão do *LIN28B* foi detectada em 83% (5/6) dos tumores clinicamente malignos e em apenas 39% (7/18) dos tumores clinicamente benignos ($X^2 = 3,6$; $p = 0,059$). De fato, a hiperexpressão do *LIN28B* em crianças foi associada com redução da sobrevida livre de doença ($p = 0,026$; Gráfico 17), mas não da sobrevida global ($p = 0,406$; Gráfico 18).

Gráfico 17 - Expressão do gene *LIN28B* e sobrevida livre de doença em TACs pediátricos com Weiss ≥ 3 ; $n = 16$ amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos, somente pacientes com ressecção completa

Gráfico 18 - Expressão do gene *LIN28B* e sobrevida global em TACs pediátricos com Weiss ≥ 3 ; $n = 17$ amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos

Como já foi demonstrado que o LIN28/LIN28B tem um importante papel na regulação da via IGF tanto ao promover diretamente maior eficiência de tradução do RNAm do *IGF-2*^{105,115} e também indiretamente ao desreprimir o IGF-1R^{116,117}, avaliou-se a associação da expressão do *LIN28A* e *LIN28B* com a expressão do *IGF2* e *IGF1R* em dados previamente publicados pelo nosso grupo³⁹. Dentre todos os TACs estudados, considerando adultos e crianças, observou-se uma forte correlação com IGF-1R ($r = 0,573$ $p = 0,0001$) e uma tendência a correlação com o RNAm do *IGF-2* ($r = 0,257$ $p = 0,069$). Não se observou associação entre a expressão de *LIN28B* e imunorreatividade para o IGF-2 ($p = 0,822$). Adicionalmente, crianças com hiperexpressão do *LIN28B* tenderam a apresentar níveis mais elevados de *IGF-1R* [4,0 (1,2 a 10,6) vs. 1,9 (1,5 a 21,3); $p = 0,083$]. Como já foi demonstrado previamente que a via da Wnt/ β -catenina pode regular positivamente a expressão do LIN28, pesquisou-se também a associação entre os níveis de *LIN28A/LIN28B* e mutações do gene *CTNNB1* ou acúmulo anormal de β -catenina dos nossos dados prévios⁴⁸, mas não foi encontrada correlação significativa.

4.1.2 Expressão proteica do LIN28

À semelhança do que foi observado ao nível de RNAm, observou-se uma maior frequência de imunorreatividade forte para o LIN28 em TACs pediátricos (30/46, 65%) quando comparados aos adultos (94/266, 35%; $X^2 = 14,6$; $p = 0,0001$) (Figura 5). Englobando a casuística completa de crianças e adultos, uma correlação significativa foi observada entre expressão proteica do LIN28 e expressão gênica do *LIN28A* ($r = 0,304$ $p = 0,007$) e *LIN28B* ($r = 0,306$ $p = 0,006$). Na população pediátrica, não se observou diferença significativa na imunorreatividade para o LIN28

entre tumores clinicamente benignos e clinicamente malignos (1,0 vs. 0,62, respectivamente; $p = 0,139$). Nessa faixa etária, portanto, não foi observada associação entre expressão proteica do LIN28 e diminuição de sobrevida global e livre de doença.

Figura 5 - (A) Tumor virilizante adrenocortical de uma criança de 2,1 anos (Anexo D, caso nº 4) com evolução benigna mostrando forte imunorreatividade para o LIN28 (280x). (B) Tumor adrenocortical misto com imunorreatividade negativa para o LIN28 (280x) de uma paciente de 35 anos que desenvolveu metástase após 21 meses de seguimento (Anexo F, caso nº 85)

Considerando todas as faixas etárias, houve também uma correlação positiva entre expressão proteica do LIN28 e níveis de *IGF-1R* ($r = 0,237$ $p = 0,013$), mas não com imunorreatividade para o IGF-2 e expressão gênica do *IGF-2* ($p = 0,269$ e $p = 0,108$, respectivamente). Ademais, não foi observada associação significativa entre expressão proteica do LIN28 e presença de mutação do *CTNNB1* ou imunorreatividade anormal da β -catenina ($p = 0,342$ e $p = 0,659$, respectivamente).

4.1.3 Expressão proteica do Ki67

Um índice de Ki67 $\geq 20\%$ nas crianças foi capaz de discriminar pacientes com pior prognóstico: houve uma associação significativa tanto com diminuição da sobrevida global ($p = 0,015$; Gráfico 19) como da sobrevida livre de doença ($p = 0,001$; Gráfico 20) em 36 TACs com Weiss ≥ 3 . Utilizando um ponto de corte $\geq 10\%$, embora menos significativo, também se observou diminuição da sobrevida global ($p = 0,048$), mas não da sobrevida livre de doença ($p = 0,129$). Curiosamente, entre os TACs pediátricos com escore de Weiss < 3 ($n = 8$), um paciente apresentou índice de Ki67 entre 10-19% e outro apresentou um índice de Ki67 entre 20-29%. Apesar do índice de Ki67 elevado, ambos apresentaram evolução benigna durante o seguimento a longo prazo.

Gráfico 19 - Expressão proteica do Ki67 e sobrevida global em TACs pediátricos com Weiss ≥ 3 ; $n = 36$ amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos

Gráfico 20 - Expressão proteica do Ki67 e sobrevida livre de doença em TACs pediátricos com Weiss ≥ 3 ; n = 34 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos, somente pacientes com ressecção completa

4.2 TACs de Adultos

4.2.1 Expressão gênica do *LIN28A* e *LIN28B*

O gene *LIN28A* mostrou-se hiperexpresso em carcinomas agressivos quando comparado aos adenomas [7,0 (0 a 174,3) vs. 3,6 (0 a 18,3); $p = 0,006$, respectivamente] e observou-se uma tendência a maior expressão quando comparados aos carcinomas não agressivos [7,0 (0 a 174,3) vs. 7,1 (0 a 17,1); $p = 0,092$; Gráfico 21]. A maioria dos adenomas (54%, 17/31) teve expressão nula do *LIN28A*. Entretanto, a expressão do *LIN28A* não foi associada com diminuição de sobrevida global e livre de doença. A expressão do *LIN28B* foi negativa na grande maioria (56/61, 92%) dos TACs de adultos. Deste modo, embora o anticorpo empregado na análise imunohistoquímica seja capaz de reconhecer tanto o *LIN28A*

como o LIN28B, pode-se assumir que a expressão proteica do LIN28 em TACs de adultos representa principalmente o produto do gene *LIN28A*. Também não se observou associação entre o *LIN28A* e expressão gênica e proteica do IGF-2, assim como do *IGF-1R*, mutações do *CTNNB1* ou acúmulo anormal de β -catenina.

Gráfico 21 - Expressão relativa do gene *LIN28A* em adenomas (n = 31), carcinomas não agressivos (n = 15) e carcinomas agressivos (n = 15) de pacientes adultos. Os valores de mediana são representados pelas linhas pretas. Valores nulos não são representados em uma escala logarítmica

4.2.2 Expressão proteica do LIN28

Uma maior frequência de expressão forte do LIN28 foi observada nos carcinomas não agressivos (37/77, 48,1%) em comparação aos adenomas (26/78, 33,3%), mas, de forma inesperada, também em comparação aos carcinomas agressivos (30/105, 29,1%; $X^2 = 7,6$; $p = 0,022$). A expressão fraca do LIN28 foi significativamente associada com redução da sobrevida livre de doença ($p = 0,01$), mas para sobrevida global apenas uma tendência foi observada ($p = 0,117$; Gráficos 22 e 23). Tamanho tumoral e recorrência foram significativamente associados com expressão fraca para o LIN28 ($p = 0,05$ e $p = 0,02$, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4 - Relação entre expressão proteica do LIN28 e características clínicas e patológicas basais dos pacientes adultos com carcinoma adrenocortical (somente amostras de tumor derivadas de cirurgia primária) (n = 188)

	Baixa expressão LIN28	Alta expressão LIN28	p
n (%)	120 (64%)	68 (36%)	
H-escore, mediana	0,83	1,73	
Idade, mediana (anos)	45,8	41,5	0,13
Sexo [masculino, n (%)]	37 (31)	19 (28)	0,68
Tamanho tumoral, mediana (cm)	12,0	10,2	0,05
Estadiamento (ENSAT) [n (%)]			
Disponíveis	117	67	
1-2	52 (59)	36 (41)	0,23
3-4	65 (68)	31 (32)	
Status hormonal [n (%)]			
Disponíveis	83	53	
Cushing	37 (67)	18 (33)	0,22
Não Cushing	46 (57)	35 (43)	
Escore Weiss, mediana	5	5	0,22
Índice Ki67 (%)			
Disponíveis	87	56	
< 10	52 (67)	26 (33)	0,12
≥ 10	35 (54)	30 (46)	
Metástase à distância ou recorrência local [n (%)]*			
Pacientes afetados	48 (68)	22 (32)	
Pacientes não afetados	26 (48)	28 (52)	0,02

* Desenvolvimento de metástases à distância ou recorrência local durante o seguimento. Pacientes com metástase ao diagnóstico foram excluídos dessa análise, pois eles já são representados como estadiamento ENSAT 4.

Gráfico 22 - Impacto da expressão proteica do LIN28 na sobrevida livre de doença em pacientes adultos com carcinoma adrenocortical; n = 124 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos, somente pacientes com ressecção completa

Gráfico 23 - Impacto da expressão proteica do LIN28 na sobrevida global em pacientes adultos com carcinoma adrenocortical; n=188 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos

4.2.3 Expressão proteica do Ki67

A imunorreatividade nuclear para o Ki67 em adultos foi avaliada em 78 adenomas da coorte brasileira e em 158 carcinomas adrenocorticais (78 casos coorte brasileira, 80 casos coorte alemã) (Figura 6). Como esperado, todos os adenomas em adultos ($n = 78$) apresentaram $Ki67 < 10\%$. Os carcinomas adrenocorticais com índice de Ki67 entre 10-19% e $\geq 20\%$ tiveram diminuição da sobrevida global ($p = 0,000$; Gráfico 24) e um índice de $Ki67 \geq 10\%$ teve associação significativa com diminuição da sobrevida livre de doença ($p = 0,000$; Gráfico 25).

Figura 6 - A: Carcinoma adrenocortical produtor de cortisol de um homem de 53 anos (Anexo F, caso nº 79) que veio a óbito após 10 meses de seguimento, mostrando forte imunorreatividade para o marcador de proliferação nuclear Ki67 (280x). **B:** Adenoma adrenocortical produtor de cortisol de uma mulher de 33 anos com imunorreatividade negativa para o Ki67 (280x)

Gráfico 24 - Impacto da expressão proteica do Ki67 na sobrevida global em pacientes adultos com carcinoma adrenocortical; n = 158 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos

Gráfico 25 - Impacto da expressão proteica do Ki67 na sobrevida livre de doença em pacientes adultos com carcinoma adrenocortical; n = 107 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos, somente pacientes com ressecção completa

4.2.4 Análise univariada e multivariada de sobrevida

Na análise univariada, tamanho tumoral ≥ 8 cm ($p = 0,009$), estadiamento ENSAT 4 ($p = 0,0001$), escore de Weiss ≥ 6 ($p = 0,001$) e índice de Ki67 $\geq 10\%$ ($p = 0,0001$) tiveram associação com diminuição da sobrevida global de doença (Tabela 5). Na análise multivariada, somente estadiamento ENSAT 4 (RR 3,3, 95% IC 1,9-5,7; $p = 0,0001$) e índice de Ki67 $\geq 10\%$ (RR 3,0, 95% IC 1,8-5,0; $p = 0,0001$) permaneceram como preditores independentes de redução de sobrevida global.

Em relação à sobrevida livre de doença, sexo masculino ($p = 0,01$), tamanho tumoral ≥ 8 cm ($p = 0,001$), escore de Weiss ≥ 6 ($p = 0,003$), índice de Ki67 $\geq 10\%$ ($p = 0,0001$) e imunorreatividade fraca para o LIN28 ($p = 0,01$) foram significativamente associados com recorrência (local ou metástase) na análise univariada (Tabela 5). Na análise multivariada, somente índice de Ki67 $\geq 10\%$ (RR 5,7, 95% IC 3,0-10,8; $p = 0,0001$) e imunorreatividade fraca para o LIN28 (RR 2,3, 95% IC 1,2-4,4; $p = 0,008$) foram preditores independentes de recorrência em adultos com carcinoma adrenocortical.

Tabela 5 - Fatores prognósticos de sobrevida global e livre de doença em adultos com carcinoma adrenocortical (somente amostras de tumor derivadas de cirurgia primária)

	<i>Análise univariada</i>			<i>Análise multivariada</i>		
	Sobrevida global					
	RR	95% IC	<i>p</i>	RR	95% IC	<i>p</i>
Sexo masculino	1,2	0,8-1,8	0,35			
Tamanho tumoral ≥ 8 cm	6,5	1,6-26,4	0,009	5,5	0,7-40	0,09
Estadiamento (ENSAT 4)	3,4	2,4-5,0	0,0001	3,3	1,9-5,7	0,0001
Síndrome de Cushing	1,5	0,9-2,2	0,09			
Escore Weiss ≥ 6	1,9	1,3-2,7	0,001	1,3	0,8-2,0	0,21
Índice Ki67 ≥ 10 %	4,1	2,5-6,6	0,0001	3,0	1,8-5,0	0,0001
Baixa expressão proteica LIN28	1,4	0,9-2,1	0,12			
	Sobrevida livre de doença					
	RR	95% IC	<i>p</i>	RR	95% IC	<i>p</i>
Sexo masculino	1,7	1,1-2,7	0,016	1,0	0,6-1,9	0,91
Tamanho tumoral ≥ 8 cm	2,7	1,5-5,0	0,001	1,7	0,7-4,2	0,26
Síndrome de Cushing	1,3	0,8-2,2	0,32			
Escore Weiss ≥ 6	1,9	1,2-3,0	0,003	1,2	0,6-2,1	0,63
Índice Ki67 ≥ 10 %	5,1	2,9-9,0	0,0001	5,7	3,0-10,8	0,0001
Baixa expressão proteica LIN28	1,8	1,1-3,1	0,017	2,3	1,2-4,4	0,008

4.3 Análise da variação do número de cópias do *LIN28A* e *LIN28B*

Dentre 58 pacientes estudados pela técnica de MLPA, somente uma criança de 2,1 anos com um TAC virilizante benigno (Weiss 1) apresentou amplificação do *LIN28B* (expressão *LIN28B* = 3637 e imunorreatividade forte, escore H = 3,0; Gráfico 26) e uma mulher de 44 anos com carcinoma adrenocortical metastático apresentou deleção do *LIN28B* (expressão gênica e imunorreatividade negativas; Gráfico 27). Não houve casos de deleção ou amplificação do gene *LIN28A*.

Gráfico 26 - Representação dos resultados de MLPA obtidos a partir de DNA de tecido de córtex adrenal normal (painel A) e de um TAC pediátrico com amplificação do gene *LIN28B* (Anexo D, caso nº 4) (painel B). As setas vermelhas demonstram alguns exemplos de sondas amplificadas

Gráfico 27 - Representação dos resultados de MLPA obtidos a partir de DNA de tecido de córtex adrenal normal (painel A) e de um carcinoma adrenocortical de paciente adulto com amplificação do gene *LIN28B* (Anexo F, Caso nº 88) (painel B). As setas vermelhas demonstram alguns exemplos de sondas deletadas

4.4 Expressão dos miRNAs reguladores do LIN28

Dos 14 miRNAs estudados em um subgrupo de 28 carcinomas adrenocorticais em adultos, somente o *mir-9* apresentou expressão diferencialmente significativa entre carcinomas agressivos e não agressivos [quantificação relativa, mediana (variação): 2076 (36 a 9307) vs. 133,4 (2,4 a 5193); $p = 0,024$]. Os níveis de expressão dos miRNAs *let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, *mir-98*, *mir-30b*, *mir-30c*, *mir-125a-3p*, *mir-125a-5p* e *mir-125b* não foram significativamente diferentes entre carcinomas agressivos e não agressivos. Não foi observada correlação entre a imunorreatividade para o LIN28 e a expressão do *mir-9* ($r = -0,046$ $p = 0,833$), possivelmente devido ao tamanho pequeno da amostra.

Pacientes com carcinomas agressivos tiveram níveis de *mir-9* significativamente maiores quando comparados tanto a carcinomas não agressivos como a adenomas [2076 (36 a 9307) vs. 133,4 (2,4 a 5193) vs. 313 (2,8 a 2129); $p = 0,024$ e $p = 0,01$, respectivamente) (Gráfico 28).

Gráfico 28 - Expressão relativa do *mir-9* em adenomas (n = 13), carcinomas não agressivos (n = 13) e carcinomas agressivos (n = 15) de pacientes adultos. Os valores de mediana são representados pelas linhas pretas. A mediana de todas as amostras é representada pela linha tracejada

Além disso, carcinomas com hiperexpressão do *mir-9* tiveram uma tendência em apresentar escore de Weiss mais elevado ($p = 0,07$) e índice de Ki67 $\geq 10\%$ ($p = 0,11$) (Tabela 6). A hiperexpressão do *mir-9* também foi significativamente associada com diminuição de sobrevida global e livre de doença ($p = 0,012$ e $p = 0,010$, respectivamente; Gráficos 29 e 30). A ocorrência de metástase a distância ou recorrência local foi identificada em 6 de 9 (75%) pacientes com hiperexpressão do *mir-9*, contra apenas dois de 11 (18%, $X^2 = 4,8$; $p = 0,028$; Tabela 6) pacientes com níveis diminuídos do *mir-9*.

Tabela 6 - Relação entre expressão do *mir-9* e características clínicas e patológicas basais dos pacientes adultos com carcinoma adrenocortical (somente amostras de tumor derivadas de cirurgia primária)(n = 28)

	<i>Hipoexpressão mir-9</i>	<i>Hiperexpressão mir-9</i>	<i>p</i>
n (%)	14 (50)	14 (50)	
Idade, mediana (anos)	38,7	26,5	0,13
Sexo [masculino, n (%)]	4 (28,6)	1 (7,1)	0,14
Tamanho tumoral, mediana (cm)	8,7	11,5	0,22
Estadiamento (ENSAT) [n (%)]			
Disponíveis	14	14	
1	3 (75)	1 (25)	
2	6 (67)	3 (33)	0,19
3	1 (17)	5 (83)	
4	4 (44)	5 (56)	
Status hormonal [n (%)]			
Disponíveis	14	13	
Cushing puro	4 (67)	2 (33)	
Virilizante puro	3 (100)	0 (0)	0,16
Síndrome mista	4 (31)	9 (69)	
Não-funcionante	2 (50)	2 (50)	
Secretor de estrógenos	1 (100)	0 (0)	
Escore Weiss, mediana	4	6,5	0,07
Índice Ki67 (%)			
Disponíveis	13	11	
< 10	10 (67)	5 (33)	0,11
≥ 10	3 (33)	6 (67)	
Imunorreatividade LIN28			
Disponíveis	13	11	
Expressão baixa	8 (57)	6 (43)	0,73
Expressão alta	5 (50)	5 (50)	
Metástase à distância ou recorrência local [n (%)]*			
Pacientes afetados	2 (25)	6 (75)	
Pacientes não afetados	9 (75)	3 (25)	0,028

* Desenvolvimento de metástases à distância ou recorrência local durante o seguimento. Pacientes com metástase ao diagnóstico foram excluídos dessa análise, pois eles já são representados como estadiamento ENSAT 4.

Gráfico 29 - Impacto da expressão do *mir-9* na sobrevida global em pacientes adultos com carcinoma adrenocortical; n = 28 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos

Gráfico 30 - Impacto da expressão do *mir-9* na sobrevida livre de doença em pacientes adultos com carcinoma adrenocortical; n = 18 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos, somente pacientes com ressecção completa

Na população pediátrica, não se observou diferença na expressão do *mir-9* entre tumores clinicamente benignos e clinicamente malignos [499 (1,1 a 2980) vs. 270 (134 a 10964); $p = 0,35$] (Gráfico 31). Portanto, o *mir-9* não foi associado com redução da sobrevida global e livre de doença nessa população ($p = 0,239$ e $p = 0,823$, respectivamente).

Gráfico 31 - Expressão relativa do *mir-9* em TACs pediátricos clinicamente benignos (n = 18) e TACs clinicamente malignos (n = 6). Os valores de mediana são representados pelas linhas pretas. A mediana de todas as amostras é representada pela linha tracejada

5 DISCUSSÃO

A hiperexpressão do LIN28A/LIN28B tem sido demonstrada em uma ampla variedade de diferentes neoplasias malignas humanas, notadamente em um subgrupo de tumores avançados e pouco diferenciados, que habitualmente apresentam um pior prognóstico^{108,124}. De fato, essa importante proteína reguladora tem mostrado desempenhar um papel-chave na progressão do câncer e metástase^{92,125}. No presente estudo, a hiperexpressão do *LIN28B* em TACs pediátricos foi significativamente associada a menor sobrevida livre de doença, mas não com sobrevida global, possivelmente devido ao pequeno número de crianças avaliadas quanto à expressão gênica. Adicionalmente, demonstrou-se que a expressão do gene *LIN28A* foi significativamente maior nos carcinomas de adultos quando comparados aos adenomas. Surpreendentemente, a maioria dos adultos com carcinomas agressivos exibiram imunorreatividade fraca para o LIN28. Por outro lado, também se demonstrou que o *mir-9*, um miRNA conhecido por regular negativamente o LIN28, foi altamente expresso no subgrupo de carcinomas agressivos de adultos quando comparados aos carcinomas não agressivos. A hiperexpressão do *mir-9* foi fortemente associada com diminuição tanto da sobrevida global como livre de doença em carcinomas de adultos.

Um interessante estudo demonstrou que, a despeito do alto grau de homologia, o LIN28A e LIN28B agem por meio de mecanismos distintos e que muitos tumores normalmente expressam um ou outro¹²⁶. O *LIN28B* não foi expresso na maioria dos

adenomas e carcinomas adrenocorticais de adultos, enquanto que o *LIN28A* foi hiperexpresso nos carcinomas. Entretanto, a maioria dos carcinomas agressivos de adultos exibiu uma expressão diminuída ou ausente do LIN28 ao nível proteico.

Embora significativo, nossos achados da expressão proteica do LIN28 em carcinomas de adultos são conflitantes com outros dados relatados em várias neoplasias humanas¹⁰⁸. Posto que o LIN28 age principalmente como um oncogene ao ativar várias vias tumorigênicas tanto por ações miRNA-dependentes (ex: ao reprimir *let-7* e ativar outros oncogenes, tais como *Myc*, *Ras* e *HMGA2*) e independentes (ao se ligar e aumentar eficiência de tradução de RNAm-alvos), este, de fato, foi um resultado surpreendente. Não obstante, a associação entre baixa expressão proteica do LIN28 com redução da sobrevida livre de doença em uma coorte significativa de carcinomas adrenocorticais de adultos de dois diferentes grupos étnicos, não exclui a relevância deste achado. Como não realizamos estudos funcionais para avaliar os efeitos *in vitro* da baixa expressão proteica do LIN28, não podemos concluir se a baixa expressão do LIN28 constitui somente um marcador de um processo mais importante para progressão tumoral (como, por exemplo, hiperexpressão do *mir-9*) ou se esta proteína tem um papel direto de supressor tumoral em linhagens de carcinoma adrenocortical.

Por outro lado, o achado de hiperexpressão do *LIN28B* em TACs pediátricos clinicamente malignos fortalece a observação de que crianças e adultos diferem em muitos aspectos, no que diz respeito tanto a evolução clínica como aos mecanismos patogênicos¹⁷. Um significado ainda maior para a hiperexpressão do *LIN28B* nessa subpopulação é dado pela correlação significativa encontrada com a expressão do *IGF-1R*. Já se demonstrou anteriormente que a hiperexpressão do *IGF-1R* é um importante

preditor do desenvolvimento de metástases na população pediátrica³⁹. Deste modo, a inibição do IGF-1R surgiu como uma potencial terapia-alvo promissora para o tratamento da doença avançada^{39,42,127}. Baseado nesses dados, mirar o *LIN28B* como alvo potencial pode se tornar uma estratégia adicional de bloqueio da via do IGF-1R nos TACs pediátricos. Ademais, também se demonstrou que a amplificação do gene *LIN28B* constitui um evento raro para explicar hiperexpressão do mesmo em TACs pediátricos. Outros mecanismos precisam ainda ser elucidados, sendo a ativação transcricional por fatores a montante, tais como c-Myc e NF-κB, um mecanismo já reconhecidamente identificado em múltiplos modelos de camundongos e humanos^{111,128}.

O Ki67 é uma proteína encontrada em células em proliferação. Está presente nos núcleos das células nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular. Os níveis da proteína Ki67 são baixos durante a fase G1 e fase S precoce, apresentando aumento gradual até atingir o nível máximo na fase de mitose. Assim, a expressão proteica do Ki67 constitui um importante marcador de proliferação celular¹²⁹. Sua expressão tem sido proposta como um importante marcador para predizer mau prognóstico em pacientes com TACs¹⁸. Um índice de Ki67 $\geq 10\%$ tem sido empregado para identificar adultos portadores de carcinoma adrenocortical de alto risco que se beneficiam de terapia adjuvante para evitar recorrência²³. Neste estudo, um índice de Ki67 $\geq 10\%$ em carcinomas adrenocorticais de adultos foi significativamente associado com redução da sobrevida global e livre de doença na análise multivariada. Deste modo, foi possível confirmar em uma análise baseada em TMA da coorte brasileira, em conjunto com dados obtidos de análise de lâminas inteiras de pacientes do Registro Alemão de Carcinoma Adrenocortical, o mesmo ponto de corte de Ki67 já previamente associado com pior prognóstico em adultos com carcinoma

adrenocortical¹⁸. Ademais, foi possível identificar também que adultos com Ki67 $\geq$ 20% tiveram pior evolução que os pacientes com índice $< 20\%$. Tal achado já havia sido observado por especialistas da área, inclusive com sugestão de abordagem terapêutica adjuvante mais agressiva de pacientes que apresentem valores acima desse ponto de corte¹⁸, porém, até o momento, não há ainda na literatura dados consistentes publicados.

De grande relevância, neste trabalho também se realizou a análise do Ki67 baseada em TMA em uma coorte significativa de TACs pediátricos. De forma clara, pôde-se observar que os TACs pediátricos, de um modo geral, possuem maior expressão desse marcador em relação aos adultos, inclusive com expressão aumentada do mesmo em dois pacientes com predição de evolução clínica sabidamente benigna baseada nos critérios histopatológicos (escore de Weiss ≤ 3). Nossos achados indicam, de forma pioneira, o estabelecimento de um ponto de corte de Ki67 nessa população: TACs pediátricos com Weiss ≥ 3 e com índice de proliferação $\geq 10\%$, mas notoriamente $\geq 20\%$, claramente tiveram pior prognóstico. Um importante estudo prévio já havia avaliado o índice de Ki67 em lâminas inteiras em uma grande coorte de 83 TACs pediátricos, mas não havia sido capaz de discriminar pacientes com tumores mais agressivos baseados nesse marcador¹⁵.

Vários estudos nos últimos anos foram realizados avaliando desregulação de miRNAs em TACs pediátricos e adultos. De forma consistente, o aumento da expressão do *mir-483-5p* e a diminuição da expressão do *mir-195* foram identificados por diferentes estudos como preditores de mau prognóstico em carcinomas adrenocorticais de adultos⁷³. Um trabalho recente avaliou a expressão de um conjunto de miRNAs tanto em amostras de tecido como de sangue obtidas de

controles saudáveis e pacientes com adenomas e carcinomas adrenocorticais de adultos⁸⁰. Digno de nota, o *mir-483-5p* sérico foi detectado apenas em pacientes com carcinomas agressivos, e altos níveis circulantes de *mir-483-5p* ou baixos níveis de *mir-195* foram associados tanto com diminuição de sobrevida global como com a sobrevida livre de doença. Este importante estudo, portanto, demonstrou que a dosagem de miRNAs séricos constituem biomarcadores não-invasivos promissores, com um valor prognóstico altamente específico para o desfecho clínico de pacientes portadores de carcinomas adrenocorticais. Etapas futuras de continuidade dessa linha de pesquisa compreenderão validar a hiperexpressão do *mir-9* em casuísticas externas, além de avaliar se existe correlação entre evolução desfavorável e a expressão desse miRNA no soro de pacientes com carcinoma adrenocortical.

Dados *online* publicamente disponíveis no *Gene Expression Atlas* reforçam a importância dos nossos achados. Dados de expressão do genoma de 317 linhagens celulares de diferentes cânceres revelam que a NCIH69 (câncer de pulmão de pequenas células), a SNB19 (glioblastoma) e a NCIH295R (carcinoma adrenocortical metastático) estão entre as linhagens de células tumorais que mais expressam o *mir-9* em ordem de frequência, respectivamente*¹³⁰. Além disso, dados de estudo de transcriptoma da coorte da Universidade de Michigan corroboram que o *mir-9* tem expressão aumentada em carcinomas quando comparados a adenomas adrenocorticais e tecido de córtex adrenal normal[†]⁶⁹.

Expressão aberrante do *mir-9* tem sido relatada em uma ampla gama de tumores sólidos e hematológicos. A expressão de miRNAs e seu papel nas neoplasias malignas reconhecidamente possuem ação tecido e tumor-específico¹³¹. Por exemplo,

* Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiment/E-MTAB-37/ENSG00000207570#>.

† Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiment/E-GEOD-10927/ENSG00000207570>

o *mir-9* pode atuar como um oncomiRNA em alguns tumores, tais como câncer de mama¹³², carcinoma hepatocelular¹³³ e leucemia¹³⁴, mas também pode exercer atividade supressora tumoral em outros, como carcinoma de ovário de células serosas¹³⁵ e câncer gástrico¹³⁶. Em relação a potenciais vias tumorigênicas ativadas pelo *mir-9*, já foi demonstrado que esse miRNA regula negativamente a E-caderina em carcinoma mamário, levando a aumento da motilidade celular e invasividade, com consequente ativação da sinalização da β -catenina e expressão elevada de *VEGFA*¹³². Em última análise, o aumento da motilidade celular e capacidade de invasão, bem como aumento da angiogênese, contribuíram para a formação de metástases em câncer de mama neste modelo¹³². Entretanto, a E-caderina não é significativamente expressa em carcinomas adrenocorticais¹³⁷. Além disso, não se encontrou associação significativa entre o *mir-9*, acúmulo anômalo de β -catenina e mutações do *CTNBI*, o que sugere que diferentes protagonistas devem estar envolvidos nas vias ativadas por este miRNA na tumorigênese adrenocortical.

Recentemente, Zhuang *et al.*¹³⁸ realizaram experimentos cocultivando células endoteliais com células tumorais pareadas por tecido, e identificaram aumento significativo da expressão de um grupo de miRNAs em cinco linhagens de células endoteliais. Dentre o grupo de miRNAs hiperexpressos, o *mir-9* teve o maior efeito em promover migração de células endoteliais de veia umbilical. Ao ser captado por células endoteliais, o *mir-9* liberado pelas células tumorais tinha como alvo o SOCS5, um inibidor da via de sinalização JAK-STAT, promovendo, desta forma, migração endotelial. Adicionalmente, experimentos *in vivo* em camundongos implantados com células tumorais de pulmão e colorretal, demonstraram que os níveis de *mir-9* eram significativamente aumentados no plasma desses animais, e que

um antagonista do *mir-9* contribuiu para diminuir o crescimento desses tumores e a angiogênese¹³⁸. Independente do papel diagnóstico e prognóstico de miRNAs em cânceres humanos, interferir na ação dessas moléculas parece ser uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novas terapêuticas⁷³. Em termos práticos, um estudo de fase 2 recente avaliou pela primeira vez uma terapia-alvo baseada em miRNA em pacientes portadores de Hepatite C¹³⁹. Essas evidências em conjunto, portanto, postam o *mir-9* como alvo potencial de terapia dirigida para o carcinoma adrenocortical de adultos.

6 CONCLUSÕES

a) A hiperexpressão do gene *LIN28B* mostrou-se um importante marcador de mau prognóstico na população pediátrica.

b) A imunorreatividade fraca para o LIN28 foi associada à diminuição de sobrevida livre de doença em uma grande coorte de carcinomas adrenocorticais de adultos de dois grupos étnicos distintos.

c) O gene *LIN28A* teve expressão aumentada em carcinomas agressivos de adultos, sugerindo que possa haver regulação pós-transcricional negativa da expressão proteica do LIN28.

d) Amplificações ou deleções gênicas são eventos muito raros para explicar hiper ou hipoexpressão do LIN28 em TACs de adultos e crianças.

e) A hiperexpressão do *mir-9*, um regulador negativo do LIN28, mostrou-se um importante preditor de desfecho desfavorável na população adulta.

f) Confirmaram-se na nossa população os dados da literatura quanto ao ponto de corte do índice de Ki67 ($\geq 10\%$) em TACs de adultos e verificou-se, também, que um índice de Ki67 $\geq 20\%$ estava associado a ainda maior diminuição de sobrevida global nessa faixa etária.

g) Estabeleceu-se um ponto de corte desse marcador de proliferação associado a mau prognóstico na população pediátrica (Ki67 $\geq 20\%$).

Anexo A - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq)

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0429/11

Título: PAPEL DO LIN28, UMA PROTEÍNA LIGADORA DE RNAs, NA TUMORIGÊNESE ADRENOCORTICAL

Pesquisador Responsável: Madson Queiroz de Almeida

Pesquisador Executante: André Murad Faria

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

O Coordenador da 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, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** em 08/03/2012, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• Carta datada de 30/11/11 - Alteração de Pesquisador Responsável de Profa. Dra. Ana Claudia Latronico, para: Dr. Madson Queiroz de Almeida

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

Profa. Dra. Ana Claudia Latronico
Vice - Coordenadora do Programa de
Pós - Graduação em Endocrinologia HCFMUSP

CAPPesq, 12 de Março de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
Fone: 55 11 2661-6442 ramais 16, 17, 18 e 20 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0429/11

Título: PAPEL DO LIN28, UMA PROTEÍNA LIGADORA DE RNAs, NA TUMORIGÊNESE ADRENOCORTICAL

Pesquisador Responsável: Ana Cláudia Latronico

Pesquisador Executante: André Murad Faria

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

A 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, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 23/11/2011, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

Professora Dra. Bernice Bilharinho de Mendonça
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
Em Endocrinologia

CAPPesq, 24 de Novembro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Papel do Lin28, uma proteína ligadora de RNA, na tumorigênese adrenocortical**
PESQUISADOR: Dr. **Madson Queiroz de Almeida**
CARGO/FUNÇÃO: **Médico** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **102257**
UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - Laboratório de Hormônios LIM-42**
2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐
3. DURAÇÃO DA PESQUISA : **48 meses**

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 - Justificativa e os objetivos da pesquisa: O Sr. (a) ou seu filho (a) é portador de um tumor na glândula suprarrenal (uma pequena glândula produtora de cortisol localizada acima do rim). O Sr. (a) ou seu filho (a) está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é pesquisar genes (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas) que estão envolvidos no desenvolvimento dos tumores da glândula suprarrenal. Gostaríamos de consultar se o Sr. (a) ou seu filho (a) concordariam em participar do estudo através da doação de amostras do tumor, que serão obtidas durante ato cirúrgico. A participação neste estudo é voluntária (não obrigatória) e o seu tratamento será realizado mesmo que o Sr. (a) ou o seu filho (a) decida não participar da pesquisa.

2 - Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Para que seja feita a avaliação do gene, será necessária a coleta do material (tecido tumoral) obtido durante o ato cirúrgico para ressecção tumoral (retirada do tumor).

3 - Desconfortos e riscos esperados: Conforme explicado acima, a coleta de pequenos fragmentos do tumor será realizada após a retirada do tumor durante a cirurgia e não trará desconforto ou riscos ao Sr. (a) ou seu filho (a).

4 - Benefícios que poderão ser obtidos: Não há benefícios diretos ou imediatos para participação na pesquisa. Esta pesquisa poderá identificar alterações de genes que possam ser responsáveis pela doença em questão. Este fato poderá ajudar no acompanhamento e no tratamento futuro da doença.

5 - Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: A descoberta de defeitos de genes envolvidos no desenvolvimento de tumores da glândula suprarrenal poderá permitir o diagnóstico precoce de outros casos que possam existir na família.

6 - Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dr. Madson Queiroz de Almeida**, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 2 andar, Bloco 6, São Paulo, SP, 05403-900, Telefone(s) (0xx11-3069-7512). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar - tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 - E-mail: cappelq@hcnet.usp.br

8 - É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 - Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 - Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 - Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Papel do Lin28, uma proteína ligadora de RNA, na tumorigênese adrenocortical”**.

Eu discuti com o **Dr. Madson Queiroz de Almeida** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Anexo C - Termo de Assentimento**Termo de Assentimento****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Papel do Lin28, uma proteína ligadora de RNA, na tumorigênese adrenocortical**

PESQUISADOR: **Dr. André Murad Faria**

CARGO/FUNÇÃO: **Médico** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **131.486**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - Laboratório de Hormônios LIM-42**

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : **48 meses**

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é pesquisar genes (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas) que estão envolvidos no desenvolvimento dos tumores da glândula suprarrenal. A participação neste estudo é voluntária (não obrigatória) e o seu tratamento será realizado mesmo que o Sr. (a) ou o seu filho (a) decida não participar da pesquisa.

Para que seja feita a avaliação do gene, será necessário a coleta do material (um pequeno pedaço do tumor) obtido durante o ato cirúrgico para ressecção tumoral (retirada do tumor) e também a coleta de 5 ml de sangue (correspondente a 1 colher de sopa), através de uma picada com agulha estéril, descartável. A coleta do material (um pequeno pedaço do tumor) será realizada durante a cirurgia, quando você estará dormindo em virtude da anestesia. Desta forma, você não sentirá nenhum desconforto ou dor.

Os riscos e desconfortos desses procedimentos serão mínimos. O desconforto da coleta de sangue é a dor da picada e eventualmente o aparecimento de um pequeno hematoma (mancha arroxeadada em torno da picada) que desaparecerá em pouco menos de uma semana.

Entendi todas as informações que foram dadas sobre o estudo **“Papel do Lin28, uma proteína ligadora de RNA, na tumorigênese adrenocortical”**.

Assinatura do paciente

Data ____ / ____ / ____

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o termo de assentimento deste paciente para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo D - Características clínicas e histopatológicas de 46 tumores adrenocorticais pediátricos (Brasil)

Criança	Identificação	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Weiss	Tamanho (cm)	Estadiamento (ENSAI)	Síndrome hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)	Expressão gênica <i>LI/N28B</i>	Expressão proteica <i>LI/N28B</i>	Expressão proteica Ki67 (%)
1	ACP	1,3	M	CB	2	5,00	1	V	Não	173,0	Não		Baixa	Alta	< 10
2	AGS	2,3	F	CB	5	3,80	1	V	Não	107,2	Não		Baixa	Alta	10 a 19
3	AES	0,9	F	CB	3	6,00	2	C/V	Não	133,0	Não		Baixa	Baixa	10 a 19
4	BTMS	2,1	F	CB	1	4,00	1	V	Não	92,0	Não		Alta	Alta	20 a 29
5	CESM	2,2	M	CB	6	4,50	1	V	Não	17,4	Não		Baixa	Alta	10 a 19
6	CFM	2,2	M	CB	4	6,50	2	V	Não	188,0	Não		Baixa	Alta	20 a 29
7	CMS	2,5	F	CB	6	8,00	2	C/V	Não	1,0	Não		N/D	Alta	< 10
8	DBN	2,1	F	CB	1	3,00	1	V	Não	181,9	Não		N/D	Alta	< 10
9	DSN	2,1	M	CB	5	6,00	2	V	Não	107,0	Não		Alta	Alta	< 10
10	DEP	1,7	M	CB	4	6,00	2	V	Não	94,0	Não		N/D	Baixa	< 10
11	FRL	0,8	F	CB	6	3,50	1	C/V	Não	292,7	Não		N/D	Baixa	10 a 19
12	FJOS	1,3	M	CB	7	5,00	1	C/V	Não	171,3	Não		Alta	Alta	< 10
13	FESA	13,0	F	CB	1	4,50	1	V	Não	0,0	Não		Baixa	Alta	< 10
14	GMP	3,0	M	CB	4	3,50	1	C/V	Não	89,3	Não		N/D	Baixa	10 a 19
15	JFS	2,6	F	CB	4	2,50	1	V	Não	128,6	Não		N/D	Alta	< 10
16	JFF	1,7	M	CB	6	3,00	1	V	Não	123,0	Não		N/D	Alta	< 10
17	JLJ	1,1	M	CB	5	5,00	1	V	Não	219,0	Não		N/D	Alta	< 10
18	JAD	2,5	F	CB	6	6,50	2	V	Não	124,7	Não		Alta	Alta	10 a 19
19	LCSP	1,6	F	CB	3	4,00	1	V	Não	44,0	Não		Baixa	Alta	< 10
20	MRS	3,0	F	CB	6	5,00	1	C/V	Não	301,0	Não		N/D	Baixa	< 10
21	MRG	1,2	F	CB	5	3,70	1	C/V	Não	30,0	Não		Alta	Alta	10 a 19
22	MESO	2,7	F	CB	3	1,80	1	V	Não	15,7	Não		N/D	Baixa	< 10
23	MGS	1,0	F	CB	6	21,00	2	V	Não	36,0	Não		N/D	Baixa	< 10
24	MFP	1,0	F	CB	5	9,00	2	C/V	Não	217,0	Não		N/D	Baixa	< 10
25	MMM	9,0	M	CB	2	4,50	1	C	Não	117,2	Não		Baixa	Alta	< 10

Continua

Criança	Identificação	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Weiss	Tamanho (cm)	Estadiamento (ENSAT)	Síndrome hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)		Recorrência	Tempo de recidiva (meses)	Expressão proteica LIN28B	Expressão proteica K167 (%)	Conclusão
26	NLDB	0,5	F	CB	6	4,00	1	V	Não	274,1	Não	Não		N/D	Baixa	< 10
27	NSM	6,0	F	CB	2	5,00	1	V	Não	129,0	Não	Não		Alta	Baixa	10 a 19
28	NSM	3,0	F	CB	N/D	6,00	2	V	Não	129,0	Não	Não		N/D	Alta	< 10
29	RSD	2,0	M	CB	5	1,50	1	V	Não	200,0	Não	Não		N/D	Alta	10 a 19
30	RAL	6,0	F	CB	5	7,50	2	V	Não	217,0	Não	Não		N/D	Baixa	< 10
31	SSM	1,0	F	CB	6	6,50	2	C/V	Não	30,4	Não	Não		Baixa	Alta	< 10
32	SIR	2,8	F	CB	3	5,00	1	V	Não	182,0	Não	Não		Baixa	Alta	< 10
33	SRBP	2,2	F	CB	2	7,00	2	V/C	Não	48,0	Não	Não		Baixa	Alta	< 10
34	VRPO	1,4	M	CB	4	5,50	2	V	Não	218,9	Não	Não		N/D	Alta	< 10
35	VTD	2,5	F	CB	1	4,50	1	V	Não	106,0	Não	Não		Alta	Alta	< 10
36	WBF	2,3	M	CB	5	3,50	2	V	Não	49,9	Não	Não		N/D	Baixa	30 a 39
37	CNS	4,5	F	CM	5	6,50	2	C/V	Sim	25,0	Sim	Sim	11,0	N/D	Baixa	10 a 19
38	GGs	2,6	M	CM	7	6,00	3	V	Sim	12,0	Sim	Sim	5,0	Alta	Alta	50 a 59
39	JAL	3,3	F	CM	5	6,00	2	C/V	Não	21,3	Sim	Sim	6,1	N/D	Baixa	30 a 39
40	KVMS	0,9	F	CM	4	8,50	2	V	Não	78,0	Sim	Sim	4,0	Alta	Baixa	< 10
41	NMM	2,0	F	CM	8	7,00	3	C/V	Sim	27,0	Sim	Sim	14,0	Alta	Alta	< 10
42	NGGS	3,1	F	CM	7	13,50	2	C/V	Sim	20,0	Sim	Sim	12,0	Alta	Alta	20 a 29
43	REFM	2,5	M	CM	7	12,00	4	C/V	Sim	4,4	Sim	Sim	0,0	N/D	Alta	20 a 29
44	RFF	2,6	M	CM	5	2,50	1	V	Não	201,0	Sim	Sim	53,0	N/D	Alta	10 a 19
45	RFF	4,9	M	CM	7	8,50	2	V	Não	173,1	Sim	Sim	25,0	Alta	Alta	40 a 49
46	VVG	9,4	F	CM	7	9,00	4	C/V	Sim	18,0	Sim	Sim	0,0	Baixa	Baixa	10 a 19

Onde: M = Masculino; F = Feminino; CB = Clinicamente benigno; CM = Clinicamente maligno; V = virilizante puro; C/V = Cushing + virilizante; C = Cushing puro; N/D = não disponível.

Anexo E - Características clínicas e histopatológicas de 87 adenomas adrenocorticais em adultos(Brasil)

Paciente	Identificação	Idade (anos)	Sexo	Weiss	Tamanho (cm)	Síndrome hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Expressão proteica LIN28	Expressão proteica Kí67 (%)
1	MAS	72,0	F	1	4,00	NF	Não	69,2	Baixa	< 10
2	AAMS	16,9	F	2	4,00	C/V	Não	39,6	N/D	N/D
3	AMAV	67,6	F	0	3,40	C	Não	30,2	Baixa	< 10
4	APS	34,3	F	1	3,00	C	Não	18,6	Alta	< 10
5	AA	62,7	F	0	2,70	C	Não	52,2	Baixa	< 10
6	ALS	72,4	M	1	1,80	NF	Não	52,2	Baixa	< 10
7	BBO	34,6	M	0	4,40	NF	Não	1,3	Baixa	< 10
8	CMS	55,2	F	0	1,60	C	Não	67,2	N/D	N/D
9	CMD	57,5	F	0	5,50	V	Não	98,4	Alta	< 10
10	CRQ	36,0	F	1	6,00	C	Não	147,0	Baixa	< 10
11	CMA	15,0	F	1	2,00	C	Não	246,7	Alta	< 10
12	CCT	63,0	F	2	5,00	NF	Não	164,0	Baixa	< 10
13	CFS	18,0	F	2	3,20	C	Não	153,0	Alta	< 10
14	CSM	59,0	F	2	3,50	C	Não	154,3	Alta	< 10
15	CRA	37,0	F	0	3,50	NF	Não	135,0	Baixa	< 10
16	CGS	74,7	F	0	N/D	NF	Não	36,4	Baixa	< 10
17	DP	51,0	F	0	4,20	NF	Não	83,0	Baixa	< 10
18	DABO	27,0	F	2	2,50	C	Não	91,0	Baixa	< 10
19	EBA	51,6	F	0	2,30	C	Não	24,0	Baixa	< 10
20	ENSA	46,0	F	0	5,00	NF	Não	86,7	Baixa	< 10
21	EDS	34,0	F	0	2,50	N/D	Não	0,0	Baixa	< 10
22	ESM	67,5	F	0	6,00	C	Não	112,2	Baixa	< 10
23	FPV	36,0	M	2	6,00	C	Não	203,0	N/D	N/D
24	FPSM	29,0	F	2	5,00	C	Não	187,0	Alta	< 10
25	GNS	21,8	F	0	3,20	C	Não	28,5	Alta	< 10
26	GS	40,2	F	2	3,90	C	Não	5,5	Alta	< 10
27	HS	69,8	M	1	6,00	C	Não	71,0	Baixa	< 10
28	HCF	38,0	F	2	9,50	C	Não	229,1	Alta	< 10
29	HRG	26,0	F	1	5,50	C	Não	68,0	N/D	N/D
30	IAF	66,4	F	1	4,00	NF	Não	0,0	Baixa	< 10

Continua

Paciente	Identificação	Idade (anos)	Sexo	Weiss	Tamanho (cm)	Síndrome hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Expressão proteica LIN28	Expressão proteica Ki67 (%)
31	IJS	28,3	F	0	4,50	C	Não	49,2	Baixa	< 10
32	IAP	22,0	F	2	4,00	C	Não	180,0	Baixa	< 10
33	ISP	50,0	F	4	4,50	V	Não	152,1	Alta	< 10
34	ITY	37,0	F	1	10,00	C	Não	54,0	Baixa	< 10
35	IAS	68,4	F	1	2,90	C	Não	95,3	Alta	< 10
36	ICS	47,0	F	0	7,00	C	Não	98,2	Baixa	< 10
37	IMO	48,1	F	1	3,50	C	Não	121,0	N/D	N/D
38	JOL	54,1	M	0	4,00	C	Não	89,5	Baixa	< 10
39	JPD	49,2	M	0	5,00	C	Não	54,0	Baixa	< 10
40	JAF	64,3	M	0	3,80	C	Não	31,7	Baixa	< 10
41	JMSF	53,4	M	0	1,00	NF	Não	22,0	Baixa	< 10
42	JMM	54,0	M	1	3,00	NF	Não	43,0	Baixa	< 10
43	JVN	34,0	M	1	5,50	C	Não	33,0	N/D	N/D
44	JPP	40,0	F	0	5,50	NF	Não	211,8	Baixa	< 10
45	JÁ	35,0	F	1	3,50	C	Não	121,0	Alta	< 10
46	JAQO	22,0	F	1	5,00	C	Não	144,0	N/D	N/D
47	JSR	23,9	F	2	4,00	C	Não	41,0	Baixa	< 10
48	LYNHD	28,0	F	2	2,50	NF	Não	86,0	Alta	< 10
49	LAS	27,0	F	1	4,00	C	Não	128,0	Baixa	< 10
50	LSS	41,0	F	0	1,80	C	Não	79,0	Baixa	< 10
51	MBZ	53,0	F	2	4,00	C	Não	95,0	Baixa	< 10
52	MRCT	67,8	F	0	3,00	NF	Não	15,7	Baixa	< 10
53	MCHS	24,0	F	1	3,80	C	Não	34,0	Alta	< 10
54	MAC	64,0	F	0	3,50	NF	Não	46,0	Baixa	< 10
55	MAPG	64,0	F	1	3,20	NF	Não	48,0	Baixa	< 10
56	MCBCF	70,1	F	0	N/D	C	Não	5,3	Baixa	< 10
57	MDAC	31,6	F	2	5,50	N/D	Não	0,0	Alta	< 10
58	MSCS	49,6	F	0	2,30	C	Não	4,4	Alta	< 10
59	MSSS	27,0	F	0	3,70	C	Não	1,0	Baixa	< 10
60	MSS	37,0	F	1	4,50	C	Não	127,0	Baixa	< 10

Continuação

Continua

Paciente	Identificação	Idade (anos)	Sexo	Weiss	Tamanho (cm)	Síndrome hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Conclusão		
									Expressão proteica LIN28	Expressão proteica Ki67 (%)	
61	MEO	56,4	F	0	4,10	NF	Não	123,8	Baixa	< 10	
62	MEFC	37,8	F	0	3,50	C	Não	89,8	Alta	< 10	
63	MJSS	39,0	F	1	2,50	C	Não	93,0	Alta	< 10	
64	MCS	15,0	F	1	7,00	C	Não	24,0	Baixa	< 10	
65	MFm	51,2	F	1	5,00	V	Não	73,4	Alta	< 10	
66	MMS	25,2	F	2	3,00	C	Não	12,0	Alta	< 10	
67	MFP	54,8	F	N/D	2,50	N/D	Não	190,7	N/D	N/D	
68	MAFL	39,9	F	0	3,00	C	Não	54,7	Baixa	< 10	
69	MBS	58,8	F	0	5,50	NF	Não	6,8	Baixa	< 10	
70	NAFO	36,0	F	0	3,50	C	Não	45,2	Baixa	< 10	
71	OLS	47,0	F	1	2,50	C	Não	302,7	Baixa	< 10	
72	RBJ	48,8	M	0	2,60	NF	Não	57,0	Baixa	< 10	
73	RFBV	54,0	F	1	3,00	NF	Não	68,0	Baixa	< 10	
74	RFA	25,0	M	2	4,00	C	Não	1,0	Alta	< 10	
75	RI	21,0	F	2	3,00	C	Não	99,0	Baixa	< 10	
76	RAM	21,0	F	0	3,00	C	Não	23,0	Baixa	< 10	
77	SBP	30,0	F	3	3,00	C	Não	25,0	Alta	< 10	
78	SMAF	37,0	F	2	3,00	C	Não	49,0	Alta	< 10	
79	TCSO	30,9	F	1	3,00	C	Não	10,1	Alta	< 10	
80	TMP	24,0	F	2	3,00	C	Não	195,9	Baixa	< 10	
81	TSS	60,4	F	0	3,00	C	Não	97,7	Baixa	< 10	
82	TBL	39,0	F	1	3,50	C	Não	157,0	Baixa	< 10	
83	VOS	41,0	F	1	2,80	C	Não	234,0	N/D	N/D	
84	VBO	42,0	F	2	6,00	NF	Não	73,0	Baixa	< 10	
85	VEO	77,0	F	2	1,50	NF	Não	90,0	Baixa	< 10	
86	VRPC	21,5	F	0	1,20	N/D	Não	24,9	Alta	< 10	
87	ZAP	43,2	F	0	3,80	N/D	Não	24,6	Alta	< 10	

Onde: M = Masculino; F = Feminino; N/D = não disponível; C/V = Cushing + virilizante; C = Cushing puro; V = virilizante puro; NF = não funcionante.

Anexo F - Características clínicas e histopatológicas de 219 carcinomas adrenocorticais em adultos (Brasil e Alemanha)

Paciente	Identificação	País	Idade (anos)	Sexo	Weiss	Tamanho (cm)	Estadiamento (ENSAT)	Síndrome hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)	Expressão proteica LIN28	Expressão proteica Ki67 (%)
1	ACR	BR	49,0	F	7	9,00	3	C	Sim	36,0	Sim	32,4	Baixa	< 10
2	MAS	BR	32,0	F	8	16,00	4	C/V	Sim	12,4	Sim	0,0	Alta	70 a 79
3	AFF	BR	29,5	F	7	7,50	2	C/V	Sim	28,3	Sim	11,6	N/D	N/D
4	ALDSC	BR	22,4	F	6	11,00	2	NF	Não	29,8	Não		Baixa	< 10
5	AMD	BR	58,8	F	5	10,00	2	NF	Não	99,2	Não		Alta	< 10
6	APF	BR	35,7	F	N/D	N/D	N/D	CV	Não	25,8	Sim	0,0	Alta	20 a 29
7	ASS	BR	62,1	F	5	8,00	2	NF	Sim	15,6	Sim	3,9	Baixa	< 10
8	AXS	BR	33,0	F	8	22,50	4	C/V	Sim	4,1	Sim	0,0	Baixa	< 10
9	AJS	BR	66,5	M	8	20,00	2	C	Sim	18,0	Sim	16,3	Alta	70 a 79
10	AMBR	BR	36,5	M	N/D	N/D	N/D	N/D	Não	146,7	Sim	2,0	Baixa	< 10
11	AEL	BR	57,4	F	3	3,70	1	NF	Não	48,7	Não		Baixa	< 10
12	AAF	BR	65,6	M	6	13,50	4	C/V	Não	4,5	Sim	0,0	Alta	20 a 29
13	ARF	BR	51,4	F	8	23,00	3	V	Sim	22,0	Sim	12,0	Baixa	10 a 19
14	ASN	BR	29,0	M	8	19,00	4	C	Sim	3,9	Sim	0,0	Baixa	< 10
15	BFS	BR	23,3	M	3	10,00	2	N/D	Não	49,9	Não		Alta	20 a 29
16	CCS	BR	42,3	F	9	N/D	3	N/D	Não	6,5	Sim	6,3	N/D	N/D
17	CHT	BR	36,1	M	8	11,00	2	NF	Não	60,0	Sim	20,4	Alta	50 a 59
18	CRS	BR	62,8	F	7	13,00	3	C/V	Sim	15,8	Sim	4,3	N/D	N/D
19	CAOC	BR	51,0	F	6	6,50	2	ND	Sim	30,0	Sim	24,0	Alta	10 a 19
20	CPG	BR	29,7	F	3	8,00	2	C	Sim	8,8	Sim	6,7	Alta	< 10
21	DAP	BR	52,0	F	7	12,50	2	N/D	Sim	15,0	Sim	3,9	Baixa	10 a 19
22	DLSP	BR	23,4	F	6	11,00	3	C/V	Não	16,3	Sim	7,9	Alta	10 a 19
23	DCM	BR	23,0	F	7	6,20	2	C/V	Não	168,8	Não		Alta	< 10
24	EAAA	BR	53,5	F	6	6,50	2	NF	Não	23,3	Não		N/D	N/D
25	ESA	BR	40,5	F	3	3,00	3	C	Não	51,0	Não		Alta	< 10
26	ENM	BR	29,0	F	3	20,00	2	V	Não	61,0	Não		Alta	< 10
27	ECNF	BR	31,0	F	7	12,00	3	C/V	Sim	16,0	Sim	5,0	Baixa	< 10
28	EMB	BR	30,3	F	3	N/D	3	N/D	Sim	53,3	Sim	3,7	N/D	N/D
29	ERL	BR	79,6	F	3	6,50	3	C	Não	12,0	Não		N/D	N/D
30	EAP	BR	17,0	M	7	9,00	2	C/V/E	Não	60,0	Não		Baixa	< 10

Continua

Paciente	Identificação	País	Idade (anos)	Sexo	Weiss	Tamanho (cm)	Estadiamento (ENSAT)	Síndrome hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)	Expressão proteica LIN28	Expressão proteica Ki67 (%)
31	EAC	BR	72,0	F	7	21,00	3	NF	Sim	31,0	Sim	14,0	Baixa	10 a 19
32	FMD	BR	15,0	F	8	20,00	4	C/V	Sim	22,0	Sim	0,0	Baixa	40 a 49
33	FSA	BR	22,7	F	8	14,50	4	C	Sim	22,0	Sim	0,0	N/D	N/D
34	FK	BR	33,0	M	5	N/D	4	NF	Não	16,0	Sim	0,0	N/D	N/D
35	FLD	BR	35,0	F	8	21,00	4	C/V	Sim	1,7	Sim	0,0	Baixa	< 10
36	FMJ	BR	47,0	F	5	7,00	4	V	Sim	18,0	Sim	0,0	N/D	N/D
37	FMSB	BR	35,0	F	3	2,20	1	C/V	Não	133,2	Não		Baixa	< 10
38	FGMN	BR	30,0	M	6	11,00	3	NF	Sim	12,0	Sim	4,0	Baixa	10 a 19
39	GMS	BR	55,5	F	8	10,50	3	C/V	Sim	35,1	Sim	8,0	Baixa	60 a 69
40	HTB	BR	54,1	M	3	8,50	3	C	Não	12,2	Não		Baixa	< 10
41	ICA	BR	19,0	F	6	11,00	2	C	Não	102,0	Não		Alta	< 10
42	IMS	BR	22,6	F	6	13,00	2	NF	Não	55,1	Não		Baixa	< 10
43	IMSM	BR	45,0	F	8	10,00	3	C/V	Não	152,0	Não		Baixa	< 10
44	JIS	BR	30,4	F	8	15,00	2	V	Não	14,1	Não		Alta	40 a 49
45	JCLV	BR	23,1	F	5	6,00	3	C/V	Não	52,7	Sim	7,0	Baixa	20 a 29
46	JFM	BR	19,0	F	4	2,50	1	C	Não	125,5	Não		Alta	< 10
47	JEC	BR	17,7	F	8	10,00	4	C/V	Sim	8,0	Sim	0,0	Baixa	40 a 49
48	JIS	BR	64,0	F	4	9,00	4	NF	Sim	53,0	Sim	0,0	Baixa	< 10
49	JDM	BR	46,0	M	6	20,00	3	NF	Não	123,0	Não		Baixa	< 10
50	JHS	BR	38,0	F	7	15,00	2	C/V	Sim	26,0	Sim	20,0	Baixa	< 10
51	JNS	BR	42,0	M	5	21,00	2	NF	Não	21,0	Sim	11,0	Baixa	< 10
52	JC	BR	49,0	F	4	15,50	2	C/V	Não	179,2	Não		Alta	< 10
53	KCM	BR	18,0	F	8	13,00	4	C/V	Sim	19,0	Sim	8,0	Baixa	60 a 69
54	KAF	BR	23,0	F	6	14,00	4	C/V	Sim	17,0	Sim	0,0	Baixa	< 10
55	LTP	BR	65,3	F	4	7,00	2	C	Não	27,6	Não		Baixa	< 10
56	LZA	BR	22,0	F	9	21,00	3	C/V	Sim	60,0	Sim	48,0	Alta	< 10
57	LOB	BR	38,9	F	9	11,00	3	NF	Não	8,0	Sim	5,8	N/D	N/D
58	LS	BR	42,8	F	3	4,00	1	C/V	Não	17,9	Não		Alta	< 10
59	LS	BR	29,0	F	6	12,00	4	C/V	Sim	31,0	Sim	0,0	Baixa	< 10
60	MRA	BR	30,0	F	3	7,80	2	NF	Não	9,7	Não		N/D	N/D
61	MASS	BR	66,2	F	4	15,00	2	NF	Não	9,4	Não		Alta	10 a 19
62	MCS	BR	33,0	F	3	10,50	2	C/V	Não	27,0	Não		Alta	< 10
63	MFBS	BR	21,3	F	4	3,50	1	C/V	Não	106,1	Não		Alta	< 10
64	MLC	BR	69,1	F	3	4,50	1	C	Não	8,2	Não		Baixa	< 10
65	MÊS	BR	37,7	F	5	6,00	2	C/V	Sim	34,0	Sim	6,6	Alta	20 a 29

Continuação

Continua

Paciente	Identificação	País	Idade (anos)	Sexo	Weiss	Tamanho (cm)	Estadiamento (ENSAT)	Síndrome hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)	Expressão proteica LIN28	Expressão proteica Ki67 (%)
66	MIC	BR	58,7	F	4	12,00	2	V	Não	97,3	Não		Alta	< 10
67	MJL	BR	55,7	F	4	10,00	2	C	Não	17,8	Não		Alta	< 10
68	MVSS	BR	50,0	F	4	6,50	2	V	Não	58,0	Não		Alta	< 10
69	ML	BR	56,8	M	4	14,00	4	C/V	Sim	0,6	Sim	0,0	Alta	50 a 59
70	MASB	BR	26,5	F	7	16,30	4	C/V	Sim	7,4	Sim	0,0	Baixa	< 10
71	MOO	BR	66,0	F	4	6,00	2	NF	Não	87,0	Não		Alta	< 10
72	OAS	BR	45,0	F	6	18,00	4	C/V	Não	314,0	Sim	0,0	Baixa	< 10
73	OTO	BR	40,0	F	4	11,00	2	C/V	Não	376,2	Não		Alta	< 10
74	PRGA	BR	42,0	M	5	17,50	3	NF	Sim	4,2	Sim	3,0	Baixa	10 a 19
75	RSST	BR	37,4	F	4	6,00	2	V	Não	27,0	Não		Alta	< 10
76	RL	BR	44,7	M	7	8,20	2	NF	Não	73,4	Sim	33,3	Baixa	< 10
77	RVS	BR	17,0	F	4	15,00	4	V	Não	125,0	Não		Baixa	< 10
78	SOM	BR	28,0	F	3	6,50	2	V	Não	130,0	Não		Alta	< 10
79	SFS	BR	53,5	M	9	17,00	3	C	Sim	10,4	Sim	9,4	Baixa	80 a 89
80	SPMO	BR	53,9	M	3	3,00	1	C	Não	32,2	Não		Baixa	< 10
81	SSA	BR	27,6	F	8	13,00	4	C/V	Sim	10,1	Sim	0,0	Baixa	40 a 49
82	SLS	BR	36,5	F	N/D	12,00	2	C/V	Sim	12,4	Sim	5,0	Baixa	< 10
83	SCG	BR	40,0	F	7	17,00	4	C/V	Sim	38,0	Sim	6,0	Baixa	20 a 29
84	AS	BR	37,4	F	N/D	12,00	2	N/D	Não	91,1	Não		Baixa	< 10
85	SRBT	BR	35,0	F	6	10,00	2	C/V	Sim	21,0	Sim	14,0	Baixa	< 10
86	TMC	BR	22,0	F	7	15,00	3	N/D	Sim	10,0	Sim	4,9	N/D	N/D
87	TCP	BR	81,0	F	4	14,00	2	C/V	Não	19,6	Sim	19,6	Alta	< 10
88	VFG	BR	44,0	F	8	18,00	4	V	Sim	46,0	Sim	0,0	Baixa	20 a 29
89	VRS	BR	51,2	M	3	6,00	2	HAP	Não	32,4	Não		Alta	< 10
90	VLE	BR	36,0	F	3	8,00	2	C	Não	104,0	Não		Baixa	< 10
91	Pe 1	DE	37,6	F	4	11,00	4	N/D	Sim	9,4	Sim	0,0	Baixa	10 a 19
92	Pe 2	DE	71,9	M	6	14,00	2	SC	Não	131,6	Sim	48,0	Baixa	10 a 19
93	Pe 3	DE	45,2	F	5	4,50	3	N/D	Não	117,7	Não		Alta	< 10
94	Pe 4	DE	73,4	F	8	9,00	3	N/D	Sim	11,8	Sim	0,0	Alta	40 a 49
95	Pe 5	DE	24,0	F	6	11,00	4	SC	Sim	29,7	Sim	0,0	Alta	20 a 29
96	Pe 6	DE	70,7	F	6	13,00	4	SC	Sim	1,4	Sim	0,0	Baixa	20 a 29
97	Pe 7	DE	39,5	M	5	12,00	3	SC	Sim	31,3	Sim	10,7	Baixa	30 a 39
98	Pe 8	DE	49,5	F	7	17,00	4	N/D	Sim	34,8	Sim	0,0	Baixa	< 10
99	Pe 9	DE	44,5	M	6	10,00	3	N/D	Sim	61,7	Sim	0,0	Baixa	< 10
100	Pe 10	DE	36,1	M	5	10,00	2	N/D	Sim	109,6	Sim	21,5	Alta	10 a 19

Continuação

Continua

Continuação

Paciente	Identificação	País	Idade (anos)	Sexo	Weiss	Tamanho (cm)	Estadiamento (ENSAT)	Síndrome hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)	Expressão proteica LIN28	Expressão proteica Ki67 (%)
101	Pe 11	DE	54,9	F	6	13,00	3	N/D	Não	194,7	Sim	63,2	Alta	< 10
102	Pe 12	DE	42,5	F	4	17,00	4	SC	Sim	14,4	Sim	0,0	Alta	10 a 19
103	Pe 13	DE	51,2	F	4	11,00	3	SC	Sim	16,3	Sim	12,8	Baixa	10 a 19
104	Pe 14	DE	76,8	M	4	5,00	1	SC	Não	145,2	Sim	36,2	Baixa	< 10
105	Pe 15	DE	58,7	F	5	6,50	3	SC	Sim	63,4	Sim	21,4	N/D	40 a 49
106	Pe 16	DE	33,8	M	7	15,00	4	N/D	Sim	11,9	Sim	0,0	Alta	30 a 39
107	Pe 17	DE	29,3	F	5	8,30	4	SC	Sim	47,0	Sim	0,0	Baixa	< 10
108	Pe 18	DE	35,0	F	4	13,00	2	SC	Não	97,8	Sim	8,8	Baixa	N/D
109	Pe 19	DE	72,2	M	6	11,00	4	N/D	Sim	12,3	Sim	0,0	Baixa	N/D
110	Pe 20	DE	22,3	F	5	12,00	2	NSC	Não	14,9	Não		Alta	N/D
111	Pe 21	DE	73,5	F	4	13,00	3	N/D	Sim	7,8	Sim	5,6	Baixa	20 a 29
112	Pe 22	DE	32,1	F	7	25,00	4	SC	Sim	11,0	Sim	0,0	N/D	10 a 19
113	Pe 23	DE	35,5	F	5	12,00	2	NSC	Sim	43,6	Sim	17,6	N/D	30 a 39
114	Pe 24	DE	45,5	M	6	9,00	4	SC	Sim	6,0	Sim	0,0	Baixa	10 a 19
115	Pe 25	DE	74,4	F	5	7,00	3	NSC	Não	14,8	Sim	0,0	Alta	N/D
116	Pe 26	DE	42,9	M	7	21,00	2	SC	Sim	8,8	Sim	7,8	Baixa	N/D
117	Pe 27	DE	33,6	F	4	12,00	2	SC	Sim	21,0	Sim	0,0	Baixa	N/D
118	Pe 28	DE	14,7	M	5	17,00	2	SC	Sim	21,7	Sim	7,3	Baixa	N/D
119	Pe 29	DE	28,3	F	5	16,00	2	N/D	Sim	8,0	Sim	3,5	Baixa	20 a 29
120	Pe 30	DE	33,3	F	2	15,50	3	N/D	Sim	44,8	Sim	8,9	Baixa	< 10
121	Pe 31	DE	45,3	F	6	20,00	2	SC	Sim	13,1	Sim	0,0	Alta	50 a 59
122	Pe 32	DE	39,5	M	4	12,00	3	N/D	Não	245,1	Sim	25,5	Alta	10 a 19
123	Pe 33	DE	37,2	F	9	8,00	2	SC	Sim	95,5	Sim	18,3	Baixa	N/D
124	Pe 34	DE	27,4	F	6	14,00	4	SC	Não	71,2	Sim	0,0	Alta	10 a 19
125	Pe 35	DE	77,2	F	5	19,00	2	NSC	Não	1,9	Não		Baixa	N/D
126	Pe 36	DE	18,7	F	3	18,00	2	NSC	Não	93,8	Sim	8,8	Alta	10 a 19
127	Pe 37	DE	64,6	F	6	23,00	4	ND	Sim	4,0	Sim	0,0	Baixa	50 a 59
128	Pe 38	DE	60,0	M	4	28,00	2	NSC	Sim	5,5	Sim	0,0	Baixa	N/D
129	Pe 39	DE	61,6	F	6	15,00	4	SC	Sim	7,0	Sim	0,0	N/D	20 a 29
130	Pe 40	DE	66,2	M	4	14,00	3	N/D	Sim	86,5	Sim	0,0	Baixa	< 10
131	Pe 41	DE	66,5	F	5	10,00	3	NSC	Não	153,2	Sim	48,7	Baixa	N/D
132	Pe 42	DE	31,1	F	6	9,50	3	SC	Sim	95,9	Sim	0,0	Alta	10 a 19
133	Pe 43	DE	38,8	M	4	9,00	2	NSC	Não	72,6	Não		Alta	< 10
134	Pe 44	DE	36,9	F	4	8,00	2	N/D	Sim	26,7	Sim	7,5	N/D	N/D
135	Pe 45	DE	69,7	M	6	10,00	3	SC	Sim	11,3	Sim	0,0	Baixa	60 a 69

Continua

Paciente	Identificação	País	Idade (anos)	Sexo	Weiss	Tamanho (cm)	Estadiamento (ENSAT)	Síndrome hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)	Expressão proteica LIN28	Expressão proteica Ki67 (%)
136	Pe 46	DE	55,3	F	6	15,40	3	SC	Sim	9,5	Sim	5,9	Baixa	N/D
137	Pe 47	DE	34,2	F	4	15,00	2	SC	Não	186,4	Sim	58,9	Baixa	N/D
138	Pe 48	DE	53,3	F	8	12,00	2	SC	Sim	6,8	Sim	3,8	Alta	N/D
139	Pe 49	DE	58,1	F	4	8,00	2	N/D	Não	52,2	Não		Alta	< 10
140	Pe 50	DE	27,4	F	6	9,00	4	SC	Sim	14,0	Sim	0,0	Alta	N/D
141	Pe 51	DE	77,2	M	5	12,70	2	N/D	Sim	0,0	Não		Baixa	10 a 19
142	Pe 52	DE	47,3	F	8	15,00	2	SNC	Sim	21,3	Sim	5,3	Baixa	N/D
143	Pe 53	DE	40,2	M	3	13,00	2	SC	Não	179,3	Sim	37,7	Baixa	< 10
144	Pe 54	DE	61,6	F	8	12,00	4	N/D	Não	84,1	Sim	0,0	Baixa	N/D
145	Pe 55	DE	52,5	F	5	16,00	3	SC	Não	1,0	Sim	0,0	N/D	< 10
146	Pe 56	DE	67,3	F	7	6,80	4	SC	Sim	8,0	Sim	0,0	Alta	20 a 29
147	Pe 57	DE	34,4	M	6	5,00	1	NSC	Sim	153,7	Sim	21,9	Alta	10 a 19
148	Pe 58	DE	41,7	M	5	10,50	3	N/D	Sim	43,8	Sim	8,6	N/D	N/D
149	Pe 59	DE	44,2	M	4	7,50	3	N/D	Não	131,3	Não		Baixa	< 10
150	Pe 60	DE	37,6	M	6	N/D	N/D	N/D	Não	146,7	Sim	0,0	Baixa	N/D
151	Pe 61	DE	57,5	M	4	18,00	3	N/D	Sim	17,0	Sim	8,8	Alta	N/D
152	Pe 62	DE	68,1	M	3	7,50	2	N/D	Não	112,8	Não		Baixa	< 10
153	Pe 63	DE	27,2	M	5	8,50	2	N/D	Sim	49,8	Sim	11,6	N/D	20 a 29
154	Pe 64	DE	55,5	F	4	8,00	4	N/D	Sim	4,8	Sim	0,0	N/D	< 10
155	Pe 65	DE	56,3	F	2	9,50	3	N/D	Não	0,0	Sim	0,0	N/D	N/D
156	Pe 66	DE	73,8	F	5	9,50	4	NSC	Sim	14,6	Sim	0,0	N/D	10 a 19
157	Pe 67	DE	33,6	M	5	19,00	3	NSC	Sim	17,5	Sim	6,9	N/D	20 a 29
158	Pe 68	DE	32,0	F	5	10,50	3	N/D	Sim	8,9	Sim	0,0	Alta	30 a 39
159	Pe 69	DE	30,8	M	4	14,00	4	SC	Sim	10,0	Sim	0,0	Baixa	10 a 19
160	Pe 70	DE	34,2	F	8	16,00	2	SC	Sim	81,8	Sim	23,9	N/D	40 a 49
161	Pe 71	DE	49,9	M	4	7,00	2	N/D	Não	118,0	Sim	0,0	Baixa	< 10
162	Pe 72	DE	71,1	F	2	12,00	3	N/D	Não	1,0	Não		Baixa	10 a 19
163	Pe 73	DE	72,6	F	3	20,00	3	SC	Não	37,4	Sim	37,0	Baixa	20 a 29
164	Pe 74	DE	67,3	M	4	10,00	4	NSC	Sim	12,2	Sim	0,0	Baixa	N/D
165	Pe 75	DE	35,5	F	6	8,00	3	NSC	Sim	19,0	Sim	14,5	Alta	10 a 19
166	Pe 76	DE	71,0	F	5	9,00	2	NSC	Não	131,4	Não		Baixa	< 10
167	Pe 77	DE	32,2	M	5	19,00	4	N/D	Sim	71,5	Sim	0,0	Baixa	N/D
168	Pe 78	DE	63,6	F	4	0,00	4	N/D	Sim	5,5	Sim	0,0	Alta	10 a 19
169	Pe 79	DE	36,6	F	5	11,00	3	NSC	Não	30,4	Não		Baixa	N/D
170	Pe 80	DE	34,3	F	4	8,00	2	N/D	Não	86,6	Não		Baixa	< 10

Continuação

Continua

Continuação

Paciente	Identificação	País	Idade (anos)	Sexo	Weiss	Tamanho (cm)	Estadiamento (ENSAT)	Síndrome hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)	Expressão proteica LIN28	Expressão proteica Ki67 (%)
171	Pe 81	DE	66,6	M	5	8,50	2	N/D	Sim	7,5	Sim	2,6	Baixa	< 10
172	Pe 82	DE	47,5	F	8	15,00	4	N/D	Sim	26,1	Sim	0,0	Baixa	N/D
173	Pe 83	DE	52,6	F	6	20,00	4	SC	Sim	3,4	Sim	0,0	Baixa	N/D
174	Pe 84	DE	49,2	F	5	6,50	4	SC	Sim	13,0	Sim	0,0	Baixa	20 a 29
175	Pe 85	DE	16,8	F	8	16,50	4	N/D	Sim	7,0	Sim	0,0	Baixa	N/D
176	Pe 86	DE	61,5	F	4	16,00	3	SC	Sim	75,1	Sim	15,2	Baixa	< 10
177	Pe 87	DE	7,0	M	6	10,00	4	SC	Sim	11,9	Sim	0,0	Alta	N/D
178	Pe 88	DE	70,5	F	5	20,00	4	N/D	Sim	37,5	Sim	0,0	Baixa	30 a 39
179	Pe 89	DE	55,1	F	4	9,50	3	SC	Sim	53,4	Sim	48,3	Alta	< 10
180	Pe 90	DE	44,1	M	8	13,00	4	N/D	Sim	19,4	Sim	0,0	Baixa	10 a 19
181	Pe 91	DE	61,9	F	5	10,00	2	SC	Não	81,9	Sim	24,2	Baixa	10 a 19
182	Pe 92	DE	68,3	F	3	13,00	3	N/D	Sim	88,5	Sim	0,0	Baixa	< 10
183	Pe 93	DE	45,9	M	5	9,00	2	SC	Sim	30,2	Sim	8,3	Alta	N/D
184	Pe 94	DE	60,4	F	7	9,20	3	N/D	Sim	14,0	Sim	0,0	Baixa	10 a 19
185	Pe 95	DE	56,7	F	5	12,00	4	SC	Sim	0,7	Sim	0,0	Baixa	N/D
186	Pe 96	DE	41,6	F	2	11,00	3	SC	Sim	38,3	Sim	0,0	Baixa	N/D
187	Pe 97	DE	60,8	M	4	12,00	3	NSC	Sim	26,2	Sim	9,2	Alta	30 a 39
188	Pe 98	DE	44,1	M	6	12,50	3	N/D	Sim	10,5	Sim	4,7	Alta	N/D
189	Pe 99	DE	66,1	M	6	9,50	2	N/D	Não	63,9	Sim	63,9	Baixa	< 10
190	Pe 100	DE	74,2	F	6	4,50	1	SC	Não	90,8	Sim	18,4	Baixa	< 10
191	Pe 101	DE	38,7	F	5	12,00	3	SC	Não	68,4	Não		Baixa	10 a 19
192	Pe 102	DE	55,9	M	5	9,50	3	NSC	Sim	12,8	Sim	9,3	Alta	N/D
193	Pe 103	DE	40,9	F	5	9,50	2	NSC	Não	69,1	Não		Baixa	< 10
194	Pe 104	DE	68,6	M	5	12,00	4	NSC	Sim	4,1	Sim	0,0	Alta	30 a 39
195	Pe 105	DE	64,4	M	5	14,50	3	NSC	Sim	10,3	Sim	3,5	Alta	10 a 19
196	Pe 106	DE	59,4	M	4	12,70	2	SC	Sim	9,5	Sim	4,8	Baixa	N/D
197	Pe 107	DE	38,3	F	4	18,50	2	N/D	Sim	91,4	Sim	36,6	Baixa	< 10
198	Pe 108	DE	48,4	F	5	7,00	3	N/D	Sim	131,2	Sim	64,8	Baixa	N/D
199	Pe 109	DE	22,9	F	4	9,00	2	NSC	Sim	42,8	Sim	8,7	Baixa	N/D
200	Pe 110	DE	64,8	F	9	6,20	2	N/D	Não	52,3	Sim	41,3	Alta	N/D
201	Pe 111	DE	71,1	M	4	7,00	2	N/D	Não	0,9	Não		Baixa	< 10
202	Pe 112	DE	66,7	F	2	9,00	2	N/D	Não	0,2	Sim	0,0	Baixa	N/D
203	Pe 113	DE	33,7	F	6	17,00	3	SC	Sim	14,9	Sim	5,4	Alta	N/D
204	Pe 114	DE	74,8	F	N/D	12,00	2	N/D	Não	76,4	Não		Baixa	< 10
205	Pe 115	DE	57,9	F	4	N/D	N/D	N/D	Não	4,1	Sim	0,0	Baixa	N/D

Continua

Paciente	Identificação	País	Idade (anos)	Sexo	Weiss	Tamanho (cm)	Estadiamento (ENSAT)	Síndrome hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)	Conclusão	
													Expressão proteica LIN28	Expressão proteica Kí67 (%)
206	Pe 116	DE	52,0	F	3	8,00	2	N/D	Não	0,5	Sim	0,0	Baixa	N/D
207	Pe 117	DE	53,6	F	7	11,50	2	NSC	Não	66,4	Sim	7,3	Baixa	40 a 49
208	Pe 118	DE	39,7	F	7	15,00	2	N/D	Não	0,5	Sim	0,0	Baixa	N/D
209	Pe 119	DE	67,8	M	6	6,00	2	NSC	Sim	5,8	Sim	0,9	Baixa	N/D
210	Pe 120	DE	72,2	F	5	18,00	3	N/D	Não	29,2	Não		Alta	N/D
211	Pe 121	DE	37,2	F	4	7,00	2	SC	Não	92,0	Não		Baixa	N/D
212	Pe 122	DE	55,0	F	8	13,00	4	SC	Sim	35,4	Sim	0,0	Baixa	N/D
213	Pe 123	DE	61,0	F	4	4,50	1	N/D	Sim	16,3	Sim	12,1	Baixa	N/D
214	Pe 124	DE	23,5	F	6	4,50	1	SC	Não	65,8	Não		N/D	10 a 19
215	Pe 125	DE	21,7	M	6	15,00	4	NSC	Sim	25,8	Sim	0,0	N/D	10 a 19
216	Pe 126	DE	40,0	M	6	12,50	4	NSC	Não	53,3	Sim	0,0	N/D	< 10
217	Pe 127	DE	49,4	M	N/D	14,00	2	N/D	Sim	18,1	Sim	4,4	N/D	N/D
218	Pe 128	DE	41,8	M	3	8,00	2	N/D	Não	60,0	Não		N/D	< 10
219	Pe 129	DE	44,5	F	7	13,50	2	NSC	Não	27,2	Não		N/D	10 a 19

Onde: Pe = Paciente externo; BR = Brasil; DE = Alemanha (*Deutschland, Germany*); M = Masculino; F = Feminino; N/D = não disponível;

SC = Secretor de cortisol; NSC = Não secretor de cortisol; C/V = Cushing + virilizante; C = Cushing puro; V = virilizante puro;

NF = não funcionante; C/V/E = Cushing + virilizante + produtor de estrógeno; HAP = Hiperaldosteronismo primário

8 REFERÊNCIAS

1. Bertherat J, Mosnier-Pudar H, Bertagna X. Adrenal incidentalomas. *Curr Opin Oncol*. 2002; 14(1):58-63.
2. Grumbach MM, Biller BM, Braunstein GD, Campbell KK, Carney JA, Godley PA, Harris EL, Lee JK, Oertel YC, Posner MC, Schlechte JA, Wieand HS. Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). *Ann Intern Med*. 2003; 138(5):424-9.
3. Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(5):1317-24.
4. Fassnacht M, Allolio B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009; 23(2):273-89.
5. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(7):2027-31.
6. 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; 86(10):4970-3.
7. Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(7):2650-5.
8. Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucskey P, Willenberg HS, Beuschlein F, Terzolo M, Mueller HH, Hahner S, Allolio B; German Adrenocortical Carcinoma Registry Group; European Network for the Study of Adrenal Tumors. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer*. 2009; 115(2):243-50.

9. Assié G, Antoni G, Tissier F, Caillou B, Abiven G, Gicquel C, Leboulleux S, Travagli JP, Dromain C, Bertagna X, Bertherat J, Schlumberger M, Baudin E. Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(1):148-54.
10. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 1984; 8(3):163-9.
11. Lau SK, Weiss LM. The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. *Hum Pathol.* 2009; 40(6):757-68.
12. Tissier F, Aubert S, Leteurtre E, Al Ghuzlan A, Patey M, Decaussin M, Doucet L, Gobet F, Hoang C, Mazerolles C, Monges G, Renaudin K, Sturm N, Trouette H, Vacher-Lavenu MC, Viallon V, Baudin E, Bertagna X, Coste J, Libe R. Adrenocortical tumors: improving the practice of the Weiss system through virtual microscopy: a National Program of the French Network INCa-COMETE. *Am J Surg Pathol.* 2012; 36(8):1194-201.
13. Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, Wemeau JL, Lecomte-Houcke M, Leteurtre E.. Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 2002 Dec;26(12):1612-9.
14. van't Sant HP, Bouvy ND, Kazemier G, Bonjer HJ, Hop WC, Feelders RA, de Herder WW, de Krijger RR. The prognostic value of two different histopathological scoring systems for adrenocortical carcinomas. *Histopathology.* 2007; 51(2):239-45.
15. 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; 27(7):867-81.
16. Almeida MQ, Latronico AC. The molecular pathogenesis of childhood adrenocortical tumors. *Horm Metab Res.* 2007; 39(6):461-6.
17. Faria AM, Almeida MQ. Differences in the molecular mechanisms of adrenocortical tumorigenesis between children and adults. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 351(1):52-7.
18. Fassnacht M, Libe R, Kroiss M, Allolio B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat Rev Endocrinol.* 2011; 7(6):323-35.

19. Haak HR, Hermans J, van de Velde CJ, Lentjes EG, Goslings BM, Fleuren GJ, Krans HM. Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients. *Br J Cancer*. 1994; 69(5):947-51.
20. Williamson SK, Lew D, Miller GJ, Balcerzak SP, Baker LH, Crawford ED. Phase II evaluation of cisplatin and etoposide followed by mitotane at disease progression in patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a Southwest Oncology Group Study. *Cancer*. 2000; 88(5):1159-65.
21. Baudin E, Pellegriti G, Bonnay M, Penfornis A, Laplanche A, Vassal G, Schlumberger M. Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma. *Cancer*. 2001; 92(6):1385-92.
22. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, Rossetto R, Buci L, Sperone P, Grossrubatscher E, Reimondo G, Bollito E, Papotti M, Saeger W, Hahner S, Koschker AC, Arvat E, Ambrosi B, Loli P, Lombardi G, Mannelli M, Bruzzi P, Mantero F, Allolio B, Dogliotti L, Berruti A. Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med*. 2007; 356(23):2372-80.
23. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. Update in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(12):4551-64.
24. Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B, Baudin E, Haak H, Berruti A, Welin S, Schade-Brittinger C, Lacroix A, Jarzab B, Sorbye H, Torpy DJ, Stepan V, Schteingart DE, Arlt W, Kroiss M, Leboulleux S, Sperone P, Sundin A, Hermsen I, Hahner S, Willenberg HS, Tabarin A, Quinkler M, de la Fouchardière C, Schlumberger M, Mantero F, Weismann D, Beuschlein F, Gelderblom H, Wilmink H, Sender M, Edgerly M, Kenn W, Fojo T, Müller HH, Skogseid B; FIRM-ACT Study Group. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med*. 2012; 366(23):2189-97.
25. Quinkler M, Hahner S, Wortmann S, Johanssen S, Adam P, Ritter C, Strasburger C, Allolio B, Fassnacht M. Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(6):2057-62.
26. Wortmann S, Quinkler M, Ritter C, Kroiss M, Johanssen S, Hahner S, Allolio B, Fassnacht M. Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2010; 162(2):349-56.
27. Fassnacht M, Kreissl MC, Weismann D, Allolio B. New targets and therapeutic approaches for endocrine malignancies. *Pharmacol Ther*. 2009; 123(1):117-41.

28. Berruti A, Ferrero A, Sperone P, Daffara F, Reimondo G, Papotti M, Dogliotti L, Angeli A, Terzolo M. Emerging drugs for adrenocortical carcinoma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2008; 13(3):497-509.
29. Kroiss M, Quinkler M, Johanssen S, van Erp NP, Lankheet N, Pollinger A, Laubner K, Strasburger CJ, Hahner S, Müller HH, Allolio B, Fassnacht M. Sunitinib in refractory adrenocortical carcinoma: a phase II, single-arm, open-label trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97(10):3495-503.
30. Fraenkel M, Gueorguiev M, Barak D, Salmon A, Grossman AB, Gross DJ. Everolimus therapy for progressive adrenocortical cancer. *Endocrine*. 2013; 44(1):187-92.
31. Macaulay VM, Middleton MR, Eckhardt SG, et al. Phase I study of OSI-906, dual tyrosine kinase inhibitor of insulin-like growth factor- 1 receptor (IGF-1R) and insulin receptor (IR) in combination with erlotinib (E) in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2010; 28(15):3016.
32. Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, Magarey CJ, Russell CF, Schulte KM, Röher HD, Delbridge L, Robinson BG. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(7):3467-74.
33. Kjellman M, Roshani L, Teh BT, Kallioniemi OP, Hoog A, Gray S, Farnebo LO, Holst M, Bäckdahl M, Larsson C. Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84(2):730-5.
34. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, Bertherat J, Chapuis Y, Duclos JM, Schlumberger M, Plouin PF, Lutton JP, Le Bouc Y. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2001; 61(18):6762-7.
35. DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*. 1991; 64(4):849-59.
36. Wiedemann HR, Burgio GR, Aldenhoff P, Kunze J, Kaufmann HJ, Schirg E. The proteus syndrome. Partial gigantism of the hands and/or feet, nevi, hemihypertrophy, subcutaneous tumors, macrocephaly or other skull anomalies and possible accelerated growth and visceral affections. *Eur J Pediatr*. 1983; 140(1):5-12.

37. Boulle N, Logie A, Gicquel C, Perin L, Le Bouc Y. Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(5):1713-20.
38. Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, Louvel A, Luton JP, Le Bouc Y. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(8):2559-65.
39. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, Costa MH, Lerario AM, Maciel CC, Mattos GE, Jorge AA, Mendonca BB, Latronico AC. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(9):3524-31.
40. Logie A, Boulle N, Gaston V, Perin L, Boudou P, Le Bouc Y, Gicquel C. Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line. *J Mol Endocrinol.* 1999; 23(1):23-32.
41. Wang Y, Sun Y. Insulin-like growth factor receptor-1 as an anti-cancer target: blocking transformation and inducing apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets.* 2002; 2(3):191-207.
42. Barlaskar FM, Spalding AC, Heaton JH, Kuick R, Kim AC, Thomas DG, Giordano TJ, Ben-Josef E, Hammer GD. Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(1):204-12.
43. Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci.* 2003; 94(3):225-9.
44. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagneré AM, René-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Bertherat J. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2005; 65(17):7622-7.
45. Tadjine M, Lampron A, Ouadi L, Bourdeau I. Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008; 68(2):264-70.

46. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Val P. Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(8):1561-76.
47. Gaujoux S, Grabar S, Fassnacht M, Ragazzon B, Launay P, Libé R, Chokri I, Audebourg A, Royer B, Sbiera S, Vacher-Lavenu MC, Dousset B, Bertagna X, Allolio B, Bertherat J, Tissier F. β -catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(2):328-36.
48. Heaton JH, Wood MA, Kim AC, Lima LO, Barlaskar FM, Almeida MQ, Fragoso MC, Kuick R, Lerario AM, Simon DP, Soares IC, Starnes E, Thomas DG, Latronico AC, Giordano TJ, Hammer GD. Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and beta-catenin. *Am J Pathol.* 2012; 181(3):1017-33.
49. Mermejo LM, Leal LF, Colli LM, Fragoso MC, Latronico AC, Tone LG, Scrideli CA, Tucci S, Martinelli CE, Yunes JA, Mastellaro MJ, Seidinger AL, Brandalise SR, Moreira AC, Ramalho LN, Antonini SR, Castro M. Altered expression of noncanonical Wnt pathway genes in paediatric and adult adrenocortical tumours. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014 Apr 10. [Epub ahead of print].
50. Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev.* 1997; 18(3):361-77.
51. Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP. Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology.* 2005 Mar;146(3):1018-24.
52. Schimmer BP, White PC. Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. *Mol Endocrinol.* 2010; 24(7):1322-37.
53. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, Zambetti G, DeLacerda L, Rodrigues GA, Haddad BR. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(2):615-9.
54. Almeida MQ, Soares IC, Ribeiro TC, Fragoso MC, Marins LV, Wakamatsu A, Ressio RA, Nishi MY, Jorge AA, Lerario AM, Alves VA, Mendonca BB, Latronico AC. Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(3):1458-62.

55. Sbiera S, Schmull S, Assie G, Voelker HU, Kraus L, Beyer M, Ragazzon B, Beuschlein F, Willenberg HS, Hahner S, Saeger W, Bertherat J, Allolio B, Fassnacht M. High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(10):E161-71.
56. 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. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol.* 2007; 21(12):2968-87.
57. Lichtenauer UD, Duchniewicz M, Kolanczyk M, Hoefflich A, Hahner S, Else T, Bicknell AB, Zemojtel T, Stallings NR, Schulte DM, Kamps MP, Hammer GD, Scheele JS, Beuschlein F. Pre-B-cell transcription factor 1 and steroidogenic factor 1 synergistically regulate adrenocortical growth and steroidogenesis. *Endocrinology.* 2007; 148(2):693-704.
58. Doghman M, Cazareth J, Douguet D, Madoux F, Hodder P, Lalli E. Inhibition of adrenocortical carcinoma cell proliferation by steroidogenic factor-1 inverse agonists. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(6):2178-83.
59. Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF, Jr., Li FP. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90(8):606-11.
60. Wagner J, Portwine C, Rabin K, Leclerc JM, Narod SA, Malkin D. High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86(22):1707-10.
61. Herrmann LJ, Heinze B, Fassnacht M, Willenberg HS, Quinkler M, Reisch N, Zink M, Allolio B, Hahner S. TP53 germline mutations in adult patients with adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(3):E476-85.
62. Raymond VM, Else T, Everett JN, Long JM, Gruber SB, Hammer GD. Prevalence of germline TP53 mutations in a prospective series of unselected patients with adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98(1):E119-25.
63. Ohgaki H, Kleihues P, Heitz PU. p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J Cancer.* 1993; 54(3):408-10.
64. Reincke M, Karl M, Travis WH, Mastorakos G, Allolio B, Linehan HM, Chrousos GP. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78(3):790-4.

65. Libè R, Groussin L, Tissier F, Elie C, Rene-Corail F, Fratticci A, Jullian E, Beck-Peccoz P, Bertagna X, Gicquel C, Bertherat J. Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(3):844-50.
66. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, Bertherat J, Bertagna X, Plouin PF, Baudin E, Berger F, Gicquel C, Chabre O, Feige JJ. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(3):1819-29.
67. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, Sanders D, Aljundi RT, Gauger PG, Thompson NW, Taylor JM, Hanash SM. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol.* 2003; 162(2):521-31.
68. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, Dousset B, Bertagna X, Clauser E, Bertherat J. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol.* 2009; 27(7):1108-15.
69. Giordano TJ, Kuick R, Else T, Gauger PG, Vinco M, Bauersfeld J, Sanders D, Thomas DG, Doherty G, Hammer G. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(2):668-76.
70. Szabo PM, Tamasi V, Molnar V, Andrasfalvy M, Tombol Z, Farkas R, Kövesdi K, Patócs A, Tóth M, Szalai C, Falus A, Rác K, Igaz P. Meta-analysis of adrenocortical tumour genomics data: novel pathogenic pathways revealed. *Oncogene.* 2010; 29(21):3163-72.
71. Santarpia L, Nicoloso M, Calin GA. MicroRNAs: a complex regulatory network drives the acquisition of malignant cell phenotype. *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17(1):F51-75.
72. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004; 5(7):522-31.
73. Singh P, Soon PS, Feige JJ, Chabre O, Zhao JT, Cherradi N, Lalli E, Sidhu SB. Dysregulation of microRNAs in adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 351(1):118-28.

74. Patterson EE, Holloway AK, Weng J, Fojo T, Kebebew E. MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer*. 2011; 117(8):1630-9.
75. Soon PS, Tacon LJ, Gill AJ, Bambach CP, Sywak MS, Campbell PR, Yeh MW, Wong SG, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, Sidhu SB. miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(24):7684-92.
76. Doghman M, El Wakil A, Cardinaud B, Thomas E, Wang J, Zhao W, Peralta-Del Valle MH, Figueiredo BC, Zambetti GP, Lalli E. Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2010; 70(11):4666-75.
77. Tömböl Z, Szabo PM, Molnar V, Wiener Z, Tolgyesi G, Horanyi J, Riesz P, Reismann P, Patócs A, Likó I, Gaillard RC, Falus A, Rácz K, Igaz P. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer*. 2009; 16(3):895-906.
78. Schmitz KJ, Helwig J, Bertram S, Sheu SY, Suttorp AC, Seggewiss J, Willscher E, Walz MK, Worm K, Schmid KW. Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. *J Clin Pathol*. 2011; 64(6):529-35.
79. Özata DM, Caramuta S, Velazquez-Fernandez D, Akcakaya P, Xie H, Hoog A, Zedenius J, Bäckdahl M, Larsson C, Lui WO. The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2011; 18(6):643-55.
80. Chabre O, Libe R, Assie G, Barreau O, Bertherat J, Bertagna X, Feige JJ, Cherradi N. Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. *Endocr Relat Cancer*. 2013; 20(4):579-94.
81. Patel D, Boufraqueh M, Jain M, Zhang L, He M, Gesuwan K, Gulati N, Nilubol N, Fojo T, Kebebew E. MiR-34a and miR-483-5p are candidate serum biomarkers for adrenocortical tumors. *Surgery*. 2013; 154(6):1224-8.
82. Szabo DR, Luconi M, Szabo PM, Toth M, Szucs N, Horanyi J, Nagy Z, Mannelli M, Patócs A, Rácz K, Igaz P. Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors. *Lab Invest*. 2014; 94(3):331-9.

83. Assie G, Letouze E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, Omeiri H, Rodriguez S, Perlemoine K, René-Corail F, Elarouci N, Sbiera S, Kroiss M, Allolio B, Waldmann J, Quinkler M, Mannelli M, Mantero F, Papathomas T, De Krijger R, Tabarin A, Kerlan V, Baudin E, Tissier F, Dousset B, Groussin L, Amar L, Clauser E, Bertagna X, Ragazzon B, Beuschlein F, Libé R, de Reyniès A, Bertherat J. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet.* 2014; 46(6):607-12.
84. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature.* 2011; 469(7330):314-22.
85. Kim AC, Barlaskar FM, Heaton JH, Else T, Kelly VR, Krill KT, Scheys JO, Simon DP, Trovato A, Yang WH, Hammer GD. In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocr Rev.* 2009; 30(3):241-63.
86. Ching S, Vilain E. Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia. *Genesis.* 2009; 47(9):628-37.
87. Huang CC, Miyagawa S, Matsumaru D, Parker KL, Yao HH. Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog. *Endocrinology.* 2010; 151(3):1119-28.
88. Yamanaka S. Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008; 363(1500):2079-87.
89. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007; 1(1):39-49.
90. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282(5391):1145-7.
91. Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science.* 2008; 320(5872):97-100.
92. Viswanathan SR, Daley GQ. Lin28: A microRNA regulator with a macro role. *Cell.* 2010; 140(4):445-9.
93. Ambros V, Horvitz HR. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 1984; 226(4673):409-16.
94. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet.* 2008; 40(5):499-507.

95. Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell*. 2008; 32(2):276-84.
96. Newman MA, Thomson JM, Hammond SM. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA*. 2008; 14(8):1539-49.
97. Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, Nitsch R, Wulczyn FG. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol*. 2008; 10(8):987-93.
98. Piskounova E, Viswanathan SR, Janas M, LaPierre RJ, Daley GQ, Sliz P, Gregory RI. Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28. *J Biol Chem*. 2008; 283(31):21310-4.
99. Zhong X, Li N, Liang S, Huang Q, Coukos G, Zhang L. Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. *J Biol Chem*. 2010; 285(53):41961-71.
100. Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ. Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell*. 2008; 135(2):227-39.
101. Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev*. 2006; 20(16):2202-7.
102. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 2007; 131(6):1109-23.
103. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet*. 2007; 39(5):673-7.
104. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*. 2008; 18(10):505-16.
105. Polesskaya A, Cuvellier S, Naguibneva I, Duquet A, Moss EG, Harel-Bellan A. Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes Dev*. 2007; 21(9):1125-38.

106. Xu B, Zhang K, Huang Y. Lin28 modulates cell growth and associates with a subset of cell cycle regulator mRNAs in mouse embryonic stem cells. *RNA*. 2009; 15(3):357-61.
107. Qiu C, Ma Y, Wang J, Peng S, Huang Y. Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38(4):1240-8.
108. Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S, O'Sullivan M, Lu J, Phillips LA, Lockhart VL, Shah SP, Tanwar PS, Mermel CH, Beroukhi R, Azam M, Teixeira J, Meyerson M, Hughes TP, Llovet JM, Radich J, Mullighan CG, Golub TR, Sorensen PH, Daley GQ. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet*. 2009; 41(7):843-8.
109. Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, Trang P, Roush S, Boehm M, Gillespie E, Slack FJ. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res*. 2007; 67(23):11111-6.
110. Jeong SH, Wu HG, Park WY. LIN28B confers radio-resistance through the posttranscriptional control of KRAS. *Exp Mol Med*. 2009; 41(12):912-8.
111. Chang TC, Zeitels LR, Hwang HW, Chivukula RR, Wentzel EA, Dews M, Jung J, Gao P, Dang CV, Beer MA, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(9):3384-9.
112. Dangi-Garimella S, Yun J, Eves EM, Newman M, Erkeland SJ, Hammond SM, Minn AJ, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *Embo J*. 2009; 28(4):347-58.
113. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*. 2008; 40(1):43-50.
114. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435(7043):834-8.
115. Lu L, Katsaros D, Shaverdashvili K, Qian B, Wu Y, de la Longrais IA, de la Longrais IA, Preti M, Menato G, Yu H. Pluripotent factor lin-28 and its homologue lin-28b in epithelial ovarian cancer and their associations with disease outcomes and expression of let-7a and IGF-II. *Eur J Cancer*. 2009; 45(12):2212-8.

116. Wang YC, Chen YL, Yuan RH, Pan HW, Yang WC, Hsu HC, Jeng YM. Lin-28B expression promotes transformation and invasion in human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2010; 31(9):1516-22.
117. Alajezi NM, Shi W, Wong D, Lenarduzzi M, Waldron J, Weinreb I, Liu FF. Lin28b promotes head and neck cancer progression via modulation of the insulin-like growth factor survival pathway. *Oncotarget*. 2012; 3(12):1641-52.
118. West JA, Viswanathan SR, Yabuuchi A, Cunniff K, Takeuchi A, Park IH, Sero JE, Zhu H, Perez-Atayde A, Frazier AL, Surani MA, Daley GQ. A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature*. 2009; 460(7257):909-13.
119. Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CA, Saldanha LB, Latronico AC, Zerbini C, Zerbini C, Madureira G, Domenice S, Albergaria MA, Camargo MH, et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol*. 1995; 154(6):2004-9.
120. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G, Kirschner MA. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer*. 2000; 88(4):711-36.
121. Shi SR, Key ME, Kalra KL. 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*. 1991; 39(6):741-8.
122. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC; IALT Bio Investigators. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006; 355(10):983-91.
123. 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; 25(4):402-8.
124. Zhou J, Ng SB, Chng WJ. LIN28/LIN28B: an emerging oncogenic driver in cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013; 45(5):973-8.

125. Yang X, Lin X, Zhong X, Kaur S, Li N, Liang S, Lassus H, Wang L, Katsaros D, Montone K, Zhao X, Zhang Y, Bützow R, Coukos G, Zhang L. Double-negative feedback loop between reprogramming factor LIN28 and microRNA let-7 regulates aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010; 70(22):9463-72.
126. Piskounova E, Polytarchou C, Thornton JE, LaPierre RJ, Pothoulakis C, Hagan JP, Iliopoulos D, Gregory RI. Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell.* 2011; 147(5):1066-79.
127. Haluska P, Worden F, Olmos D, Yin D, Schteingart D, Batzel GN, Paccagnella ML, de Bono JS, Gualberto A, Hammer GD. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010; 65(4):765-73.
128. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell.* 2009; 139(4):693-706.
129. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(28):7212-20.
130. Krupp M, Itzel T, Maass T, Hildebrandt A, Galle PR, Teufel A. CellLineNavigator: a workbench for cancer cell line analysis. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(Database issue):D942-8.
131. Santarpia L, Nicoloso M, Calin GA. MicroRNAs: a complex regulatory network drives the acquisition of malignant cell phenotype. *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17(1):F51-75.
132. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, Teruya-Feldstein J, Reinhardt F, Onder TT, Valastyan S, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J, Weinberg RA. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(3):247-56.
133. Sun Z, Han Q, Zhou N, Wang S, Lu S, Bai C, Zhao RC. MicroRNA-9 enhances migration and invasion through KLF17 in hepatocellular carcinoma. *Mol Oncol.* 2013; 7(5):884-94.

134. Chen P, Price C, Li Z, Li Y, Cao D, Wiley A, He C, Gurbuxani S, Kunjamma RB, Huang H, Jiang X, Arnovitz S, Xu M, Hong GM, Elkahoul AG, Neilly MB, Wunderlich M, Larson RA, Le Beau MM, Mulloy JC, Liu PP, Rowley JD, Chen J. miR-9 is an essential oncogenic microRNA specifically overexpressed in mixed lineage leukemia-rearranged leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(28):11511-6.
135. Tang H, Yao L, Tao X, Yu Y, Chen M, Zhang R, Xu C. miR-9 functions as a tumor suppressor in ovarian serous carcinoma by targeting TLN1. *Int J Mol Med*. 2013; 32(2):381-8.
136. Zheng L, Qi T, Yang D, Qi M, Li D, Xiang X, Huang K, Tong Q. microRNA-9 suppresses the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer cells through targeting cyclin D1 and Ets1. *PLoS One*. 2013; 8(1):e55719.
137. Gupta D, Shidham V, Holden J, Layfield L. Value of topoisomerase II alpha, MIB-1, p53, E-cadherin, retinoblastoma gene protein product, and HER-2/neu immunohistochemical expression for the prediction of biologic behavior in adrenocortical neoplasms. *Mol Morphol*. 2001; 9(3):215-21.
138. Zhuang G, Wu X, Jiang Z, Kasman I, Yao J, Guan Y, Oeh J, Modrusan Z, Bais C, Sampath D, Ferrara N. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *Embo J*. 2012; 31(17):3513-23.
139. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patack AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, Hodges MR. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med*. 2013; 368(18):1685-94.

9 APÊNDICES

Apêndice A - Estadiamento ENSAT para carcinoma adrenocortical

Estádio	Estadiamento tumoral ENSAT 2008
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
III	T1-2, N1, M0 T3-4, N0, M0
IV	T1-4, N0-1, M1

T1, tamanho tumoral ≤ 5 cm; T2, tamanho tumoral ≥ 5 cm; T3, infiltração tumoral em tecido circundante; T4, invasão tumoral em órgãos adjacentes ou trombo tumoral em veia cava ou veia renal. N0, sem linfonodos positivos; N1, presença de linfonodo(s) acometido(s); M0, sem metástases; M1, presença de metástases à distância; Abreviações: ENSAT: *European Network for the Study of Adrenal Tumors*; M, metástases; N, linfonodo; T, tumor.

Fonte: Fassnacht *et al.*⁸

Apêndice B - Critérios histopatológicos propostos por Weiss em 1984

Atipia nuclear
Mitoses atípicas
Número de mitoses (> 5/50 CGA)
Células claras < 25%
Arquitetura difusa > 33%
Necrose
Invasão venosa
Invasão de sinusoides
Invasão capsular

Nota: Um escore de 3 ou mais se correlaciona com comportamento maligno subsequente.

Fonte: *Weiss*¹¹

Apêndice C - Sistema de Weiss modificado

Número de mitoses (> 5/50 CGA)
Células claras < 25%
Mitoses atípicas
Necrose
Invasão capsular

Nota: Sistema de Weiss modificado: 2 x índice mitótico + 2 x células claras < 25% + mitoses atípicas + necrose + invasão capsular.

Um escore de 3 ou mais se correlaciona com comportamento maligno subsequente.

Fonte: Aubert *et al.*¹³.

Apêndice D - Artigo 1 - Publicado

Molecular and Cellular Endocrinology 351 (2012) 52–57

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Review

Differences in the molecular mechanisms of adrenocortical tumorigenesis between children and adults

André M. Faria^a, Madson Q. Almeida^{a,b,*}

^a Unidade de Suprarrenal e Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM-42, Hospital das Clínicas e, Brazil
^b Instituto do Câncer (ICESP), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 14 October 2011

Keywords:
Adrenocortical tumors
Children
p53
IGF2
IGF1R
SF1

ABSTRACT

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare malignancy with poor prognosis. The incidence of pediatric adrenocortical tumors (ACT) is remarkably high in Southern Brazil, where it is estimated to be 15 times greater than the world occurrence, due to a high frequency of a germline mutation (p.R337H) of the *TP53* gene. Differently from adults, pediatric adrenocortical neoplasms with apparently poor prognosis based on histopathological features have often a good clinical outcome. A high Weiss score is definitely not a good predictor of survival in children, but it is much more discriminative of a poor outcome in adult tumors. Besides important differences in prognosis, adrenocortical tumorigenesis has distinct patterns between children and adults. In this review, we summarize recent data from ours and other Institutions, showing that the prognostic importance of molecular markers is striking different between pediatric and adult ACT. Although the majority of pediatric ACT are associated with p.R337H germline mutation, it is not a predictor of poor outcome in children and adolescents with ACT. On the other side, *TP53* somatic mutations define a subgroup of adult ACC with different tumorigenesis and unfavorable prognosis. *IGF* system has a central role in the malignant phenotype of ACT, but in adult tumors it is mediated by *IGF2* over-expression and in pediatric tumors by *IGF1R* over-expression. Finally, *SF1* over-expression is associated with decreased overall survival and recurrence-free survival in adult ACC, but not in the pediatric group. In conclusion, discriminating benign and malignant behavior is more challenging in pediatric ACT than in adult tumors.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	52
2. Clinicopathological aspects and outcome of pediatric and adult adrenocortical tumors	53
3. Molecular pathogenesis of adrenocortical tumors	53
3.1. <i>TP53</i> gene and 17p13 locus	53
3.2. <i>IGF2</i> and its receptor (<i>IGF1R</i>)	54
3.3. Steroidogenic factor 1 (<i>SF1</i>)	55
4. Concluding remarks and perspectives	56
References	56

1. Introduction

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare malignancy, that accounts for only 0.05–0.2% of all human cancers, with an estimated incidence of 0.5–2 per million per year in adults (Allolio

and Fassnacht, 2006). In children, the frequency is even smaller, with only about 25 new cases of ACC being diagnosed in the USA each year. Nevertheless, the incidence of pediatric adrenocortical tumors (ACT) is remarkably high in Southern Brazil, where it is estimated to be 15 times greater than the world occurrence, due to a high frequency of a germline mutation (p.R337H) of the *P53* tumor suppressor gene (Latronico et al., 2001; Ribeiro et al., 2001; Sandrini et al., 1997). Beyond the age of onset, pediatric ACT differ from adult tumors in many other ways (Almeida and Latronico, 2007).

* Corresponding author. Address: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 2º andar, Bloco 6, São Paulo, SP 05403-900, Brazil. Tel.: +55 11 3069 7512; fax: +55 11 3069 7519.

E-mail address: madsonalmeida@usp.br (M.Q. Almeida).

Differently from adults, pediatric adrenocortical neoplasms with apparently poor prognosis based on histopathological features have often a favorable clinical outcome (Mendonça et al., 1995; Wieneke et al., 2003). To date, few molecular markers are helpful to predict poor prognosis in children with ACT (Allolio and Fassnacht, 2006; Almeida et al., 2008; Almeida and Latronico, 2007). In the last decade, considerable advances toward understanding the molecular mechanisms of adrenocortical tumorigenesis have mainly been made in ACT of adults from distinct ethnicities (de Fraipont et al., 2005; de Reynies et al., 2009; Gicquel et al., 1997; Giordano et al., 2009, 2003; Tissier et al., 2005). Some of these studies have recently inspired the molecular analysis of ACT of children and adolescents, most of them from Brazilian origin (Almeida et al., 2008, 2010; Figueiredo et al., 2005; Latronico et al., 2001; Ribeiro et al., 2001; West et al., 2007).

2. Clinicopathological aspects and outcome of pediatric and adult adrenocortical tumors

Approximately 60% of children with ACT are diagnosed before 4 years old (Michalkiewicz et al., 2004). At presentation, virilization is the most common syndrome in children with ACT. Isolated signs of Cushing syndrome are infrequent, occurring most often in combination with signs of increased androgen secretion (Sandrini et al., 1997). In adults, ACT are classically diagnosed under two circumstances: first, in symptomatic patients with steroid excess (Cushing syndrome, Conn syndrome or hyperandrogenism in women) or with symptoms related to the tumor mass; second, and more frequently, they are discovered as incidentalomas (Allolio and Fassnacht, 2006; Latronico and Chrousos, 1997).

The early manifestations of the disease (12% of the cases are diagnosed during the first year of life), the reports of ACT diagnosed during the neonatal period and the predominance of virilizing tumors suggest that pediatric adrenocortical neoplasms may arise from the fetal zone of the fetal adrenal cortex (Ishimoto and Jaffe, 2011; Michalkiewicz et al., 2004). The fetal adrenal gland rapidly grows through cell proliferation and angiogenesis at the gland periphery, cell migration, hypertrophy, and apoptosis. In terms of steroidogenesis, the fetal adrenal cortex is characterized by extensive production of dehydroepiandrosterone and its sulfate. Soon after birth, fetal zone undergoes a rapid involution, with a decrease in androgen secretion. After fetal zone regression, adult definitive zones will be most probably originated from the definitive zone of the fetal adrenal (Ishimoto and Jaffe, 2011).

The pathological diagnosis of ACT should be performed by an experienced pathologist (Allolio and Fassnacht, 2006). Differentiation between benign and malignant adrenal lesions is based on macroscopic features (tumor weight, hemorrhage, breached or intact tumor capsule) and microscopic diagnostic criteria with the Weiss score, the most widely used tool (Aubert et al., 2002; Lau and Weiss, 2009; Weiss, 1984). Nuclear atypia, atypical and frequent mitoses (more than five of 50 high-power fields), vascular and capsular invasion, and necroses are suggestive of malignancy in adult ACT (Allolio and Fassnacht, 2006; Fassnacht et al., 2009).

Since 1995, Mendonça and others have reported that children with ACT have a more favorable outcome than adults and Weiss score is not a good predictor of prognosis in the pediatric group (Mendonça et al., 1995; Sandrini et al., 1997; Wajchenberg et al., 2000). This observation has been confirmed in a large clinicopathologic analysis of 83 children with ACT, where 69% of patients with apparently poor prognosis based on the histopathological features had a favorable outcome (Wieneke et al., 2003). Based on these evidence, pediatric ACT were then classified as clinically benign or clinically malignant tumors. In addition, vena cava invasion, necrosis and increased mitotic activity (>15 mitotic figures/20 high

power fields) independently suggested malignant clinical behavior in multivariate analysis (Wieneke et al., 2003).

In adult patients, the prognostic parameters associated with shorter survival were older age at diagnosis, cortisol hypersecretion and initial stage III or IV (Abiven et al., 2006). Data from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry demonstrated that patients with localized disease, age between 0 and 3 years, virilization alone, disease stage I, absence of spillage during surgery, and tumor weight <200 g were associated with a greater probability of disease-free survival (Michalkiewicz et al., 2004).

The outcome analysis of patients with ACT from our Institution according to the Weiss criteria illustrates an obvious difference between children and adults (Fig. 1). A high Weiss score (≥ 3) was definitely not a good predictor of survival in children, whereas it was much more discriminative of a poor outcome in adult tumors. A Weiss score ≤ 2 was useful to exclude high-risk tumors, but it represented a smaller subgroup of tumors in children. Due to the limitations of histopathological parameters to define high-risk pediatric ACT, we do not recommend the use of Weiss score to define pediatric adrenocortical adenomas and carcinomas. We, therefore, consider that it is more appropriated to employ the terms clinically benign and clinically malignant (associated with local invasion, recurrence and/or metastases) to classify ACT in the pediatric group, as suggested by Wieneke et al., 2003.

3. Molecular pathogenesis of adrenocortical tumors

There are currently few therapeutic options for patients with adrenocortical cancer, and new insights into the pathogenesis of this lethal disease are urgently needed (Allolio and Fassnacht, 2006; Fassnacht and Allolio, 2009). The study of rare genetic syndromes associated with ACT has greatly contributed to the elucidation of sporadic adrenocortical tumorigenesis. Pediatric ACTs are more frequently associated with Li Fraumeni, Li Fraumeni-like and Beckwith-Wiedemann syndromes. Besides important differences in prognosis, adrenocortical tumorigenesis has distinct patterns between children and adults.

3.1. TP53 gene and 17p13 locus

p53 function is almost always compromised in tumor cells, usually as a result of somatic mutations, which occur in approximately half of all human cancers and constitute a cornerstone in tumorigenesis (Brosh and Rotter, 2009; Vogelstein et al., 2000). The frequencies of reported TP53 mutations vary considerably between cancer types, ranging from ~10% in haematopoietic malignancies (Peller and Rotter, 2003) to 50–70% in ovarian (Schuijjer and Berns, 2003), colorectal (Iacopetta, 2003) and head and neck (Blons and Laurent-Puig, 2003) cancers.

Whereas somatic TP53 mutations contribute to sporadic cancer, germline TP53 mutations cause a rare type of cancer predisposition known as Li-Fraumeni syndrome (LFS). This rare familial cancer syndrome is characterized by a high incidence of sarcoma diagnosed early in life and at least two first-degree relatives with cancer occurring before the age of 45 years, such as breast cancer and other diverse neoplasms, particularly brain tumors, leukemia and adrenocortical carcinomas (Malkin et al., 1990).

In Southern Brazil, a recurrent TP53 germline mutation, p.R337H, was detected in families with cancer predisposition (Achatz et al., 2007; Garritano et al., 2010; Palmero et al., 2008). This germline mutation was first identified in 98% of unrelated children with ACT originated from Southern Brazil (Ribeiro et al., 2001). The p.R337H mutation was also present in 78% of children with sporadic ACT in another Brazilian series (Latronico et al.,

Fig. 1. Survival analysis of children (A) and adults (B) with adrenocortical tumors according to Weiss score treated at the Clinics Hospital, University of São Paulo School of Medicine. A Weiss score was a predictor of poor outcome only in adult adrenocortical tumors. *Log-rank test. ACT, adrenocortical tumors.

Table 1
TP53 mutations in pediatric and adult adrenocortical tumors.

	TP53 mutation	n
Children		
Varley et al. (1999)	Somatic p.R337H	1/14 (7%)
	Germline p.P152L	6/14 (43%)
	Germline p.R158H	3/14 (21%)
Chompret et al. (2000)	Germline p.R337H, R273L	2 Cases
Ribeiro et al. (2001)	Germline p.R337H	35/36 (98%)
Latronico et al. (2001)	Germline p.R337H	21/27 (78%)
West et al. (2006)	Germline p.R175L	1 Case
Adults		
Reincke et al. (1994)	Somatic	0/5 ACA 3/16 ACC (19%)
Latronico et al. (2001)	Germline p.R337H	6 (3 ACA; 3 ACC) 46 (13%)
Ragazzon et al. (2010)	Somatic	9/51 ACC (17.6%) Poor outcome

ACA, adenomas; ACC, carcinomas.

2001) (Table 1). Furthermore, the p.R337H mutation was not restricted to the pediatric group, as it was also found in 13% of adult patients with ACT (Latronico et al., 2001). More recently, P53 mutations were also screened in 45 Brazilian unrelated individuals with family histories fulfilling the clinical definitions of Li-Fraumeni-like syndrome (Achatz et al., 2007). The germline p.R337H mutation was found in 46% of the patients harboring TP53 mutations, and was associated with a wide spectrum of tumors, including breast cancers (30%), brain cancers (11%), soft tissue sarcomas (10.7%) and adrenocortical tumors (8.9%) (Achatz et al., 2007). The p.R337H mutation has been originated in the Brazilian population through a founder effect (Garritano et al., 2010; Pinto et al., 2004).

Although the majority of pediatric ACT are associated with p.R337H germline mutation, this mutation was not a predictor of outcome in children and adolescents with ACT (Latronico et al., 2001; Pinto et al., 2005). However, we should also emphasize that not all TP53 mutations are functionally equivalent and different TP53 mutations may have different influence on the clinical outcome of pediatric ACT (West et al., 2006). On the other hand, TP53 mutations are mostly somatic in adult ACT and represent a

later step in tumorigenesis (Gicquel et al., 2001; Ragazzon et al., 2010; Reincke et al., 1994) (Table 1). TP53 somatic mutations defined a subgroup of ACC with different tumorigenesis and poor outcome (Ragazzon et al., 2010).

17p13 loss of heterozygosity was a prognostic marker of poor outcome in adults with ACT (Gicquel et al., 2001). 17p13 LOH was demonstrated in 30% of ACA and in 80% of ACC, and it was independently associated with recurrence in the multivariate analysis (Gicquel et al., 2001). Interestingly, 17p13 LOH did not always correlate with the presence of TP53 mutation (Libe et al., 2007). Differently from adults, 17p13 LOH was not associated with poor prognosis in pediatric ACT (Pinto et al., 2005).

3.2. IGF2 and its receptor (IGF1R)

The IGF signaling pathway has many important roles in normal cell growth and development (Samani et al., 2007). All of the components of the IGF system (IGFs, receptors, and binding proteins) are expressed by human fetal adrenals (Ilvesmaki et al., 1993). The IGF2 gene, which is located on chromosome 11p15, encodes a fetal growth factor that is expressed exclusively from the paternally inherited allele. Genetic or epigenetic defects in the imprinted 11p15 region can increase IGF2 expression. Structural abnormalities at the 11p15 locus, particularly uniparental paternal isodisomy, were initially described in 37% of adults with sporadic ACT (Gicquel et al., 1994). In a large adult series of 82 ACT, abnormalities of the 11p15 region and/or IGF2 gene over-expression were demonstrated in 93% of malignant tumors and in only 9% of benign tumors (Gicquel et al., 1997). Genome profiling analysis identified IGF2 up-regulation as a relevant alteration in adult ACC (de Fraipont et al., 2005; Giordano et al., 2003).

In contrast to adult tumors, IGF2 was over-expressed in both clinically benign and malignant pediatric ACT (Almeida et al., 2008; West et al., 2007; Wilkin et al., 2000). IGF2 exerts its mitogenic effects through interaction with IGF1 receptor (IGF1R) (Logie et al., 1999). Thus, over-expression of IGF2 and/or IGF1R may trigger a cascade of molecular events that can ultimately lead to malignancy (Samani et al., 2007). We previously demonstrated an over-expression (>2-fold increase) of IGF1R gene in pediatric

ACT (Almeida et al., 2008). *IGF1R* over-expression was significantly correlated with malignant behavior in children. These findings suggest that the IGF system has a central role in the malignant phenotype of ACT, but in adult tumors it is mediated by *IGF2* over-expression and in pediatric tumors by *IGF1R* over-expression. Therefore, *IGF1R* is a potential prognostic marker for children with ACT. Additionally, a selective *IGF-1R* kinase inhibitor had anti-tumor effects *in vitro* (Almeida et al., 2008). *IGF1R* inhibition blocked cell proliferation in a dose and time-dependent manner through a significant increase of apoptosis in NCIH295 cells and in a pediatric ACT cell line (Almeida et al., 2008). Another study demonstrated that *IGF1R* inhibition also reduced tumor growth *in vivo*, and the combination with mitotane significantly enhanced tumor growth suppression (Bartalack et al., 2009). *IGF1R* targeting therapies are now being evaluated in adult ACC (Haluska et al., 2010). Because of the importance of *IGF1R* over-expression in the molecular pathogenesis of pediatric ACT, clinical trials with *IGF1R* targeting therapies are also being considered for children with metastatic ACT.

More recently, Doghman and colleagues confirmed *IGF1R* over-expression in pediatric ACT and showed that mTOR signaling was activated in these tumors (Doghman et al., 2010). The microRNAs mir-99a and mir-100 were among the most down-regulated microRNAs in pediatric tumors when compared to normal adrenals (Doghman et al., 2010). Downregulation of mir100 in adrenocorti-

cal cancer cells promoted a significant increase in *IGF1R* expression, showing that mir100 downregulation is one of the mechanisms to explain *IGF1R* over-expression in pediatric ACT.

3.3. Steroidogenic factor 1 (*SF1*)

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 (Parker and Schimmer, 1997). *SF-1* maps to 9q33.3, a chromosomal region associated with amplification in pediatric adrenocortical tumors (Figueiredo et al., 1999). *SF-1* dosage regulated compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy in mice (Beuschlein et al., 2002). Furthermore, increased *SF-1* dosage promoted cell proliferation and triggers tumorigenesis in mice (Doghman et al., 2007).

An increased *SF-1* copy number was detected in 8 out of 9 ACT diagnosed in Brazilian children using fluorescence *in situ* hybridization, suggesting an association between *SF-1* gene amplification and pediatric adrenocortical tumorigenesis (Figueiredo et al., 2005). Recently, we assessed *SF-1* staining in a cohort of 103 ACT from 36 children and 67 adults, and analyzed gene amplification in 38 tumors (Almeida et al., 2010) (Fig. 2). *SF1* amplification was

Fig. 2. A pediatric adrenocortical tumor with a benign evolution displaying *SF1* over-expression (A) and gene amplification (B). ACT, adrenocortical tumor.

Table 2
Prognostic importance of molecular markers in pediatric and adult adrenocortical tumors.

Markers	Children ACT	Adult ACT
Weiss score ≥ 3	No	Yes
Ki67	No	Yes
TP53 mutations	No (germline p.R337H)	Yes (somatic P53 mutations)
17p13 LOH	No	Yes
IGF2 over-expression	No	Yes
11p15 LOH	No	Yes
IGF1R over-expression	Yes	No
SF1 amplification	No	No
SF1 over-expression	No	Yes
DGL7–PINK1 expression	NA	Yes
BUB1B–PINK1 expression	NA	Yes

ACT, adrenocortical tumors; LOH, loss of heterozygosity; NA, not available.

analyzed by multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) and real-time PCR. Increased SF1 copy number was identified in 47% of pediatric ACT and in only 10% of adult tumors. The frequency of SF1 gene amplification was similar in clinically benign and malignant pediatric ACT. A strong nuclear SF1 expression was detected in 56% of the pediatric and in 19% of adult ACT. SF1 expression was also not correlated with functional status of adrenocortical tumors, supporting the concept that in adrenal tumor cells SF1 functions are more related to modulation of cell proliferation and apoptosis than to steroidogenesis (Doghman et al., 2007). Interestingly, a strong SF1 staining was also identified in 29% of pediatric ACT without SF1 amplification, indicating that additional mechanisms other than gene amplification can increase SF1 expression.

In a recent study, strong SF1 protein expression significantly correlated with poor clinical outcome in a very expressive cohort of adult ACC (Sbiera et al., 2010). In contrast to children, adult patients with ACC and a strong SF1 expression had a significant decrease in overall survival and recurrence-free survival. Since the frequency of SF1 gene amplification in adult ACC is very low (Almeida et al., 2010), SF1 over-expression in this context might be caused by other mechanisms, such as transcriptional regulation or post-translational modifications.

4. Concluding remarks and perspectives

Discriminating benign and malignant behavior is more challenging in pediatric ACT than in adult tumors. In contrast to adults, prognostic factors are not well established in children with ACT (Table 2). Transcriptome analysis has already identified relevant transcriptome differences not only between adenoma and carcinoma but also between two sets of carcinoma in adult individuals with very different outcomes (de Reynies et al., 2009). However, the only reported transcriptome study of pediatric ACT did not discriminate malignant behavior using unsupervised clustering methods (West et al., 2007). Therefore, additional transcriptome studies of pediatric ACT are needed to provide a better understanding of the mechanisms of tumorigenesis. We believe that further information should come from the integration of transcriptomes and deep-sequencing of pediatric ACT, providing novel molecular therapeutic targets and predictors of poor outcome, which can help fully help in the selection of high-risk pediatric ACT.

References

- Abiven, G., Coste, J., Groussin, L., Anract, P., Tissier, F., Legmann, P., Dousset, B., Bertagna, X., Bertherat, J., 2006. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 2650–2655.
- Achatz, M.L., Olivier, M., Calvez, F.L., Martel-Planche, G., Lopes, A., Rossi, B.M., Ashton-Prolla, P., Giughiani, R., Palmero, E.I., Vargas, F.R., Rocha, J.C., Vettore, A.L., Hainaut, 2007. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett.* 245, 96–102.
- Allolio, B., Fassnacht, M., 2006. Clinical review: adrenocortical carcinoma: clinical update. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 2027–2037.
- Almeida, M.Q., Latronico, A.C., 2007. The molecular pathogenesis of childhood adrenocortical tumors. *Horm. Metab. Res.* 39, 461–466.
- Almeida, M.Q., Fragoso, M.C., Loffi, C.F., Santos, M.G., Nishi, M.Y., Costa, M.H., Lerario, A.M., Maciel, C.C., Mattos, G.E., Jorge, A.A., Mendonça, B.B., Latronico, A.C., 2008. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 3524–3531.
- Almeida, M.Q., Soares, I.C., Ribeiro, T.C., Fragoso, M.C., Marins, L.V., Wakamatsu, A., Ressio, R.A., Nishi, M.Y., Jorge, A.A., Lerario, A.M., Alves, V.A., Mendonça, B.B., Latronico, A.C., 2010. Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 1458–1462.
- Aubert, S., Wacrenier, A., Leroy, X., Devos, P., Carnaille, B., Proye, C., Wemeau, J.L., Lecomte-Houcke, M., Lecomte, E., 2002. Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 26, 1612–1619.
- Barlaskar, F.M., Spalding, A.C., Heaton, J.H., Kuick, R., Kim, A.C., Thomas, D.G., Giordano, T.J., Ben-Josef, E., Hammer, G.D., 2009. Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 204–212.
- Beuschlein, F., Mutch, C., Bavers, D.L., Ulrich-Lai, Y.M., Engeland, W.C., Keegan, C., Hammer, G.D., 2002. Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology* 143, 3122–3135.
- Blons, H., Laurent-Puig, P., 2003. TP53 and head and neck neoplasms. *Hum. Mutat.* 21, 252–257.
- Brosh, R., Rotter, V., 2009. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* 9, 701–713.
- Chompret, A., Brugieres, L., Ronsin, M., Gardes, M., Dessarps-Freichay, F., Abel, A., Hua, D., Ligot, L., Dondon, M.G., Bressac-de Paillerets, B., Frebourg, T., Lemerle, J., Bonati-Pellie, C., Feunteun, J., 2000. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *Br. J. Cancer* 82, 1932–1937.
- de Fraipont, F., El Atifi, M., Cherradi, N., Le Moigne, G., Defaye, G., Houlgatte, R., Bertherat, J., Bertagna, X., Plouin, P.F., Baudin, E., Berger, F., Gicquel, C., Chabre, O., Feige, J.J., 2005. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 1819–1829.
- de Reynies, A., Assie, G., Rickman, D.S., Tissier, F., Groussin, L., Rene-Corail, F., Dousset, B., Bertagna, X., Clauser, E., Bertherat, J., 2009. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J. Clin. Oncol.* 27, 1108–1115.
- Doghman, M., Karpova, T., Rodrigues, G.A., Arhatte, M., De Moura, J., Cavalli, L.R., Virolle, V., Barbry, P., Zambetti, G.P., Figueiredo, B.C., Hecker, L.L., Lalli, E., 2007. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol. Endocrinol.* 21, 2968–2987.
- Doghman, M., El Wakil, A., Cardinaud, B., Thomas, E., Wang, J., Zhao, W., Peralta-Del Valle, M.H., Figueiredo, B.C., Zambetti, G.P., Lalli, E., 2010. Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 70, 4666–4675.
- Fassnacht, M., Allolio, B., 2009. Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 23, 273–289.
- Fassnacht, M., Johansen, S., Quinkler, M., Bucsik, P., Willenberg, H.S., Beuschlein, F., Terzolo, M., Mueller, H.H., Hahner, S., Allolio, B., 2009. Limited prognostic value of the 2004 International Union against cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer* 115, 243–250.
- Figueiredo, B.C., Stratakis, C.A., Sandrini, R., Delacerda, L., Pianovsky, M.A., Giatzakis, C., Young, H.M., Haddad, B.R., 1999. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1116–1121.
- Figueiredo, B.C., Cavalli, L.R., Pianovsky, M.A., Lalli, E., Sandrini, R., Ribeiro, R.C., Zambetti, G., Delacerda, L., Rodrigues, G.A., Haddad, B.R., 2005. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 615–619.
- Garritano, S., Gemignani, F., Palmero, E.I., Olivier, M., Martel-Planche, G., Le Calvez-Kelm, F., Brugieres, L., Vargas, F.R., Brentani, R.R., Ashton-Prolla, P., Landi, S., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., Achatz, M.L., 2010. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum. Mutat.* 31, 143–150.
- Gicquel, C., Bertagna, X., Schneid, H., Francillard-Leblond, M., Luton, J.P., Girard, F., Le Bouc, Y., 1994. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 1444–1453.
- Gicquel, C., Raffin-Sanson, M.L., Gaston, V., Bertagna, X., Plouin, P.F., Schlumberger, M., Louvel, A., Lutin, J.P., Le Bouc, Y., 1997. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2559–2565.
- Gicquel, C., Bertagna, X., Gaston, V., Coste, J., Louvel, A., Baudin, E., Bertherat, J., Chapuis, Y., Duclos, J.M., Schlumberger, M., Plouin, P.F., Lutin, J.P., Le Bouc, Y.,

2001. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 61, 6762–6767.
- Giordano, T.J., Thomas, D.G., Kuick, R., Lizyness, M., Misk, D.E., Smith, A.L., Sanders, D., Aljundi, R.T., Gauger, P.G., Thompson, N.W., Taylor, J.M., Hanash, S.M., 2003. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am. J. Pathol.* 162, 521–531.
- Giordano, T.J., Kuick, R., Else, T., Gauger, P.G., Vinco, M., Bauersfeld, J., Sanders, D., Thomas, D.G., Doherty, G., Hammer, G., 2009. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin. Cancer Res.* 15, 668–676.
- Haluska, P., Worden, F., Olmos, D., Yin, D., Schteingart, D., Batzel, G.N., Paccagnella, M.L., de Bono, J.S., Gualberto, A., Hammer, G.D., 2010. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 765–773.
- Iacopetta, B., 2003. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum. Mutat.* 21, 271–276.
- Ivessmaki, V., Blum, W.F., Voutilainen, R., 1993. Insulin-like growth factor binding proteins in the human adrenal gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 97, 71–79.
- Ishimoto, H., Jaffe, R.B., 2011. Development and function of the human fetal adrenal cortex: a key component in the feto-placental unit. *Endocr. Rev.* 32, 317–355.
- Latronico, A.C., Chrousos, G.P., 1997. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1317–1324.
- Latronico, A.C., Pinto, E.M., Domenice, S., Frago, M.C., Martin, R.M., Zerbini, M.C., Lucon, A.M., Mendonça, B.B., 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.
- Lau, S.K., Weiss, L.M., 2009. The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. *Hum. Pathol.* 40, 757–768.
- Libe, R., Groussin, L., Tissier, F., Elie, C., Rene-Corail, F., Frattici, A., Jullian, E., Beck-Peccoz, P., Bertagna, X., Gicquel, C., Bertherat, J., 2007. Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin. Cancer Res.* 13, 844–850.
- Logie, A., Bouille, N., Gaston, V., Perin, L., Boudou, P., Le Bouc, Y., Gicquel, C., 1999. Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line. *J. Mol. Endocrinol.* 23, 23–32.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni Jr., J.F., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., Tinsley, M.A., et al., 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250, 1233–1238.
- Mendonça, B.B., Lucon, A.M., Menezes, C.A., Saldanha, L.B., Latronico, A.C., Zerbini, C., Madureira, G., Domenice, S., Albergaria, M.A., Camargo, M.H., et al., 1995. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J. Urol.* 154, 2004–2009.
- Michalkiewicz, E., Sandrini, R., Figueiredo, B., Miranda, E.C., Caran, E., Oliveira-Filho, A.G., Marques, R., Pianovski, M.A., Lacerda, L., Cristofani, L.M., Jenkins, J., Rodriguez-Galindo, C., Ribeiro, R.C., 2004. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J. Clin. Oncol.* 22, 838–845.
- Palmero, E.L., Schuler-Faccini, L., Caleffi, M., Achatz, M.I., Olivier, M., Martel-Planche, G., Marcel, V., Aguiar, E., Giacomazzi, J., Ewald, I.P., Giugliani, R., Hainaut, P., Ashton-Prolla, P., 2008. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett.* 261, 21–25.
- Parker, K.L., Schimmer, B.P., 1997. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr. Rev.* 18, 361–377.
- Peller, S., Rotter, V., 2003. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Hum. Mutat.* 21, 277–284.
- Pinto, E.M., Billerbeck, A.E., Villares, M.C., Domenice, S., Mendonça, B.B., Latronico, A.C., 2004. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 48, 647–650.
- Pinto, E.M., Billerbeck, A.E., Frago, M.C., Mendonça, B.B., Latronico, A.C., 2005. Deletion mapping of chromosome 17 in benign and malignant adrenocortical tumors associated with the Arg337His mutation of the p53 tumor suppressor protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2976–2981.
- Ragazzon, B., Libe, R., Gaujoux, S., Assie, G., Frattici, A., Launay, P., Clauser, E., Bertagna, X., Tissier, F., de Reynies, A., Bertherat, J., 2010. Transcriptome analysis reveals that p53 and (beta)-catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. *Cancer Res.* 70, 8276–8281.
- Reincke, M., Karl, M., Travis, W.H., Mastorakos, G., Allolio, B., Linehan, H.M., Chrousos, G.P., 1994. P53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 790–794.
- Ribeiro, R.C., Sandrini, R., Figueiredo, B., Zambetti, G.P., Michalkiewicz, E., Lafferty, A.R., Delacerda, L., Rabin, M., Cadwell, C., Sampaio, G., Cat, I., Stratakis, C.A., 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.
- Samani, A.A., Yakar, S., LeRoith, D., Brodt, P., 2007. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr. Rev.* 28, 20–47.
- Sandrini, R., Ribeiro, R.C., Delacerda, L., 1997. Childhood adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2027–2031.
- Shiera, S., Schull, S., Assie, G., Voelker, H.U., Kraus, L., Beyer, M., Ragazzon, B., Beuschlein, F., Willenberg, H.S., Hahner, W., Saeger, W., Bertherat, J., Allolio, B., Fassnacht, M., 2010. High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor 1 expression in adrenal tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, E161–171.
- Schuijjer, M., Berns, E.M., 2003. TP53 and ovarian cancer. *Hum. Mutat.* 21, 285–291.
- Tissier, F., Cavad, C., Groussin, L., Perlemonne, K., Fumey, G., Hagnere, A.M., Rene-Corail, F., Jullian, E., Gicquel, C., Bertagna, X., Vacher-Lavenu, M.C., Perret, C., Bertherat, J., 2005. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 65, 7622–7627.
- Varley, J.M., McGown, G., Thornicroft, M., James, L.A., Margison, G.P., Forster, G., Evans, D.G., Harris, M., Kelsey, A.M., Birch, J.M., 1999. Are there low-penetrance TP53 Alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 995–1006.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310.
- Wajchenberg, B.L., Albergaria Pereira, M.A., Medonca, B.B., Latronico, A.C., Campos Carneiro, P., Alves, V.A., Zerbini, M.C., Liberman, B., Carlos Gomes, G., Kirschner, M.A., 2000. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* 88, 711–736.
- Weiss, L.M., 1984. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 8, 163–169.
- West, A.N., Ribeiro, R.C., Jenkins, J., Rodriguez-Galindo, C., Figueiredo, B.C., Kriwacki, R., Zambetti, G.P., 2006. Identification of a novel germ line variant hotspot mutant p53-R175L in pediatric adrenal cortical carcinoma. *Cancer Res.* 66, 5056–5062.
- West, A.N., Neale, G.A., Pounds, S., Figueiredo, B.C., Rodriguez Galindo, C., Pianovski, M.A., Oliveira Filho, A.G., Malkin, D., Lalli, E., Ribeiro, R., Zambetti, G.P., 2007. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 67, 600–608.
- Wieneke, J.A., Thompson, L.D., Heffess, C.S., 2003. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am. J. Surg. Pathol.* 27, 867–881.
- Wilkin, F., Gagne, N., Paquette, J., Oligney, L.L., Deal, C., 2000. Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2048–2056.

Apêndice E - Artigo 2 - Aceito para publicação

Clinical Endocrinology (2014)

doi: 10.1111/cen.12607

ORIGINAL ARTICLE

Expression of LIN28 and its regulatory microRNAs in adult adrenocortical cancer

André M. Faria*, Silviu Sberat, Tamaya C. Ribeiro*, Iberê C. Soares†§¶, Beatriz M.P. Mariani*, Daniel S. Freire**, Gabriela R.V. de Sousa*, Antônio M. Lerario††‡‡, Cristina L. Ronchi§§, Timo Deutschbeint†, Alda Wakamatsu†, Venancio A.F. Alves††‡‡, Maria Claudia N. Zerbini†, Berenice B. Mendonça*, Maria Candida B.V. Fragoso*††‡‡, Ana Claudia Latronico*, Martin Fassnacht†§§ and Madson Q. Almeida*††‡‡

*Unidade de Suprarrenal & Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42, São Paulo, Brasil, †Endocrine and Diabetes Unit, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany, ‡Divisão de Anatomia Patológica, Laboratório de Patologia Hepática LIM14, §da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, ¶Hospital do Câncer de Barretos – Unidade Porto Velho, Porto Velho, **Unidade de Endocrinologia Geral, ††Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ‡‡Instituto do Câncer do Estado de São Paulo ICESP, São Paulo, Brasil and §§Department of Internal Medicine I, Comprehensive Cancer Center Mainfranken, University Hospital, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany

Summary

Objective LIN28 control cells reprogramming and pluripotency mainly through miRNA regulation and has been overexpressed in many advanced cancers. In this study, we evaluated the prognostic role of LIN28 and its regulatory miRNAs in a large cohort of adrenocortical tumours (ACTs).

Patients and methods LIN28 protein expression was assessed in 266 adults ACTs (78 adenomas and 188 carcinomas) from Brazil and Germany. LIN28A and LIN28B gene expression was analysed in 59 ACTs (31 adenomas and 28 carcinomas) and copy number variation in 39 ACTs. In addition, we determined the expression of *let-7* family, *mir-9*, *mir-30* and *mir-125* in 28 carcinomas.

Results LIN28A gene was overexpressed in aggressive ACCs when compared with adenomas and nonaggressive ACCs, but no LIN28A copy number variation was found in ACTs. Unexpectedly, weak LIN28 protein expression was significantly associated with reduced disease-free survival in ACC patients ($P = 0.01$), but for overall survival only a trend was detectable ($P = 0.117$). In the multivariate analysis, only Ki67 index $\geq 10\%$ (HR 4.6, $P = 0.000$) and weak LIN28 protein expression (HR 2.0, $P = 0.03$) were independent predictors of recurrence in ACC patients. Interestingly, *mir-9* expression, a negative LIN28A/B regulator, was significantly higher in aggressive than in nonaggressive ACCs [2076 (from 36 to 9307) vs 133.4 (from

2.4 to 5193); $P = 0.011$] and was highly associated with reduced overall ($P = 0.01$) and disease-free survival ($P = 0.01$). However, *mir-9* prognostic role should be further evaluated in a larger cohort.

Conclusion Weak LIN28 protein expression was associated with recurrence in ACCs. Additionally, overexpression of *mir-9*, a negative LIN28A regulator, was associated with poor outcome.

(Received 10 July 2014; returned for revision 30 July 2014; finally revised 25 August 2014; accepted 29 August 2014)

Introduction

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare malignancy with incompletely understood pathogenesis and poor prognosis.^{1,3} To date, systemic treatment of advanced ACC has showed unsatisfactory overall response.^{4,5} Over the past two decades, considerable advances have been made into the understanding of molecular mechanisms associated with tumour progression and metastasis.¹ Overexpression of *IGF2/IGFIR* and constitutive activation of β -catenin were identified as key factors involved in the development of ACC.^{6,8}

MicroRNAs (miRNA) play a key role in the regulation of gene expression through post-transcriptional repression by interacting with complementary sequences of target mRNAs. miRNA expression in human tumours has been characterized by an overall downregulation.⁹ Recently, several studies demonstrated the potential of miRNA profiling in differentiating between adrenocortical adenomas and carcinomas, risk stratification and prognosis.¹⁰ Although these studies have produced some divergent data, *mir-483* overexpression and *mir-195* downregulation in adult ACCs seem consistent.^{11,12}

Correspondence: Madson Q. Almeida, Unidade de Suprarrenal, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM-42, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 2 andar, Bloco 6, 05403-900 São Paulo, SP, Brasil. Tel: 55 11 26617512; Fax: 55 11 26617519; E-mail: madson.almeida@hc.fm.usp.br

© 2014 John Wiley & Sons Ltd

1

CE: Serravallo C.	Dispatch: 15.9.14	WILEY	12607	Journal Code
PE: Shmida	No. of pages: 8	Manuscript No.		

2 A. M. Faria et al.

Nevertheless, little is known about post-transcriptional regulation of miRNAs. LIN28 (also known as LIN28A) is a highly conserved RNA-binding protein that has emerged as a modulator of the processing of *let-7*, an important family of miRNAs widely known for its tumour-suppressive effects.¹³ LIN28B is the only homologue of LIN28 in humans, sharing structure and certain function.¹⁴ Besides from *let-7*, LIN28 has also shown to regulate and be regulated by *mir-9*, *mir-30* and *mir-125*.^{14,15} By repressing *let-7*, LIN28 consequently activates many cancer driver genes, including promitogenic factors and cell cycle progression genes.¹³ Both LIN28 and LIN28B were overexpressed in a variety of advanced human malignancies.¹⁶ Importantly, *IGF1R* is an important target of the *let-7* family and has been demonstrated to be upregulated in tumours that overexpress LIN28B.^{17,18} Moreover, LIN28A and B have also miRNA-independent functions.^{19,20} Polesskaya et al.²¹ demonstrated that LIN28 directly enhances translation efficiency of *IGF2* mRNA during murine muscle cell differentiation, a finding with potential implication to ACC.

The aim of our study was to investigate the expression of LIN28 protein in a large cohort of adult adrenocortical tumours (ACTs). Additionally, we analysed LIN28A and LIN28B expression and the presence of copy number variation in subgroups of this cohort. Expression of the miRNAs (*let-7* family, *mir-9*, *mir-30* and *mir-125*) involved with their post-transcriptional regulation was also investigated. To further characterize their role in tumour progression and prognosis, we correlated these findings with clinicopathological parameters and known molecular markers, such as *IGF1R*, *IGF2*, β -catenin and Ki67 index.

Material and methods

The study was approved by the Ethics Committees of the Hospital das Clínicas, University of São Paulo and of the University of Würzburg, and informed written consent was obtained from all patients. The Weiss criteria were used to classify adenomas and carcinomas (Weiss score <3 and ≥ 3 , respectively). LIN28 protein expression was assessed in a total of 266 adrenocortical tumours (ACTs, 78 adenomas and 188 carcinomas) and Ki67 protein expression was evaluated in 158 ACCs. Among them, 59 ACTs (31 adenomas and 28 carcinomas) were used to analyse LIN28A and LIN28B gene expression, 39 ACTs to study copy number variation study and 28 ACCs to determine *let-7* family, *mir-9*, *mir-30* and *mir-125* expression (Figure S1). Further evaluation of *mir-9* expression was also done in 13 adenomas.

The ACT cohort includes 156 tumours (78 adenomas and 78 carcinomas) from the University of São Paulo and 110 carcinomas from the German ACC Registry. All tumours samples derived from primary surgery. Clinical parameters, such as sex, age at diagnosis, date of surgery, tumour size, pathological classification and hormone analysis were collected from patient records. Tumour stage was classified according to the European Network for the Study of Adrenal Tumours (ENSAT) classification. Only patients with at least 12 months of follow-up were included in this study. The presence of distant metastases or

recurrence was evaluated at the time of diagnosis and during follow-up visits by computerized tomography of chest and abdomen every 3–6 months. ACCs were further classified as aggressive or nonaggressive according to the presence or absence of locoregional recurrence and/or distant metastasis in the initial 12 months after first surgery.

Tissue microarray (TMA) and immunohistochemical analysis

Representative areas of the ACTs (viable tumour tissue without necrosis) were identified on haematoxylin- 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 3 recipient paraffin blocks using a precision microarray instrument (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA). One set of three slides was selected (one slide from each of the 3 TMA paraffin blocks of the triplicate) for staining with anti-LIN28 rabbit polyclonal antibody (titre 1:100; 11724-1-AP, ProteinTech Group Inc, Chicago, IL, USA), which recognizes both LIN28A and LIN28B. An immunoperoxidase immunohistochemical modified method with humid heat antigen retrieval was used as previously described.²² LIN28 immunostaining was blindly evaluated by two independent observers (I.C.S. and S.S.) in both Brazilian and German cohorts, and the mean of the two evaluations was taken for statistical analysis. The interobserver reproducibility for LIN28 was 0.71. TMA samples were included in the analysis only if two or more evaluable cores were available after the staining procedure. Cytoplasmic staining was evaluated according intensity as negative (0), low (1), medium (2), or strong (3). The percentage of positive tumour cells was visually scored as follow: 0 if 0% of tumour cells were positive; 0–1 if 1–9%; 0.5 if 10–49% and 1 if $\geq 50\%$. A semiquantitative H-score was then calculated by multiplying the staining intensity score by the proportion score, with a final score ranging from 0 to 3.²³ The median H-score value from each ACC cohort was *a priori* chosen as the cut-off point for separating tumours with low and strong LIN28 staining (Table 1).

Additionally, for the Brazilian cohort, another set of three slides was stained with mouse monoclonal anti-human Ki67 antigen (titre 1:40, clone MIB-1, code M7240, Dako, Denmark).⁴ Nuclear staining for Ki67 was blindly evaluated by two independent observers (I.C.S. and M.C.N.Z.), and the mean of the two evaluations taken for statistical analysis. The interobserver reproducibility for Ki67 analysis was 0.9. Each tumour sample was categorized by subjective assessment based on visual estimation of percentage of positive nuclei, as follows: 0 9%, 10 19%, 20 29%, 30 39%, 40 49%, 50 59%, 60 69%, 70 79%, 80 89% and $\geq 90\%$. In the German cohort, Ki67 analysis was performed in full slides of each patient which were stained with monoclonal antibody anti-human Ki67 antigen (titre 1:100, clone MIB-1, Dossenheim, Germany). Nuclear staining was evaluated by the reference pathologist of the German ACC Registry (Dr. Wolfgang Saeger), with all positive nuclei counted and reported to the number of high-power field.

LIN28 and mir-9 in adrenocortical cancer 3

Table 1. Relationship between LIN28 protein expression and baseline clinical or pathological characteristics of 188 adult patients with ACC (only tumour samples derived from primary surgery)

	Weak LIN28 protein expression	Strong LIN28 protein expression	P
n (%)	120 (64%)	68 (36%)	
H-score, median	0.83	1.73	
Age, median (year)	45.8	41.5	0.13
Sex [male, n (%)]	37 (31)	19 (28)	0.68
Tumour size, median (cm)	12.0	10.2	0.05
Tumour stage (ENSAT), n (%)			
Known	117	67	0.23
1–2	52 (59)	36 (41)	
3–4	65 (68)	31 (32)	
Hormonal status, n (%)			
Known	83	53	
Cushing	37 (67)	18 (33)	0.22
Noncushing	46 (57)	35 (43)	
Weiss score, median	5	5	0.22
Ki 67 index (%)			
Known	87	56	
<10	52 (67)	26 (33)	0.12
≥10	35 (54)	30 (46)	
Recurrence, n (%)			
Known	74	50	
Affected patients	48 (68)	22 (32)	0.02
Nonaffected patients	26 (48)	28 (52)	

ACC, adrenocortical cancer.

Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

After surgical resection, tumour fragments were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until total RNA extraction using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA samples were treated with DNase using standard procedures. cDNA was generated from 1 μg of total RNA using the commercial kit Superscript III First Strand S (Invitrogen). Quantitative real-time PCR was performed in the ABI Prism 7000 sequence detector using TaqMan gene expression assays according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, CA, USA). The PCR cycling conditions were as follows: 2 min at 95°C , 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30 s and a final step at 72°C for 30 s. The assays for target genes were LIN28A (Hs04189307_g1) and LIN28B (Hs01013729_m1). β -actin (ACTB, 4310881E) and β -glucuronidase (GUSB, 4310888E) were used as endogenous genes for normalization.

For measuring miRNAs expression, single-stranded cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA using Megaplex RT Primers, Human Pool A v2.1 (PN 4399966; Applied Biosystems) and TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (PN 4366596; Applied Biosystems). PCR products were amplified using Taqman Universal Master Mix II, no UNG (PN 4440040; Applied Biosystems). The following TaqMan MicroRNA Assays were used: let-7a (000377), let-7b (002619), let-7c (000379), let-7d (002283), let-7e (002406), let-7f (000382), let-7g (002282), mir-98 (000577), mir-9 (000583), mir-30b (000602), mir-30c

(000419), mir-125a-3p (002199), mir-125a-5p (002198) and mir-125b (000449). RNU44 (001094) and RNU48 (001006) were used as endogenous genes for normalization. The relative expression levels were analysed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. A commercial pool of normal human adrenal cortex from autopsies was used as reference sample (Clontech, Palo Alto, CA, USA).

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Probes were designed for each exon of LIN28A and LIN28B genes and are available upon request. SALSA MLPA KIT P300-A1 Human DNA Reference-2 was used as reference (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands). This kit contains reference probes and control fragments specific for unique human DNA sequences. This problemix was developed to be added to 'home-made' synthetic MLPA probes, as previously described.²⁴ PCR product was submitted to capillary electrophoresis on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, The Perkin-Elmer Corporation). Data analysis was performed with Genescan 3.7. Dosage quotient areas outside the range 0.70–1.3 were considered abnormal.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS Software (PASW version 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Continuous data are expressed as median values (from minimum to maximum). Differences in expression levels between two groups were analysed by means of the two-tailed Mann-Whitney U-test. One-way ANOVA model followed by Bonferroni *post hoc* test was employed when comparing three groups. The Fisher's exact test or the χ^2 test was used to investigate dichotomous variables. Overall survival was defined as the time from the date of primary diagnosis to death related to adrenocortical cancer or last follow-up. Disease-free survival was defined as the time from the date of complete tumour resection to the first radiological evidence of disease relapse or death. All the survival curves were obtained by Kaplan-Meier estimates, and the differences between survival curves were assessed by the log-rank (Mantel-Cox) test. In this context, the mRNA or miRNA expression was considered as a categorical value (cut-off value for this data set was the median value of all samples for each mRNA or miRNA). Predictive factors of prognosis were identified by means of Cox proportional hazards regression models, which were used to estimate hazard ratios (HR) and their 95% confidence intervals in univariate and multivariate analysis. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

LIN28A and LIN28B gene expression

LIN28A was overexpressed in aggressive ACCs when compared with adenomas [7.1-fold change (from 0 to 17.1) vs 3.6 (from 0 to 18.3); $P = 0.006$, respectively] and a trend towards greater expression when compared with nonaggressive carcinomas [7.1

4 A. M. Faria et al.

(from 0 to 17.1) vs 7.0 (from 0 to 174.3); $P = 0.092$). Most of the adenomas (54%, 17 of 31) had null expression of *LIN28A*. However, *LIN28A* at the mRNA level was not associated with overall and disease-free survival. *LIN28B* expression was negative in 92% of the ACTs. Thus, although the LIN28 antibody employed at the immunohistochemical analysis recognizes both LIN28A and LIN28B, we can assume that LIN28 staining in ACCs represents mainly the protein product of *LIN28A* gene.

Because LIN28/LIN28B has shown to have an important role in regulating the IGF pathway both directly by promoting the translation of the *IGF2* mRNA²¹ and indirectly by derepressing *IGF1R*,^{17,18} we evaluated the association of *LIN28A* expression with our previously published data.⁵ We did not find correlation between *LIN28A* and *IGF2* expression. As the Wnt/ β -catenin pathway has been shown to induce LIN28 upregulation, we also looked at association between *LIN28A/LIN28B* levels and *CTNNB1* mutations or abnormal β -catenin accumulation from our previous published data,⁷ but no significant association was found.

Among 39 ACTs studied by MLPA, no *LIN28A* copy number variation was detected. Only a metastatic ACC from a 44-year-old woman showed deletion of *LIN28B* gene and concordant negative *LIN28B* expression.

LIN28 protein expression

Similarly to mRNA level, the frequency of strong LIN28 protein expression was not statistically different between nonaggressive ACCs (37 of 77, 48%) and adenomas (26 of 78, 33%; $\chi^2 = 2.9$; $P = 0.11$). Unexpectedly, a weak LIN28 protein expression was significantly more frequent in aggressive (75 of 105, 71%) than in nonaggressive ACCs (40 of 77, 51%; $\chi^2 = 7.6$; $P = 0.02$).

Interestingly, weak LIN28 protein expression was significantly associated with reduced disease-free survival in ACC patients ($P = 0.01$), but for overall survival only a trend was detectable ($P = 0.117$; Fig. 1a–d). Tumour size and recurrence were significantly associated with weak LIN28 protein expression ($P = 0.05$ and $P = 0.02$, respectively) (Table 1).

Ki67 staining was assessed in 158 ACCs. A Ki67 index $\geq 10\%$ was significantly correlated with reduced disease-free and overall survival ($P = 0.0001$ and $P = 0.0001$, respectively) (Fig. 2). In the univariate analysis, tumour size ≥ 8 cm ($P = 0.009$), ENSAT 4 stage ($P = 0.0001$), Weiss score ≥ 6 ($P = 0.001$) and Ki67 index $\geq 10\%$ ($P = 0.0001$) were associated with reduced overall survival (Table 2). In the multivariate analysis, only ENSAT 4 stage (HR 3.3, 95% CI 1.9–5.7; $P = 0.0001$) and Ki67 index $\geq 10\%$ (HR 3.0, 95% CI 1.8–5.0; $P = 0.0001$) remained as predictors of reduced overall survival.

Regarding disease-free survival, male sex ($P = 0.01$), tumour size ≥ 8 cm ($P = 0.001$), Weiss score ≥ 6 ($P = 0.003$), Ki67 index $\geq 10\%$ ($P = 0.0001$) and weak LIN28 protein expression ($P = 0.01$) were significantly associated with recurrence (local or metastasis) in the univariate analysis (Table 2). In the multivariate analysis, only Ki67 index $\geq 10\%$ (HR 5.7, 95% CI 3.0–10.8; $P = 0.0001$) and weak LIN28 protein expression (HR 2.3, 95% CI 1.2–4.4; $P = 0.008$) were independent predictors of recurrence of ACC patients.

LIN28 regulatory miRNA expression

From the 14 miRNAs studied in a subgroup of 28 ACCs, only *mir-9* showed significant differential expression between aggressive and nonaggressive ACCs. Expression levels of *let-7a*, *let-7b*,

Fig. 1 (a) LIN28 immunohistochemical staining of a tumour showing strong positive (H-score 3, $\times 200$). (b) Negative LIN28 protein expression in a metastatic ACC from a 44-year-old woman ($\times 200$). (c–d) Impact of LIN28 protein expression on disease-free and overall survival in adult patients with ACC ($n = 188$ tumour samples derived from primary surgery with complete clinical data). For disease-free survival analysis, only patients with complete resection have been analysed. ACC, adrenocortical carcinoma.

LOW RESOLUTION COLOR FIG

Fig. 2 Ki67 immunohistochemical staining of a tumour showing strong positive (a, $\times 200$) and another tumour showing negative Ki67 nuclear staining (b, $\times 200$). (c–d) Impact of Ki67 protein expression on disease-free and overall survival in adult patients with ACC ($n = 158$ tumour samples derived from primary surgery with complete clinical data). For disease-free survival analysis, only patients with complete resection have been analysed. ACC, adrenocortical carcinoma.

Table 2. Prognostic factors for overall survival and disease-free survival in adult patients with ACC (only tumour samples derived from primary surgery)

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Overall survival						
Male sex	1.2	0.8–1.8	0.35			
Tumour size ≥ 8 cm	6.5	1.6–26.4	0.009	5.5	0.7–40	0.09
Tumour stage (ENSAT 4)	3.4	2.4–5.0	0.0001	3.3	1.9–5.7	0.0001
Cushing	1.5	0.9–2.2	0.09			
Weiss score ≥ 6	1.9	1.3–2.7	0.001	1.3	0.8–2.0	0.21
Ki67 index $\geq 10\%$	4.1	2.5–6.6	0.0001	3.0	1.8–5.0	0.0001
Weak LIN28 protein expression	1.4	0.9–1.1	0.12			
Disease-free survival						
Male sex	1.7	1.1–2.7	0.016	1.0	0.6–1.9	0.91
Tumour size ≥ 8 cm	2.7	1.5–5.0	0.001	1.7	0.7–4.2	0.26
Cushing	1.3	0.8–2.2	0.32			
Weiss score ≥ 6	1.9	1.2–3.0	0.003	1.2	0.6–2.1	0.63
Ki67 index $\geq 10\%$	5.1	2.9–9.0	0.0001	5.7	3.0–10.8	0.0001
Weak LIN28 protein expression	1.8	1.1–3.1	0.017	2.3	1.2–4.4	0.008

ACC, adrenocortical cancer.

let-7c, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, *mir-98*, *mir-30b*, *mir-30c*, *mir-125a-3p*, *mir-125a-5p* and *mir-125b* were not significantly different between nonaggressive and aggressive ACCs. LIN28 staining and *mir-9* expression did not correlate, possibly because of small sample size.

Patients with aggressive ACC had significantly higher *mir-9* levels in comparison with both nonaggressive ACC and

adenomas [2076 (from 36 to 9307) vs 133.4 (from 2.4 to 5193) and 313 (from 2.8 to 2129); $P = 0.024$ and $P = 0.01$, respectively). In addition, ACCs with *mir-9* overexpression also presented a trend towards a higher Weiss score ($P = 0.07$) and a Ki67 index $\geq 10\%$ ($P = 0.11$) (Table 3). Overexpression of *mir-9* was also highly associated with reduced overall and disease-free survival ($P = 0.012$ and $P = 0.010$, respectively; Fig. 3).

6 A. M. Faria et al.

Table 3. Relationship between *mir-9* expression and baseline clinical or pathological characteristics of 28 adult patients with ACC (only tumour samples derived from primary surgery)

	Low <i>mir-9</i>	High <i>mir-9</i>	P
n (%)	14 (50)	14 (50)	
Age, median (year)	38.7	26.5	0.13
Sex [male, n (%)]	4 (28.6)	1 (7.1)	0.14
Tumour size, median (cm)	8.7	11.5	0.22
Tumour stage (ENSAT), n (%)			
Known	14	14	
1	3 (75)	1 (25)	0.19
2	6 (67)	3 (33)	
3	1 (17)	5 (83)	
4	4 (44)	5 (56)	
Hormonal status, n (%)			
Known	14	13	
Cushing only	4 (67)	2 (33)	0.16
Virilization only	3 (100)	0 (0)	
Mixed syndrome	4 (31)	9 (69)	
Nonfunctioning	2 (50)	2 (50)	
Oestrogen secreting	1 (100)	0 (0)	
Weiss score, median	4	6.5	0.07
Ki67 index (%)			
Known	13	11	
<10	10 (67)	5 (33)	0.11
≥10	3 (33)	6 (67)	
LIN28 staining			
Known	13	11	
Low expression	8 (57)	6 (43)	0.73
High expression	5 (50)	5 (50)	
Distant metastasis or local recurrence, n (%)**			
Known	11	9	
Affected patients	2 (25)	6 (75)	0.028
Nonaffected patients	9 (75)	3 (25)	

ACC, adrenocortical cancer.

Recurrence developed in 6 of 9 (75%) patients with *mir-9* overexpression and in only 2 of 9 (22%), $\chi^2 = 4.8$; $P = 0.028$; Table 3) with *mir-9* underexpression.

Discussion

Overexpression of *LIN28A* and *B* has been demonstrated in a variety of different human malignancies, specifically in a subset

of advanced and poorly differentiated cancers.^{14,16} Indeed, it has been shown to have a key role in promoting cancer progression and metastasis.¹³ In the present study, *LIN28A* expression was significantly higher in carcinomas when compared to adenomas. Unexpectedly, most of the patients with aggressive ACC had weak LIN28 protein expression. On the other hand, we have also demonstrated that *mir-9*, a miRNA known to negatively regulate LIN28, was highly expressed in the subgroup of aggressive when compared to nonaggressive ACC. *mir-9* overexpression was strongly associated with both reduced overall and disease-free survival in ACCs. Importantly, we demonstrated the association of low LIN28 protein expression with reduced disease-free survival in a significant cohort of ACCs.

Despite their high degree of homology, LIN28A and LIN28B function through distinct mechanisms and many tumours usually express either one or the other.²⁵ In our cohort, *LIN28B* was not expressed in most of the adrenocortical adenomas and carcinomas, whereas *LIN28A* was overexpressed in ACCs. However, the majority of aggressive ACC have a very weak LIN28 expression at the protein level. We speculate here if the negative post-transcriptional regulation of LIN28 by *mir-9* decreased LIN28 protein expression in aggressive ACCs. Nevertheless, this finding does not rule out the clinical relevance of weak LIN28 protein expression as a prognostic marker of recurrence in adult ACCs.

Ki67 index has been proposed as an important marker to predict poor prognosis in ACC patients.¹ A Ki67 index ≥10% has been employed to identify high-risk ACC patients who would be benefited from adjuvant approaches to avoid recurrence.² More recently, Duregon *et al.*²⁶ demonstrated that Ki67 is the best prognostic indicator of overall survival, being superior to the mitotic index. In this study, Ki67 index ≥10% was significantly associated with reduced overall and disease-free survival in the multivariate analysis. Then, we found here in a TMA-based analysis from the Brazilian cohort in conjunction with data from full section analysis of the German ACC Registry the same cut-off of Ki67 index previously associated with poor prognosis.

A genomewide expression data of 317 cancer cell lines reveal that NCIH69 (small cell lung cancer), SNB19 (glioblastoma) and NCIH295R (ACC) are among the cancer cell lines that most express *mir-9* in order of frequency, respectively (<http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiment/E-MTAB-37/ENSG00000207570#>).²⁷ Additionally, transcriptome profiling data obtained from the

Fig. 3 Impact of *mir-9* expression on disease-free (a) and overall survival (b) in adult patients with ACC (28 tumour samples derived from primary surgery with complete clinical data). For disease-free survival analysis, only patients with complete resection have been analysed. ACC, adrenocortical carcinoma.

Michigan University ACC cohort confirmed that *mir-9* is over-expressed in ACCs when compared to adenomas and the normal adrenal cortex (<http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiment/E-GEOD-10927/ENSG00000207570>).

Aberrant expression of *mir-9* has been reported in a wide range of solid tumour and blood cancers. Expression of miRNAs and their role in cancer are known to be tissue specific and tumour specific. *mir-9* may act as an oncomir in some cancers, such as breast cancer²⁸ and hepatocellular carcinoma,²⁹ but can also have tumour-suppressive activity in others, such as ovarian serous cell carcinoma³⁰ and gastric cancer.³¹ For instance, *mir-9* has shown to downregulate E-cadherin in human breast carcinoma cells leading to increased cell motility and invasiveness and consequent activation of β -catenin signalling and elevated expression of *VEGFA*.²⁸ However, E-cadherin is not significantly expressed in ACCs,³² indicating that different players should be involved in the *mir-9* pathway in ACC tumorigenesis.

Recently, Zhuang *et al.*³³ cocultured endothelial cells with tissue-matched tumour cells and have found significant upregulation of a group of miRNAs in five endothelial cell lines. From the group of upregulated miRNAs, *mir-9* had the greatest effect on human umbilical vein endothelial cell migration. Taken up by endothelial cells, the released *mir-9* targeted SOCS5, an inhibitor of the JAK-STAT signalling pathway, to promote endothelial migration. Furthermore, *mir-9* levels were increased in the plasma of mice implanted with colorectal or lung tumour cells, and a *mir-9* antagomir slowed tumour growth and angiogenesis.³³ Interestingly, specific serum circulating miRNAs were detected in ACC patients and associated with both shorter overall and disease-free survival.³⁴ Additionally, a recent phase 2 study in patients with hepatitis C had first evaluated a miRNA-based targeted therapy.³⁵ As miRNA-based target therapy has now been used in clinical trials, we could consider *mir-9* as a potential target for ACC therapy. In addition, serum *mir-9* detection can function as a precocious marker of tumour recurrence (Figure S2). Although promising, *mir-9* prognostic role should be further evaluated in a larger cohort of ACCs.

In conclusion, weak LIN28 protein expression was associated with recurrence in adult ACCs. *LIN28A* gene was overexpressed in aggressive ACCs, suggesting a negative post-transcriptional regulation of LIN28. Additionally, *mir-9*, a negative *LIN28A* regulator, was higher expressed in aggressive ACCs.

Declaration of interest

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

Funding

FAPESP Grant number 2011/09092-0 (to A.M.F. and M.Q.A.) and 2012/21272-6 (to G.R.V.S. and M.Q.A.); CNPq Grant number 470428/2013-9 (to MQA), 470631/2012-0 (to MQA) and 302825/2011-8 (to A.C.L.).

References

- 1 Fassnacht, M., Libe, R., Kroiss, M. *et al.* (2011) Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nature Reviews Endocrinology*, **7**, 323–335.
- 2 Fassnacht, M., Kroiss, M. & Allolio, B. (2013) Update in adrenocortical carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **98**, 4551–4564.
- 3 Else, T., Kim, A., Sabolch, A. *et al.* (2013) Adrenocortical carcinoma. *Endocrine Reviews*, **34**, 20131029.
- 4 Fassnacht, M., Terzolo, M., Allolio, B. *et al.* (2012) Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, **366**, 2189–2197.
- 5 Berruti, A., Baudin, E., Gelderblom, H. *et al.* (2012) Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, **23**(Suppl 7), vii131–vii138.
- 6 Almeida, M.Q., Fragoso, M.C., Lotfi, C.F. *et al.* (2008) Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **93**, 3524–3531.
- 7 Heaton, J.H., Wood, M.A., Kim, A.C. *et al.* (2012) Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and beta-catenin. *The American Journal of Pathology*, **181**, 1017–1033.
- 8 Faria, A.M. & Almeida, M.Q. (2012) Differences in the molecular mechanisms of adrenocortical tumorigenesis between children and adults. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **351**, 52–57.
- 9 Calin, G.A. & Croce, C.M. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, **6**, 857–866.
- 10 Singh, P., Soon, P.S., Feige, J.J. *et al.* (2012) Dysregulation of microRNAs in adrenocortical tumors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **351**, 118–128.
- 11 Patterson, E.E., Holloway, A.K., Weng, J. *et al.* (2011) MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer*, **117**, 1630–1639.
- 12 Soon, P.S., Tacon, L.J., Gill, A.J. *et al.* (2009) miR-195 and miR-483-5p identified as predictors of poor prognosis in adrenocortical cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **15**, 7684–7692.
- 13 Viswanathan, S.R. & Daley, G.Q. (2010) Lin28: a microRNA regulator with a macro role. *Cell*, **140**, 445–449.
- 14 Zhou, J., Ng, S.B. & Chng, W.J. (2013) LIN28/LIN28B: an emerging oncogenic driver in cancer stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **45**, 973–978.
- 15 Zhong, X., Li, N., Liang, S. *et al.* (2010) Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 41961–41971.
- 16 Viswanathan, S.R., Powers, J.T., Einhorn, W. *et al.* (2009) Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nature Genetics*, **41**, 843–848.
- 17 Wang, Y.C., Chen, Y.L., Yuan, R.H. *et al.* (2010) Lin-28B expression promotes transformation and invasion in human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, **31**, 1516–1522.
- 18 Alajez, N.M., Shi, W., Wong, D. *et al.* (2012) Lin28b promotes head and neck cancer progression via modulation of the insulin-like growth factor survival pathway. *Oncotarget*, **3**, 1641–1652.

8 A. M. Faria et al.

- 19 Wilbert, M.L., Huelga, S.C., Kapeli, K. *et al.* (2012) LIN28 binds messenger RNAs at GGAGA motifs and regulates splicing factor abundance. *Molecular Cell*, **48**, 195–206.
- 20 Huang, Y. (2012) A mirror of two faces: Lin28 as a master regulator of both miRNA and mRNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, **3**, 483–494.
- 21 Poleskaya, A., Cuvelier, S., Naguibneva, I. *et al.* (2007) Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes & Development*, **21**, 1125–1138.
- 22 Shi, S.R., Key, M.E. & Kalra, K.L. (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, **39**, 741–748.
- 23 Olausson, K.A., Dunant, A., Fouret, P. *et al.* (2006) DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, **355**, 983–991.
- 24 Almeida, M.Q., Soares, I.C., Ribeiro, T.C. *et al.* (2010) Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **95**, 1458–1462.
- 25 Piskounova, E., Polytarchou, C., Thornton, J.E. *et al.* (2011) Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell*, **147**, 1066–1079.
- 26 Duregon, E., Molinaro, L., Volante, M. *et al.* (2014) Comparative Diagnostic and Prognostic Performances of the Hematoxylin-Eosin and Phospho-histone H3 Mitotic Count and Ki-67 Index in Adrenocortical Carcinoma. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.*, **27**, 1066–1079.
- 27 Krupp, M., Itzel, T., Maass, T. *et al.* (2013) Cell LineNavigator: a workbench for cancer cell line analysis. *Nucleic Acids Research*, **41**(Database issue), D942–D948.
- 28 Ma, L., Young, J., Prabhala, H. *et al.* (2010) miR-9, a MYC/MYCIN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nature Cell Biology*, **12**, 247–256.
- 29 Sun, Z., Han, Q., Zhou, N. *et al.* (2013) MicroRNA-9 enhances migration and invasion through KLF17 in hepatocellular carcinoma. *Molecular Oncology*, **6**, 100–110.
- 30 Tang, H., Yao, L., Tao, X. *et al.* (2013) miR-9 functions as a tumor suppressor in ovarian serous carcinoma by targeting TLN1. *International Journal of Molecular Medicine*, **32**, 100–108.
- 31 Zheng, L., Qi, T., Yang, D. *et al.* (2013) microRNA-9 suppresses the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer cells through targeting cyclin D1 and Ets1. *PLoS ONE*, **8**, e55719.
- 32 Gupta, D., Shidham, V., Holden, J. *et al.* (2001) Value of topoisomerase II alpha, MIB-1, p53, E-cadherin, retinoblastoma gene protein product, and HER-2/neu immunohistochemical expression for the prediction of biologic behavior in adrenocortical neoplasms. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AJMM / Official Publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, **9**, 215–221.
- 33 Zhuang, G., Wu, X., Jiang, Z. *et al.* (2012) Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *The EMBO Journal*, **31**, 3513–3523.
- 34 Chabre, O., Libe, R., Assie, G. *et al.* (2013) Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. *Endocrine-Related Cancer*, **20**, 579–594.
- 35 Janssen, H.L., Reesink, H.W., Lawitz, E.J. *et al.* (2013) Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England Journal of Medicine*, **368**, 1685–1694.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.