MADSON QUEIROZ DE ALMEIDA

**Expressão dos genes *IGF-II*, *IGF-IR*, *SF-1* e *DAX-1* em
tumores adrenocorticais de crianças e adultos**

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

Área de concentração: Endocrinologia e
Metabologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia
Latronico

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Madson Queiroz de

Expressão dos genes IGF-II, IGF-IR, SF-1 e DAX-1 em tumores adrenocorticais
de crianças e adultos / Madson Queiroz de Almeida. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Ana Claudia Latronico.

Descritores: 1.Neoplasia do córtex supra-renal 2.Expressão gênica 3.Fator de
crescimento insulin-like II 4.Receptor IGF tipo 1 5.Fatores de transcrição
6.Proliferação de células 7.Apoptose

USP/FM/SBD-171/08

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. 2006/00244-3).

*Dedico esta tese à minha esposa, Ana Regina, por
todo o seu amor, pela sua dedicação e compreensão.
Enfim, pela sua participação plena em todos os
instantes mais importantes da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por ter me proporcionado serenidade, paz e força em todos os momentos importantes da minha vida. A conclusão desta tese representa uma grande conquista, um momento de realização profissional e pessoal. Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram, tornando o meu caminho mais fácil e repleto de alegria:

À minha orientadora, Profa. Ana Claudia Latronico, pela sua presença constante e contribuição inestimável em todas as etapas da realização deste trabalho. Considero que este período de aprendizado, no qual tive a honra de ser seu aluno, foi uma oportunidade única e decisiva na minha formação acadêmica. A sua capacidade de motivar e resolver, objetivamente, cada problema, contribui para tornar a vida mais leve e fácil. Agradeço, ainda, pelas perspectivas de crescimento profissional que têm sido proporcionadas a mim. Obrigado pela sua amizade.

À nossa chefe, Profa. Berenice Bilharinho de Mendonça, por ter me proporcionado a oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa do LIM/42. O seu conhecimento clínico, a sua postura ética e a sua capacidade investigativa marcaram de forma decisiva a minha formação acadêmica. A sua dedicação ao doente, e não somente a doença, constitui um dos seus mais valiosos atributos profissionais. Obrigado pelo exemplo de competência e dedicação.

Aos pacientes com tumores adrenocorticais, que por mais de duas décadas, têm contribuído para o nosso aprendizado e nos motivado a tentar compreender e tratar esta difícil patologia.

À Dra. Maria Cândida Barisson Villares Fragoso pela sua participação efetiva e importante contribuição na elaboração deste trabalho. Além desta tese, desenvolvemos outros projetos também relacionados à tumorigênese adrenocortical. Obrigado por fazer parte da equipe de doenças adrenais (*our team!!!!*).

Ao amigo Alexander Jorge pela sua pronta disponibilidade em esclarecer os meus questionamentos. A sua experiência foi extremamente importante para a realização dos estudos *in vitro*.

À Mirian Nishi e à Márcia Helena Costa que me ensinaram os primeiros conceitos da análise de expressão gênica.

À Luciana Brito, colega de pós-graduação, pelas longas discussões sobre PCR em tempo real, que em muito contribuíram para o meu aprendizado.

Ao amigo Antônio Lerário que tem acompanhado os pacientes com tumores adrenocorticais no ambulatório e que contribuiu com o levantamento dos dados clínicos.

À Marisa Gerdulo, que recém-chegada ao laboratório, mostrou-se extremamente solícita em me ensinar e me acompanhar durante os primeiros experimentos com as linhagens tumorais.

Aos amigos Carolina Cani e Vinicius Brito pela suas companhias, tão importantes nas corridas manhãs de quarta-feira durante o ambulatório. Obrigado pelo aprendizado.

A todos os assistentes e colegas de pós-graduação do LIM/42 que contribuíram para realização deste trabalho e me proporcionaram um ambiente de trabalho amigável.

Agradeço à Nilda pela sua disponibilidade em nos ajudar.

Às funcionárias do LIM/42, Fran e Cidinha, que contribuem para o perfeito funcionamento do laboratório.

Durante este trabalho pude contar com a colaboração fundamental de pesquisadores de outros departamentos:

À Profa. Claudimara Lotfi e às suas alunas, Gabriele Mattos e Carolina Maciel, pelo estabelecimento de linhagens celulares dos tumores adrenocorticais, que contribuíram para enriquecer este estudo.

Ao Prof. Venâncio Alves e ao Dr. Iberê Soares pela realização do estudo de imunohistoquímica.

Aos meus pais, Marlúcia e Edson, pelo amor e educação. Agradeço também ao meu irmão e familiares pelo companheirismo.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Tumores adrenocorticais.....	2
1.2 Tumorigênese adrenocortical.....	5
1.3 Fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II) e receptor de IGF-I (IGF-IR).....	9
1.4 Fator esteroideogênico 1 (SF-1).....	15
1.5 Fator codificado por uma região crítica do cromossomo X associada ao sexo reverso e à hipoplasia adrenal congênita (DAX-1).....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. MÉTODOS.....	22
3.1 Pacientes.....	23
3.2 Estudo molecular.....	25
3.2.1 Extração de RNA.....	25
3.2.2 RT-PCR quantitativa em tempo real.....	26
3.3 Micromatriz tecidual (TMA) e imunohistoquímica.....	30
3.4 Linhagens celulares de tumores adrenocorticais.....	34
3.4.1 Inibidor seletivo do IGF-IR (NVP-AEW541).....	37
3.4.2 Ensaios de proliferação celular e apoptose.....	37
3.5 Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS.....	41
4.1 Expressão dos genes <i>IGF-II</i> e <i>IGF-IR</i> em tumores adrenocorticais.....	42
4.2 Fatores preditivos de metástases em crianças e adultos com tumores adrenocorticais.....	45

4.3 Efeito inibitório do NVP-AEW541 na proliferação das linhagens celulares de tumores adrenocorticais.....	47
4.4 Indução da apoptose pelo NVP-AEW541 nas linhagens celulares de tumores adrenocorticais.....	51
4.5 Expressão do SF-1 em tumores adrenocorticais.....	53
4.6 Expressão do DAX-1 em tumores adrenocorticais.....	56
5. DISCUSSÃO.....	59
5.1 Expressão dos genes <i>IGF-II</i> e <i>IGF-IR</i> em tumores adrenocorticais	60
5.2 Efeitos anti-tumorais do NVP-AEW541 nas linhagens celulares de tumores adrenocorticais.....	64
5.3 Expressão do SF-1 e DAX-1 em tumores adrenocorticais.....	67
6. CONCLUSÕES.....	71
7. ANEXOS.....	74
8. REFERÊNCIAS.....	82

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

Figura 1.	Organogênese adrenal.....	7
Figura 2.	Representação esquemática da dissomia uniparental paterna do <i>locus</i> 11p15 com alteração do <i>imprinting</i> genômico observada em tumores embrionários e adrenocorticais.....	11
Figura 3.	Efeitos biológicos desencadeados pela via de sinalização do IGF-IR.....	13
Figura 4.	Mecanismos de ativação das vias extrínseca e intrínseca de apoptose.....	15
Figura 5.	Eletroforese de gel de agarose 1% revelando a intensidade das bandas das subunidades 18S e 28S do RNA total extraído das amostras tumorais.....	26
Figura 6.	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> dos genes alvos <i>IGF-IR</i> e <i>IGF-II</i> em relação à <i>β-actina</i>	28
Figura 7.	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> dos genes alvos <i>SF-1</i> e <i>DAX-1</i> em relação à <i>β-actina</i>	29
Figura 8.	Foto panorâmica de lâminas com corte histológico dos blocos de micromatriz tecidual (TMA T0113, T0114 e T0115), coradas pela Hematoxilina e Eosina.....	31
Figura 9.	Linhagem adrenocortical estabelecida a partir de um adenoma adrenocortical pediátrico.....	36
Figura 10.	Expressão do gene <i>IGF-II</i> em 57 tumores adrenocorticais esporádicos.....	42
Figura 11.	Expressão do gene <i>IGF-IR</i> em 57 tumores adrenocorticais esporádicos.....	43
Figura 12.	Imunohistoquímica para IGF-II em tumores adrenocorticais.....	44
Figura 13.	Efeito inibitório do NVP-AEW541 na proliferação das células NCI H295 de carcinoma adrenocortical humano...	48

Figura 14.	Efeito inibitório do NVP-AEW541 na proliferação das células do adenoma adrenocortical pediátrico humano....	49
Figura 15.	Efeito inibitório do NVP-AEW541 na proliferação das células NCI H295 de carcinoma adrenocortical humano sem estímulo exógeno com IGF-II.....	50
Figura 16.	Efeito inibitório do NVP-AEW541 na proliferação das células do adenoma adrenocortical pediátrico humano sem estímulo exógeno com IGF-II.....	50
Figura 17.	Indução da apoptose pelo NVP-AEW541 nas células NCI H295 de carcinoma adrenocortical humano após 3 e 6 horas de tratamento.....	51
Figura 18.	Indução da apoptose pelo NVP-AEW541 nas células do adenoma adrenocortical pediátrico humano após 6 e 9 horas de tratamento.....	52
Figura 19.	Imunorreatividade nuclear para SF-1 em glândulas supra-renais normais.....	53
Figura 20.	Percentual de células neoplásicas imunorreativas para SF-1 em tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos.....	54
Figura 21.	Imunohistoquímica para SF-1 em tumores adrenocorticais.....	55
Figura 22.	Imunorreatividade nuclear para DAX-1 em glândulas supra-renais normais.....	56
Figura 23.	Percentual de células neoplásicas imunorreativas para DAX-1 em tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos.....	57
Figura 24.	Imunohistoquímica para DAX-1 em tumores adrenocorticais.....	58

LISTA DE TABELAS

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Características clínicas de 57 pacientes com tumores adrenocorticais.....	24
Tabela 2.	Características clínicas de 109 pacientes com tumores adrenocorticais.....	31
Tabela 3.	Anticorpos utilizados para a análise imunohistoquímica.....	33
Tabela 4.	Faixas percentuais de imunorreatividade utilizadas para avaliação quantitativa.....	34
Tabela 5.	Fatores preditivos para o desenvolvimento de metástases em crianças e adultos com tumores adrenocorticais.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Lista de Abreviaturas e Símbolos

$2^{-\Delta\Delta CT}$:	método de quantificação relativa
AKT:	proteína quinase B
Bad:	proteína pró-apoptótica da família bcl-2
Bax:	proteína pró-apoptótica da família bcl-2
BRCA:	supressor de câncer de mama
cDNA:	fita complementar de DNA
C_T :	ciclo em que cada curva de amplificação ultrapassa o limiar de detecção da fluorescência
<i>DAX-1</i> :	gene do fator codificado por uma região crítica do cromossomo X associada ao sexo reverso e à hipoplasia adrenal congênita
DHEA:	dehidroepiandrosterona
DHEA-S:	sulfato de DHEA
DMEM:	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO:	dimetilsulfóxido
DNA:	ácido desoxirribonucléico
EPM:	erro padrão da média
EGFR:	receptor do fator epitelial de crescimento
<i>FGFR4</i> :	gene do receptor 4 do fator de crescimento de fibroblastos
FISH:	hibridização <i>in situ</i> e detecção por fluorescência
<i>GDNF</i> :	gene do fator neurotrófico de derivação glial
GSK3:	quinase glicogênio sintase 3
<i>H19</i> :	gene supressor tumoral não traduzido
HAM:	hormônio anti-Mülleriano
IGF:	fator de crescimento semelhante à insulina
IC:	intervalo de confiança
IC_{50} :	concentração inibitória para 50% das células

<i>IGF-II</i> :	gene do fator de crescimento semelhante à insulina II
<i>IGF-IR</i> :	gene do receptor de IGF-I
IGFBP:	proteína de ligação de IGF
IRS:	substrato do receptor de insulina
MAPK:	proteína quinase ativada por mitógenos
MMP:	metaloproteinase
NF:	não funcionante
NVP-AEW541:	inibidor seletivo da atividade tirosina quinase do IGF-IR
o,p'-DDD:	mitotane
<i>p53</i> :	gene do supressor tumoral P53
<i>p57kip2</i> :	gene do inibidor da quinase dependente de ciclina
<i>PAX2</i> :	gene <i>paired-box</i>
PCR:	reação de polimerase em cadeia
PI3K:	fosfoinositol quinase 3
PSA:	antígeno específico prostático
RET:	receptor do GDNF
RNA:	ácido ribonucléico
RNA _m :	RNA mensageiro
RR	risco relativo
RT:	transcrição reversa
<i>SF-1</i> :	gene do fator esteroidogênico 1
SHC:	proteína de transformação contendo o domínio homólogo 2 Src
SOX9:	gene <i>SRY-box 9</i>
SRY:	fator determinante testicular codificado no cromossomo Y
StAR:	proteína regulatória aguda da esteroidogênese
URL:	unidades relativas de luz
VEGF:	fator de crescimento vascular endotelial
VHL:	supressor tumoral von Hippel-Lindau

<i>WNT-4:</i>	gene <i>wingless-type mouse mammary tumor virus integration site member 4</i>
<i>WT-1:</i>	gene 1 do tumor de Wilms
U/mL:	unidades por mililitro
ng/mL:	nanogramas por mililitro
ng/dL:	nanogramas por decilitro
μM:	micromolar
μg/dL:	microgramas por decilitro
μg/mL:	microgramas por mililitro

RESUMO

Resumo

Almeida MQ. *Expressão dos genes IGF-II, IGF-IR, SF-1 e DAX-1 em tumores adrenocorticais de crianças e adultos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 103p.

Introdução: A patogênese molecular dos tumores adrenocorticais é heterogênea e ainda pouco compreendida. A hiperexpressão do gene do fator de crescimento semelhante à insulina II (*IGF-II*) tem sido demonstrada na maioria dos carcinomas adrenocorticais em adultos. Os efeitos mitogênicos do IGF-II são mediados pela interação com o receptor de IGF-I (*IGF-IR*). Adicionalmente, o fator esteroidogênico 1 (*SF-1*) e o fator codificado por uma região crítica do cromossomo X associada ao sexo reverso e à hipoplasia adrenal congênita (*DAX-1*), ambos envolvidos no desenvolvimento e na esteroidogênese adrenal, também têm sido implicados na tumorigênese adrenocortical. **Objetivos:** Analisar a expressão gênica e a imunorreatividade dos fatores IGF-II, IGF-IR, SF-1 e DAX-1 em tumores adrenocorticais de crianças e adultos. Avaliamos ainda os efeitos de um inibidor seletivo do IGF-IR (NVP-AEW541) na proliferação celular e apoptose de linhagens celulares de tumores adrenocorticais. **Métodos:** Neste estudo, a expressão gênica foi determinada por PCR quantitativa em tempo real em 57 tumores adrenocorticais (37 adenomas e 20 carcinomas). Vinte e três pacientes tinham idade inferior ou igual a 15 anos. A análise de imunohistoquímica foi realizada em 109 tumores adrenocorticais (71 adenomas e 38 carcinomas). Os efeitos do tratamento com NVP-AEW541 (0,3 a 30 μ M) na proliferação celular e apoptose foram avaliados nas células NCI H295 de carcinoma adrenocortical humano e em uma nova linhagem celular estabelecida a partir de um adenoma adrenocortical pediátrico da nossa casuística. **Resultados:** A hiperexpressão do gene *IGF-II* foi evidenciada nos tumores adrenocorticais benignos e malignos de crianças (média $\pm$ EPM, 50,8 $\pm$ 18,5 vs. 31,2 $\pm$ 3,7, respectivamente; $p=0,23$). Em adultos, a expressão do gene *IGF-II* foi significativamente mais elevada nos carcinomas adrenocorticais quando comparada com os adenomas (270,5 $\pm$ 130,2 vs. 16,1 $\pm$ 13,3; $p=0,0001$). O percentual das células neoplásicas imunorreativas para o IGF-II não foi significativamente diferente entre os adenomas e carcinomas adrenocorticais pediátricos (14,1 $\pm$ 2,8% vs. 31,1 $\pm$ 13,1%, respectivamente; $p=0,32$). Em adultos, o percentual das células neoplásicas positivas para o IGF-II foi significativamente maior nos carcinomas adrenocorticais em relação aos adenomas (34,4 $\pm$ 5,8% vs. 14,2 $\pm$ 3,2, respectivamente; $p=0,03$). Os valores de RNAm do *IGF-IR* foram significativamente mais elevados nos carcinomas adrenocorticais pediátricos em relação aos adenomas (9,1 $\pm$ 1,2 vs. 2,6 $\pm$ 0,3; $p=0,0001$), enquanto a expressão deste receptor foi similar nos tumores adrenocorticais benignos e malignos de adultos (1,6 $\pm$ 0,3 vs. 1,8 $\pm$ 0,5, respectivamente; $p=0,75$). Os valores de RNAm do *IGF-IR* [risco relativo (RR) 2,0, intervalo de confiança (IC) de 95% 1,2 a 3,1; $p=0,004$] e os critérios histopatológicos de Weiss (RR

1,8, IC de 95% 1,2 a 2,7; $p= 0,003$) foram marcadores independentes de metástases em crianças e adultos, respectivamente. O NVP-AEW541 inibiu a proliferação celular estimulada por IGF-II de forma dose e tempo dependentes nas 2 linhagens celulares de tumores adrenocorticais através de uma significativa indução da apoptose. Adicionalmente, a hiperexpressão do gene *SF-1* foi identificada em 13% e 15% dos tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos, respectivamente. O percentual das células neoplásicas com imunorreatividade nuclear para *SF-1* foi significativamente maior nos tumores adrenocorticais pediátricos em relação aos tumores diagnosticados em adultos ($29,1 \pm 5,4\%$ vs. $8,3 \pm 2,3\%$, respectivamente; $p= 0,0001$). Estes dados indicam que o aumento da expressão do *SF-1* nos tumores adrenocorticais pediátricos ocorre em nível pós-traducional. A hiperexpressão do gene *DAX-1* foi identificada em 39% dos tumores adrenocorticais, com uma prevalência semelhante em crianças e adultos. De forma similar, o aumento da expressão da proteína *DAX-1* foi identificado em 36% e 27% dos tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos, respectivamente. A imunorreatividade nuclear para *DAX-1* foi semelhante nos adenomas e carcinomas adrenocorticais ($29,2 \pm 3,8\%$ vs. $21,4 \pm 5,8\%$ das células neoplásicas, respectivamente; $p= 0,12$). **Conclusões:** A hiperexpressão do IGF-II tem um papel relevante na tumorigênese adrenocortical. A hiperexpressão do gene *IGF-IR* foi um marcador biológico independente do carcinoma adrenocortical metastático em crianças. Os efeitos anti-tumorais *in vitro* do NVP-AEW541 sugerem que o IGF-IR constitui um potencial alvo terapêutico para o carcinoma adrenocortical humano. Adicionalmente, o aumento da expressão do *SF-1* foi evidenciado predominantemente nos tumores adrenocorticais pediátricos. A hiperexpressão do *DAX-1* constitui um evento importante na patogênese molecular dos tumores adrenocorticais benignos e malignos.

Descritores: 1. Neoplasias do Córtex Supra-Renal, 2. Expressão Gênica, 3. Fator de Crescimento Insulin-like II, 4. Receptor de IGF-I, 5. Fatores de Transcrição, 6. Proliferação de Células , 7. Apoptose

SUMMARY

Summary

Almeida MQ. *Expression of IGF-II, IGF-IR, SF-1 and DAX-1 genes in pediatric and adult adrenocortical tumors* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 103p.

Introduction: The molecular pathogenesis of adrenocortical tumors is heterogeneous and incompletely understood. Insulin-like growth factor II (IGF-II) overexpression has been demonstrated in adult adrenocortical carcinomas. IGF-II exerts its mitogenic effects through interaction with IGF-I receptor (IGF-IR). In addition, steroidogenic factor 1 gene (*SF-1*) and dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome gene (*DAX-1*), which regulate adrenal development and steroidogenesis, have been also involved in adrenocortical tumorigenesis.

Objectives: To analyze gene and protein expression of IGF-II, IGF-IR, *SF-1* and *DAX-1* in pediatric and adult adrenocortical tumors. We also evaluated the effects of a selective IGF-IR kinase inhibitor (NVP-AEW541) on adrenocortical tumor cell lines. **Methods:** Gene expression was determined by quantitative real-time PCR in 57 adrenocortical tumors (37 adenomas and 20 carcinomas) from 23 children and 34 adults. Twenty and three patients were younger than 15 years. A tissue microarray analysis was performed on a large cohort of 109 ACT (71 adenomas and 38 carcinomas; 39 children and 70 adults). In addition, the effects of NVP-AEW541 treatment (0.3 to 30 μ M) on proliferation and apoptosis were investigated in the NCI H295 cell line and in a new cell line established from a pediatric adrenocortical adenoma of our cohort. **Results:** *IGF-II* transcripts were overexpressed in pediatric adrenocortical carcinomas and adenomas (mean $\pm$ SE, 50.8 ± 18.5 vs. 31.2 ± 3.7 , respectively; $p = 0.23$). *IGF-II* gene expression was significantly higher in adult adrenocortical carcinomas than in adenomas (270.5 ± 130.2 vs. 16.1 ± 13.3 ; $p = 0.0001$). The percentual of neoplastic cells immunostaining for IGF-II was not statistically different between pediatric adrenocortical adenomas and carcinomas ($14.1 \pm 2.8\%$ vs. $31.1 \pm 13.1\%$, respectively; $p = 0.32$). Otherwise, the percentual of positive neoplastic cells for IGF-II was significantly higher in adult adrenocortical carcinomas than in adenomas ($34.4 \pm 5.8\%$ vs. 14.2 ± 3.2 , respectively; $p = 0.03$). *IGF-IR* mRNA levels were significantly higher in pediatric adrenocortical carcinomas than in adenomas (9.1 ± 1.2 vs. 2.6 ± 0.3 ; $p = 0.0001$), whereas similar *IGF-IR* expression levels were identified in adult adrenocortical carcinomas and adenomas (1.6 ± 0.3 vs. 1.8 ± 0.5 , respectively; $p = 0.75$). In a Cox multivariate analysis, *IGF-IR* gene expression [hazard ratio (HR) 2.0, 95% confidence interval (CI) 1.2 to 3.1; $p = 0.004$] and Weiss score (HR 1.7, 95% CI 1.2 to 2.7; $p = 0.003$) were independent biomarkers of metastasis in pediatric and adult adrenocortical tumors, respectively. Furthermore, NVP-AEW541 blocked cell proliferation in a dose- and time-dependent manner in both NCI H295 and pediatric adrenocortical cell lines through a significant increase of apoptosis. Additionally, *SF-1* gene overexpression was identified in 13% and 15% of

pediatric and adult adrenocortical tumors, respectively. The percentual of neoplastic cells with nuclear immunoreactivity for SF-1 was significantly higher in pediatric than in adult adrenocortical tumors ($29.1 \pm 5.4\%$ vs. $8.3 \pm 2.3\%$, respectively; $p= 0.0001$). These findings suggest that SF-1 overexpression occurs at the translational level in pediatric adrenocortical tumors. *DAX-1* gene overexpression was identified in 39% of adrenocortical tumors with a similar frequency in children and adults. Similarly, DAX-1 protein overexpression was identified in 36% and 27% of pediatric and adult adrenocortical tumors, respectively. DAX-1 immunostaining on nuclei was not statistically different in benign and malignant adrenocortical tumors ($29.2 \pm 3.8\%$ vs. $21.4 \pm 5.8\%$ of neoplastic cells, respectively; $p= 0.12$). **Conclusion:** IGF-II overexpression has a pivotal role to adrenocortical tumorigenesis. *IGF-IR* overexpression was a potential biomarker of metastases in children with adrenocortical carcinoma. We demonstrated that a selective IGF-IR kinase inhibitor had anti-tumor effects in adult and pediatric ACT cell lines, suggesting that IGF-IR inhibitors represent a promising therapy for human adrenocortical carcinoma. In addition, SF-1 overexpression might be mainly involved in pediatric adrenocortical tumorigenesis. DAX-1 overexpression has an important role to molecular pathogenesis of benign and malignant adrenocortical tumors.

Descriptors: 1. Adrenal Cortex Neoplasms, 2. Gene Expression, 3. Insulin-like Growth Factor II, 4. IGF-I Receptor, 5. Transcription Factors, 6. Cell Proliferation, 7. Apoptosis

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tumores adrenocorticais

Uma crescente prevalência dos tumores adrenocorticais tem sido observada na última década devido a maior utilização de métodos de imagem. Aproximadamente 6% dos pacientes submetidos a exames de imagem podem apresentar nódulos adrenocorticais como achado incidental (1). A prevalência média dos tumores adrenocorticais foi de 5,9% em 25 estudos de autópsia (2). A frequência dos nódulos adrenocorticais correlacionou-se com a idade, 0,2% em indivíduos com idade inferior a 30 anos e 6,9% acima de 70 anos (1). A maior parte destes tumores constituem adenomas adrenocorticais não funcionantes (3).

A neoplasia maligna do córtex adrenal corresponde a 0,05-2,0% de todos os cânceres, com uma incidência de 2 casos/milhão de pessoas/ano em adultos (2). A incidência dos tumores adrenocorticais pediátricos foi estimada em 0,3-0,38 casos/milhão de pessoas/ano em crianças abaixo de 15 anos. Contudo, uma incidência significativamente mais elevada dos tumores adrenocorticais tem sido evidenciada em crianças provenientes das regiões sul e sudeste do Brasil (4). O carcinoma adrenocortical apresenta uma distribuição bimodal, o primeiro pico ocorrendo antes dos 5 anos e o segundo na quarta e quinta décadas de vida (5). Em diversas séries, ocorre uma predominância do sexo feminino, correspondendo a 65-90% dos casos (6-10). A síndrome de Cushing está presente em 30-40% dos pacientes com

carcinoma adrenocortical. Virilização acomete aproximadamente 20-30% dos adultos com carcinoma adrenocortical e consiste na síndrome hormonal mais freqüente nas crianças (11).

Em 1984, Weiss (12) sugeriu a introdução de escores de malignidade baseados em critérios histopatológicos. Contudo, a determinação dos critérios histopatológicos não foi completamente reprodutível por outros patologistas (13). Outra limitação importante é a não aplicabilidade dos critérios de Weiss nos tumores adrenocorticais pediátricos. Diferentemente dos adultos, os tumores adrenocorticais pediátricos com prognóstico desfavorável baseado somente em critérios histopatológicos apresentam freqüentemente evolução clínica favorável (7, 14, 15). Portanto, os critérios definitivos de malignidade são a presença de invasão tecidual e de órgãos adjacentes ou metástases neste grupo.

O fator prognóstico mais relevante nos pacientes com tumor adrenocortical é o estadiamento, conforme proposto por MacFarlane (16) e modificado por Sullivan (17). A maioria dos pacientes encontra-se nos estágios III e IV ao diagnóstico, embora séries mais recentes tenham mostrado uma tendência ao diagnóstico mais precoce (18). A ressecção tumoral completa constitui a melhor chance de cura para o carcinoma adrenocortical em estágios precoces. Apesar da ressecção cirúrgica, virtualmente todos os pacientes com estágio III apresentam recorrência ou doença metastática dentro de 5 anos. O carcinoma adrenocortical possui um prognóstico desfavorável, com mortalidade de 15-47% em 5 anos (19).

A ressecção cirúrgica de recorrências locais ou doença metastática inicial é uma opção terapêutica aceitável, estando associada com aumento da sobrevida em estudos retrospectivos (20-22). Mitotane (o,p'-DDD) é o único agente adrenolítico disponível para o tratamento do carcinoma adrenocortical (23). Apesar de controlar o excesso de produção hormonal na maioria dos tumores adrenocorticais, regressões tumorais objetivas foram detectadas em apenas 25% dos pacientes em uso de mitotane (23). Protocolos de quimioterapia citotóxica têm sido usados no tratamento do carcinoma adrenocortical avançado, contudo os resultados são limitados (24-26). O protocolo italiano proposto por Berruti (cisplatina, etoposide e doxorubicina) produziu remissões parciais em 49% dos pacientes com carcinoma adrenocortical metastático (26). De forma similar, a terapia citotóxica com estreptozotocina e mitotane foi associada a respostas parciais em somente 36% dos casos (27). Desta forma, os protocolos atualmente disponíveis para o tratamento do carcinoma adrenocortical metastático são ineficazes e novas alternativas terapêuticas são necessárias.

1.2 Tumorigênese adrenocortical

A tumorigênese é um processo constituído de múltiplas etapas que determinam a transformação progressiva de células normais em células cancerosas (28). Estudos de clonalidade indicam que os carcinomas adrenocorticais são tumores monoclonais, enquanto que a maioria das lesões adrenocorticais benignas é policlonal (29, 30). O genótipo das células cancerosas resulta da manifestação de seis alterações essenciais que coletivamente proporcionam vantagens na sobrevivência celular: auto-suficiência de sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anti-proliferativos, escape da apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, além de invasão tecidual e metástases (28).

Aspectos moleculares envolvidos na tumorigênese adrenocortical têm sido amplamente investigados, contudo poucos marcadores moleculares mostraram-se úteis para o diagnóstico de malignidade, principalmente no grupo pediátrico (31-33). Estudos com hibridização genômica comparativa demonstraram o alto grau de instabilidade cromossômica presente nos tumores adrenocorticais, sobretudo nos carcinomas (34-39). Adicionalmente, estes estudos sugeriram diferentes mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese adrenocortical pediátrica (34-39).

Síndromes genéticas têm sido associadas a uma maior incidência de tumores adrenocorticais (11). A síndrome de Beckwith-Wiedemann, anormalidade do crescimento associada a perdas alélicas do cromossomo 11p15 e caracterizada por macrosomia neonatal, macroglossia e

onfalocele, possui uma maior incidência do tumor de Wilms e do carcinoma adrenocortical (40). A síndrome de Li-Fraumeni, que se caracteriza clinicamente pelo desenvolvimento de múltiplos tumores (carcinoma de mama, tumores cerebrais, sarcomas de partes moles e leucemia), também apresenta uma incidência aumentada do carcinoma adrenocortical. Mutações germinativas no gene *p53*, localizado no cromossomo 17p, foram encontradas em famílias acometidas por esta síndrome (41). Recentemente, uma alta incidência de uma única mutação germinativa do gene *p53* foi demonstrada em 35 de 36 tumores adrenocorticais esporádicos de crianças provenientes da região sul do Brasil (42). Esta mutação, localizada no exon 10 do gene *p53*, resulta na substituição do aminoácido arginina por histidina na posição 337 (Arg337His) do domínio de tetramerização da proteína. Esta mutação *missense* foi também estudada em outra casuística de pacientes brasileiros da região sudeste, sendo identificada em 78% das crianças e em 14% dos adultos com tumores adrenocorticais (43). Os tumores adrenocorticais associados à mutação germinativa Arg337His apresentaram uma alta frequência de inativação bialélica do gene *p53*, resultante da perda total do cromossomo 17. Entretanto, a perda total isolada do cromossomo 17 não se correlacionou com o comportamento agressivo dos tumores adrenocorticais. Por outro lado, a perda concomitante dos cromossomos 2, 9, 11 e 17 foi identificada somente nos carcinomas adrenocorticais (44).

As células adrenocorticais derivam de uma condensação de células do epitélio celômico (crista urogenital), a qual dá origem ao primórdio adrenogonadal e as estruturas renais (45). Diversas moléculas são

importantes para o desenvolvimento do primórdio adrenogonadal (Figura 1). Em particular, dois fatores de transcrição, o fator esteroidogênico 1 (SF-1) e um fator codificado por uma região crítica do cromossomo X associada ao sexo reverso e à hipoplasia adrenal congênita (DAX-1), são essenciais para o desenvolvimento e diferenciação adrenal e gonadal (46).

Figura 1. Organogênese adrenal. O desenvolvimento da crista urogenital resulta na formação do córtex adrenal, gônadas e rins. *HMA*, hormônio anti-Mülleriano; *DAX-1*, fator codificado por uma região crítica do cromossomo X associada ao sexo reverso e à hipoplasia adrenal congênita; *GDNF*, fator neurotrófico de derivação glial; *IGF-II*, fator de crescimento semelhante à insulina II; *IGF-IR*, receptor de IGF-I; *PAX2*, gene *paired-box 2*; *RET*, receptor do GDNF; *SF-1*, fator esteroidogênico 1; *SRY*, fator determinante testicular codificado no cromossomo Y; *SOX9*, gene *SRY-box 9*; *WNT-4*, *wingless-type mouse mammary tumor virus integration site member 4*; *WT-1*, gene 1 do tumor de Wilms.

Após 10-15 semanas de gestação, a glândula supra-renal fetal humana encontra-se aumentada desproporcionalmente e exibe intenso crescimento e atividade esteroidogênica em um compartimento cortical definido como zona fetal (45). A zona fetal representa 85% do córtex adrenal e exibe características de células secretoras de esteróides, principalmente sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) (45). Após o nascimento, ocorre remodelação significativa do córtex adrenal, incluindo apoptose da zona fetal e zoneamento definitivo (46). A manifestação precoce do tumor adrenocortical na infância, o predomínio do quadro clínico de virilização, assim como as características histopatológicas do tumor reforçam a idéia de que estes tumores originam-se a partir do córtex adrenal fetal (46).

Estudos funcionais demonstraram que a estabilidade do domínio de tetramerização do P53 contendo a mutação Arg337His é extremamente sensível a variações fisiológicas do pH (47). A glândula supra-renal sofre um remodelamento celular intenso durante o desenvolvimento perinatal, processo este que requer a integridade funcional dos mecanismos de apoptose. As células adrenais em apoptose apresentam um aumento do pH intracelular (~7,9) (48). No desenvolvimento adrenal, estes fatores podem colaborar para criar um ambiente celular favorável, caracterizado por um pH elevado, que desestabiliza o domínio de tetramerização mutante, levando a perda da função supressora tumoral do P53. Portanto, a disfunção do P53 dependente de pH representa uma das bases moleculares dos tumores adrenocorticais de crianças das regiões sul e sudeste do Brasil.

Estudos moleculares têm demonstrado o envolvimento da via de sinalização Wnt (*wingless-type mouse mammary tumor virus integration site member*) na patogênese de diversos tumores malignos (49, 50). A β -catenina, que atua na adesão intercelular e como um cofator de transcrição nuclear, tem um papel central nesta via de sinalização. Recentemente, mutações ativadoras da β -catenina foram identificadas em 28% dos tumores adrenocorticais, com igual prevalência em adenomas e carcinomas (51).

1.3 Fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II) e Receptor de IGF-I (IGF-IR)

A via de sinalização dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) tem uma importante função no crescimento e desenvolvimento celular normal. Os componentes do sistema IGF (IGFs, receptores e proteínas de ligação) são expressos em tecidos adrenocorticais fetais humanos (52). As concentrações circulantes e teciduais do fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II) reduzem significativamente no período pós-natal, o que sugere o seu envolvimento na regulação do desenvolvimento fetal (45). Weber *et al.* (53) demonstraram que o aumento da expressão do *IGF-II* em tecido adrenocortical foi associado à hiperplasia adrenocortical em camundongos adultos transgênicos.

O aumento da expressão do IGF-II foi observado em vários tumores embrionários (54-57), incluindo os tumores adrenocorticais (58). Alterações

específicas do *locus* 11p15, região na qual foi mapeado o gene *IGF-II*, foram descritas em tumores embrionários associados à síndrome de Beckwith-Wiedemann (40). Esta região contém um cluster de genes que sofrem *imprinting* parental, entre estes, o *IGF-II* que é transcrito a partir do alelo paterno (59). Outros genes neste *locus*, *H19* e *p57Kip2*, também sofrem *imprinting* parental, mas ao contrário do *IGF-II*, são expressos pelo alelo materno (60, 61). A transcrição do gene *H19* gera um microRNA, que atua como silenciador pós-transcricional do *IGF-II*, enquanto o gene *p57kip2* regula mecanismos do ciclo celular, ambos sendo considerados genes supressores tumorais (62, 63). A dissomia uniparental do *locus* 11p15 com anormalidade do *imprinting* genômico foi relacionada à síndrome de Beckwith-Wiedemann (64). Nesta dissomia uniparental, ocorre duplicação do alelo paterno e deleção do alelo materno, com expressão bialélica do *IGF-II* e silenciamento dos genes *H19* e *p57kip2*, o que predisporia a formação de tumores (Figura 2).

A dissomia uniparental do *locus* 11p15 foi inicialmente identificada em 37% dos tumores adrenocorticais esporádicos em adultos (65). Adicionalmente, a perda de heterozigose do *locus* 11p15 ou a hiperexpressão do gene *IGF-II* foram encontradas em 93% dos tumores adrenocorticais malignos e em 8,6% dos tumores adrenocorticais benignos em indivíduos adultos (31, 65, 66). Recentemente, estudos envolvendo perfil de expressão gênica (*microarray*) dos tumores adrenocorticais demonstraram o aumento da expressão do gene *IGF-II* em carcinomas adrenocorticais diagnosticados em pacientes adultos (32, 67, 68). Esta

hiperexpressão correlacionou-se com os critérios histopatológicos de Weiss neste grupo etário (32).

Figura 2. Representação esquemática da dissomia uniparental paterna do locus 11p15 com alteração do *imprinting* genômico observada em tumores embrionários e adrenocorticais. *H19* e *p57kip2*, genes supressores tumorais; *IGF-II*, fator de crescimento semelhante à insulina II. Os desenhos preenchidos representam os genes expressos e os não-preenchidos simbolizam os genes silenciados.

Apesar da hiperexpressão do gene *IGF-II* ter sido demonstrada em carcinomas adrenocorticais diagnosticados em adultos, poucos estudos avaliaram a sua importância na tumorigênese adrenocortical pediátrica (69, 70). Recentemente, West *et al.* (70) realizaram o primeiro estudo de perfil de expressão gênica em tumores adrenocorticais esporádicos de crianças, incluindo 5 adenomas e 18 carcinomas. Nesta série, a definição de malignidade foi baseada somente em critérios histopatológicos. O gene do receptor 4 do fator de crescimento de fibroblastos (*FGFR4*) e o gene *IGF-II*

foram significativamente mais expressos nas amostras tumorais em relação ao tecido adrenocortical normal, contudo a hiperexpressão destes genes foi similar entre os tumores adrenocorticais benignos e malignos (70).

Um alteração característica do padrão de proteínas de ligação de IGFs (IGFBPs) tem sido demonstrada nos carcinomas adrenocorticais, com concentrações de IGFBP-2 significativamente mais elevadas nos tumores adrenocorticais malignos em relação aos tumores benignos (71). Concentrações séricas elevadas de IGFBP-2 foram também encontradas em mais de 80% dos pacientes com carcinoma adrenocortical metastático (72). Embora concentrações elevadas de IGFBP-2 sejam um achado freqüente em tumores malignos (73), o significado desta alteração para o carcinoma adrenocortical permanece indefinido, já que acreditava-se que a IGFBP-2 fosse um modulador negativo do crescimento somático, principalmente em decorrência da sua ação em seqüestrar IGF-II (74).

O IGF-II é um potente estimulador do crescimento *in vitro* de linhagens de células tumorais adrenocorticais (75). O peptídeo mitogênico IGF-II exerce a sua bioatividade autócrina e parácrina através da interação com o receptor de IGF-I (IGF-IR) (75). O IGF-II também pode se ligar ao IGF-IIR (receptor manose-6-fosfato), cuja função não está totalmente definida, mas parece regular a degradação e a biodisponibilidade do IGF-II (76). Conseqüentemente, a hiperexpressão do IGF-II ou do seu receptor (IGF-IR) pode ativar uma seqüência de eventos intracelulares, que promovem a inibição da apoptose, estímulo da mitogênese e angiogênese, além de contribuir para o desenvolvimento de metástases (Figura 3) (77,

78). Contudo, o envolvimento do gene *IGF-IR* na tumorigênese adrenocortical não foi extensivamente determinado.

Figura 3. Efeitos biológicos desencadeados pela via de sinalização do IGF-IR. IGF-II, fator de crescimento semelhante à insulina tipo II; IGF-IR, receptor de IGF-I; IGFBPs, proteínas de ligação de IGFs; PSA, antígeno específico prostático; WT, gene do tumor de Wilms; BRCA, gene supressor de câncer de mama; VHL, gene supressor tumoral von Hippel-Lindau; IRS, substrato do receptor de insulina; SHC, proteína de transformação contendo o domínio homólogo 2 Src; Casp3, caspase 3; Bax e Bad, proteínas pró-apoptóticas da família bcl-2; Fas, receptores da morte; PI3K, fosfoinositol quinase 3; AKT, proteína quinase B; IKKs, quinases I κ B; NFK_B, fator nuclear K_B; FKHR, fator de transcrição forkhead; GSK3, quinase glicogênio sintase 3; MAPK, proteína quinase ativada por mitógenos; MMP, metaloproteinase; uPA, ativador de plasminogênio tipo uroquinase; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial.

A apoptose pode ser deflagrada através de duas vias de sinalização: extrínseca e intrínseca (79). A via extrínseca é ativada a partir de receptores da morte Fas, que pertencem à superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (80). A via intrínseca estimula a liberação citoplasmática do citocromo-c mitocondrial, promovendo assim a ativação da caspase-9. A via intrínseca é regulada principalmente pela família de proteínas bcl-2, que inclui um grupo de proteínas pró-apoptóticas (Bad, Bax, entre outras) (81). A ativação do IGF-IR promove a fosforilação da fosfoinositol 3 quinase (PI3K) com conseqüente inibição das proteínas pró-apoptóticas Bad e Bax. Desta forma, o IGF-IR está envolvido no controle da via intrínseca da apoptose (78). As vias extrínseca e intrínseca convergem para a ativação das caspases efetoras finais (caspases 3 e 7) (Figura 4) (79).

Recentemente, inibidores seletivos da atividade tirosina quinase do IGF-IR têm sido considerados como uma nova abordagem para o tratamento de diversas neoplasias malignas (78). Um inibidor seletivo da atividade tirosina quinase do IGF-IR (NVP-AEW541) foi capaz de efetivamente inibir a autofosforilação do IGF-IR, assim como a fosforilação da proteína quinase B (AKT) e da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (82, 83). Os efeitos anti-tumorais do NVP-AEW541 foram avaliados em modelos de xenotransplante de sarcoma em camundongos (82, 83).

Figura 4. Mecanismos de ativação das vias extrínseca e intrínseca da apoptose. FADD, domínio dos receptores da morte Fas; IGF-IR, receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I); IRS, substrato do receptor de insulina; PI3K, fosfoinositol quinase 3; AKT, proteína quinase B; Bad, Bax e Bid; proteínas pró-apoptóticas da família bcl-2.

1.4 Fator esteroideogênico 1 (SF-1)

O SF-1, membro órfão da superfamília dos receptores nucleares, foi identificado inicialmente como fator de transcrição regulador da região promotora proximal de diversas enzimas esteroideogênicas do citocromo P450 (84). Posteriormente, vários estudos mostraram que o SF-1 atua em vários níveis do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, regulando a expressão de genes que controlam a esteroideogênese e a reprodução (85). O SF-1 possui um domínio clássico de ligação ao DNA contendo dedos de zinco na região

amino-terminal, e outro domínio conservado na região carboxi-terminal (85). O SF-1 contém uma região ativadora entre os domínios de ligação, que é somente fosforilada pela MAPK (Erk2) e facilita o recrutamento de cofatores, incluindo coativadores e correpressores (86). Além do córtex adrenal, o SF-1 também é expresso em gonadotrofos e no núcleo hipotalâmico ventromedial (85).

O fenótipo das mutações inativadoras do gene *SF-1* em humanos demonstraram a importância deste fator de transcrição no desenvolvimento e função endócrina. A primeira mutação, substituição do aminoácido glicina por glutamato na posição 35 do SF-1, foi identificada em uma paciente com insuficiência adrenal e sexo reverso XY com disgenesia gonadal bilateral (87). Posteriormente, a identificação de uma microdeleção de 8 pb no gene *SF-1* em uma paciente com sexo reverso XY e função adrenal normal demonstrou que o efeito negativo de mutações do SF-1 pode afetar diferentemente a atividade transcricional gonadal e adrenal (88).

Embora a formação do primórdio adrenogonadal ocorra na ausência do SF-1, eventos subseqüentes são interrompidos por apoptose em ratos deficientes deste fator, levando a agenesia adrenal e morte pós-natal por insuficiência adrenal (89, 90). O SF-1 mostrou-se também essencial para o crescimento adrenal residual após adrenalectomia unilateral em estudo com camundongos adultos heterozigotos para deficiência deste fator de transcrição (*Sf-1*^{+/-}) (91). Estas observações sugeriram que o SF-1 regula a expressão de genes que controlam a proliferação celular e apoptose no córtex adrenal. O gene *SF-1* localiza-se no *locus* 9q33.3, região

cromossômica na qual foi demonstrado ganho e amplificação em tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças (35, 36). Recentemente, a amplificação do gene *SF-1* foi evidenciada por hibridização *in situ* e detecção por fluorescência (FISH) em 8 de 9 tumores adrenocorticais de crianças brasileiras, sugerindo uma associação entre o aumento do número de cópias deste gene e a tumorigênese adrenocortical (92). Adicionalmente, um aumento da expressão da proteína SF-1 foi evidenciado nestes casos (93).

Estudo de imunohistoquímica para o SF-1 evidenciou imunoreatividade em amostras de tecidos adrenocorticais normais e patológicos (5 adenomas não funcionantes, 3 adenomas produtores de cortisol, 6 aldosteronomas e 5 carcinomas adrenocorticais) (94). Apesar da associação sugerida entre o SF-1 e a tumorigênese adrenocortical, a expressão deste fator de transcrição foi determinada somente em séries com número reduzido de tumores adrenocorticais (93, 94).

1.5 Fator codificado por uma região crítica do cromossomo X associada ao sexo reverso e à hipoplasia adrenal congênita (DAX-1)

O gene *DAX-1*, mapeado no *locus* Xq22, codifica um receptor nuclear órfão contendo um domínio conservado de ligação ao DNA, mas sem a presença de dedos de zinco (95). O papel deste fator de transcrição no desenvolvimento adrenal foi inicialmente demonstrado em pacientes com

mutações inativadoras do gene *DAX-1*, que apresentaram hipoplasia adrenal congênita ligada ao X, caracterizada por ausência da zona definitiva e persistência da zona adrenal fetal (96, 97).

O DAX-1 liga-se ao DNA e atua como repressor da transcrição de outros receptores nucleares (98). A expressão aumentada do DAX-1 em linhagem celulares de tumores adrenocorticais suprime a expressão gênica da proteína regulatória aguda da esteroidogênese (StAR), diminuindo de forma significativa a secreção de esteróides (96). Evidências cumulativas têm demonstrado o papel repressor do DAX-1 sobre a transcrição mediada por SF-1 no córtex adrenal, provavelmente através do recrutamento de correpressores para o complexo transcricional (96, 99-102). O SF-1 regula positivamente a expressão de todas as enzimas esteroidogênicas envolvidas na produção de cortisol e aldosterona (incluindo StAR, 11-hidroxilase e 17-hidroxilase), exceto a aldosterona sintetase (103-111).

A expressão do gene *DAX-1* foi analisada pela técnica de *Northen blot* em amostras de tecidos adrenocorticais normais e patológicos (3 adenomas não funcionantes, 8 adenomas produtores de cortisol, 11 aldosteronomas e 5 carcinomas). A expressão do gene *DAX-1* foi mais elevada em tumores não funcionantes, baixa ou indetectável em aldosteronomas, intermediária em adenomas produtores de cortisol e heterogênea no grupo de carcinomas (112). Posteriormente, foi demonstrado que a expressão da proteína DAX-1 em adenomas produtores de cortisol está significativamente reduzida, resultando em aumento da atividade da enzima 17-hidroxilase (113). Em contraste, Bassett *et al.* (114)

mostraram valores de RNAm elevados dos genes *SF-1* e *DAX-1* em adenomas produtores de cortisol e aldosterona quando comparados com tecidos adrenocorticais normais. Desta forma, a relação entre SF-1, DAX-1 e atividade esteroidogênica em tumores adrenocorticais ainda permanece controversa. Embora o DAX-1 seja um importante fator de transcrição envolvido na organogênese adrenal e tenha uma ação repressora sobre a atividade transcricional do SF-1, o seu papel na tumorigênese adrenocortical de crianças e adultos não foi extensivamente estudado.

2. OBJETIVOS

- Determinar a expressão gênica e a imunorreatividade dos fatores IGF-II, IGF-IR, SF-1 e DAX-1 em tumores adrenocorticais benignos e malignos de crianças e adultos.
- Correlacionar os dados de expressão com as características hormonais, o diagnóstico histológico e a evolução dos tumores adrenocorticais.
- Avaliar os efeitos *in vitro* do inibidor seletivo do IGF-IR (NVP-AEW541) na proliferação celular e apoptose de linhagens celulares de tumores adrenocorticais humanos.

3. MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo no. 187/06). Após consentimento informado por escrito, obtivemos amostra de tecido tumoral dos pacientes. As avaliações hormonais e os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM 42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas, FMUSP.

3.1. Pacientes

Cinquenta e sete pacientes não relacionados, adultos ou crianças de ambos os sexos, com tumor adrenocortical foram estudados. Os tumores adrenocorticais esporádicos foram diagnosticados em 23 crianças (7 meninos e 16 meninas; 0,9 a 15 anos) e 34 adultos (4 do sexo masculino e 30 do sexo feminino; 18 a 66 anos). O período médio de seguimento foi de $57,8 \pm 6,2$ meses. Os pacientes foram submetidos à avaliação hormonal e realização de exames de imagem (ultrassonografia, tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética). O diagnóstico de tumor adrenocortical funcionante foi estabelecido a partir da determinação do cortisol urinário em amostras de 24h, avaliação da supressão do cortisol

sérico após 1 mg de dexametasona, concentrações plasmáticas de ACTH, andrógenos (testosterona, androstenediona, DHEA e seu composto sulfatado), precursores esteroidais (17-hidroxiprogesterona e 11-deoxicortisol), estradiol, aldosterona e atividade plasmática de renina. Síndrome de Cushing (41%) foi a manifestação clínica mais freqüente nos adultos com tumores adrenocorticais, enquanto síndrome virilizante (67%) constituiu a apresentação clínica mais comum no grupo pediátrico (Tabela 1).

Tabela 1. Características clínicas de 57 pacientes com tumores adrenocorticais.

	Crianças		Adultos	
	Adenomas (n= 17)	Carcinomas (n= 6)	Adenomas (n= 20)	Carcinomas (n=14)
Idade (anos) ^(A)	2,6 ± 0,5	5,0 ± 2,2	36,8 ± 2,4	32,2 ± 3,8
Sexo (F:M)	2,4:1	2:1	19:1	2,5:1
Seguimento (meses) ^(A)	68,1 ± 11,4	33,7 ± 13,3	73,1 ± 10,9	33,9 ± 10,3
Síndrome clínica <i>n</i>				
Cushing	1	0	12	2
Virilizante	12	3	2	3
Mista	4	3	1	5
Não funcionante	0	0	5	4

(A): Média ± EPM

O prognóstico dos pacientes foi avaliado a partir do estadiamento proposto pela Organização Mundial de Saúde (Anexo A), adaptado de Sullivan (17). Os tumores adrenocorticais em pacientes adultos foram classificados de acordo com os critérios histopatológicos de Weiss (Anexo

B): 20 adenomas adrenocorticais (escore de Weiss ≤ 3) e 14 carcinomas adrenocorticais (escore de Weiss ≥ 4) (12). No grupo pediátrico, observamos que 54% dos tumores adrenocorticais (7 de 13) com escore de Weiss > 3 apresentaram evolução clínica benigna, confirmando que os critérios histopatológicos de Weiss não são preditivos de malignidade em crianças (7, 15). Conseqüentemente, o diagnóstico definitivo de malignidade foi estabelecido em 6 de 23 tumores adrenocorticais a partir de um estadiamento avançado (III ou IV) ou evolução clínica desfavorável. O gene supressor tumoral *p53* foi estudado previamente em 22 crianças e 26 adultos com tumores adrenocorticais. A mutação germinativa Arg337His do *p53* foi identificada em 77% e 12% das crianças e adultos, respectivamente. As características clínicas e histopatológicas dos tumores adrenocorticais em criança e adultos estão descritas nos anexos C e D, respectivamente.

3.2 Estudo Molecular

3.2.1 Extração de RNA

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 (Figura 5). A relação de absorbância $A_{260/280}$ foi maior que 1,7 em todas as amostras. As concentrações das amostras de RNA total foram determinadas em espectrofotômetro. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por transcrição reversa (RT) utilizando-se o produto comercial *High Capacity* (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA).

Tumores Adrenocorticais

Figura 5. Eletroforese de gel de agarose 1% revelando a intensidade das bandas das subunidades 18S e 28S do RNA total extraído das amostras tumorais.

3.2.2 RT-PCR quantitativa em tempo real

A quantificação do cDNA foi realizada no aparelho ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) utilizando-se ensaios 5' nuclease do sistema Taqman (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). Os ensaios Taqman para os genes alvos (*IGF-II*, Hs01005963_m1; *IGF-IR*, Hs00181385_m1; *SF-1*, Hs00610436_m1; *DAX-1*, Hs00230864_m1) e

endógeno (β -actin, 43263) continham oligonucleotídeos iniciadores exônicos e sondas específicas interexônicas para o fragmento amplificado, que garantiram a não amplificação de DNA genômico. As sondas dos genes alvos foram marcadas com a fluorescência FAM, enquanto a sonda da β -actina foi marcada com VIC. Estas sondas incitam comprimentos de ondas distintos, que emitem sinais captados pelo aparelho.

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 min, seguida de 50 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 10 min. A amplificação dos genes alvos foi normalizada pelas condições de amplificação da β -actina (controle endógeno) em cada amostra tumoral. Um grupo comercial de 61 tecidos adrenocorticais normais (*Human Adrenal Gland Total RNA*, Clontech, Palo Alto, CA, USA) foi utilizado como amostra de referência na análise da quantificação relativa. A quantificação relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (115), onde o ΔC_T representa a diferença de expressão entre o gene alvo e o endógeno de uma determinada amostra (tumor ou calibrador) e o $\Delta\Delta C_T$ corresponde a 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. A hiperexpressão gênica foi definida como um valor de expressão ≥ 2 .

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 foram comparáveis (inclinação da reta $< 0,1$). A eficiência de amplificação dos genes *IGF-II* e *IGF-IR* (Figura 6) e dos genes *SF-1* e *DAX-1* (Figura 7) foram comparáveis à da β -actina somente nas reações em *singleplex* (oligonucleotídeos e sondas do gene alvo e endógeno em poços distintos). Nas reações em *multiplex*, evidenciamos que a amplificação dos genes alvos interferiu com a amplificação da β -actina. Desta forma, as reações de amplificação em triplicata foram realizadas em *singleplex*.

Figura 6. Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* dos genes alvos (A, *IGF-IR*; B, *IGF-II*) em relação à β -actina.

Figura 7. Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* dos genes alvos (A, *SF-1*; B, *DAX-1*) em relação à β -actina.

A variabilidade da expressão da β -actina nos tecidos tumorais foi avaliada pelo cálculo $2^{-\Delta C_T}$, onde o ΔC_T representa a diferença do C_T da β -actina na amostra tumoral em relação ao grupo de tecidos adrenocorticais normais (116). Idealmente, o valor obtido para cada amostra deve ser 1, o que significa que a expressão da β -actina é igual no tecido tumoral e normal. A média dos valores de expressão da β -actina nos 57 tecidos

tumorais foi $1,2 \pm 0,1$, indicando que a β -actina é um gene endógeno adequado para a análise de expressão gênica em tumores adrenocorticais.

3.3 Micromatriz tecidual (TMA) e imunohistoquímica

Foram selecionados 109 casos de tumores adrenocorticais, no período de 1979 a 2007 (Tabela 2). 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 através 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 (TMA) com 12 linhas e 10 colunas. No total, o TMA construído contém 120 posições (109 amostras de 109 casos, com 01 amostra por caso). Duas amostras de tecido adrenocortical normal e um espaço em branco foram usados 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, Singapura*). Outros dois blocos de TMA semelhantes foram feitos, obtendo-se uma triplicata (blocos de TMA

número T0113, T0114 e T0115) (Figura 8). A perda de representação das amostras tumorais nos blocos de TMA foi de 8%. Um bloco adicional de TMA controle, constituído de tecidos adrenocorticais normais de uma criança e 5 adultos, foi construído.

Tabela 2. Características clínicas de 109 pacientes com tumores adrenocorticais.

	Crianças		Adultos	
	Adenomas (n= 31)	Carcinomas (n= 8)	Adenomas (n= 40)	Carcinomas (n=30)
Idade (anos) ^(A)	3,2 ± 0,6	4,6 ± 1,6	39 ± 2,2	36,1 ± 2,5
Sexo (F:M)	2,1:1	1,7:1	12,3:1	4:1
Seguimento (meses) ^(A)	104 ± 13	28,8 ± 10,4	67,9 ± 8,9	56,7 ± 12,4
Síndrome clínica <i>n</i>				
Cushing	3	0	25	7
Virilizante	19	3	2	4
Mista	9	5	1	12
Não funcionante	0	0	12	7

(A): Média ± EPM

Figure 8. Foto panorâmica de lâminas com corte histológico dos blocos de micromatriz tecidual (TMA T0113, T0114 e T0115), coradas pela Hematoxilina e Eosina.

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 imunoperoxidase com recuperação antigênica pelo calor úmido ou digestão enzimática modificada (117). A técnica consistiu 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 os anticorpos anti-DAX-1 e anti-SF-1) em panela a vapor por 40 min a cerca de 95 °C, ou recuperação por digestão enzimática com tripsina (0,6 mg/mL) em tampão PBS pH 7,8 com CaCl₂ (1,54 mg/mL) por 20 min a 37 °C (para o anticorpo anti-IGF-II). 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 3 vezes por 10 min em temperatura ambiente (esta etapa foi realizada antes da recuperação antigênica para as lâminas tripsinizadas). Após lavagens em PBS pH 7,4, realizou-se bloqueio inespecífico de carga com CASBlock™ (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) por 10 min a 37 °C. Após retirada do excesso, cada conjunto de três lâminas foi incubado por 30 min a 37 °C, seguida por incubação *overnight* a 4 °C, com um dos anticorpos primários, em título definido previamente no laboratório com controles positivos (Tabela 3). Para a análise imunohistoquímica do IGF-IR, utilizamos 3 anticorpos comercialmente disponíveis, contudo não foi detectada presença de imunorreatividade mesmo em controles positivos (adenocarcinoma de mama e cólon). Em um conjunto extra de três lâminas omitiram-se 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, UK*) de tipo polímero curto acoplado a peroxidase por 30 min 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 5 min 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*).

Tabela 3. Anticorpos utilizados para a análise imunohistoquímica.

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Título	Compartimento celular relevante
Anti-DAX-1	K17 (Policlonal)	<i>Santa Cruz</i>	1:400	Nuclear
Anti-SF-1	N1665 (Monoclonal)	<i>R&D Systems</i>	1:600	Nuclear
Anti-IGF-II	W3D9 (Monoclonal)	<i>Abcam</i>	1:200	Citoplasmático
Anti-IGF-IR	C20 (Policlonal)	<i>Santa Cruz</i>	1:400	Membrana
	24-31 (Monoclonal)	<i>Chemicon</i>		
	Subunidade α (Policlonal)	<i>Milipore</i>		

Em cada cilindro de amostras tumorais, foram avaliados os compartimentos celulares relevantes para cada anticorpo, utilizando-se as faixas percentuais descritas na Tabela 4. Como cada reação foi analisada em triplicata, a média dos três valores obtidos representa o percentual de

imunorreatividade de cada amostra de tumor adrenocortical analisado. As perdas das amostras tumorais durante a confecção dos blocos de TMA totalizaram 8%.

Tabela 4. Faixas percentuais de imunorreatividade utilizadas para avaliação quantitativa.

Faixa	Descrição
0 %	0 a 9 % das células neoplásicas imunorreativas para o antígeno
10 %	10 a 19 % das células neoplásicas imunorreativas para o antígeno
20 %	20 a 29 % das células neoplásicas imunorreativas para o antígeno
30 %	30 a 39 % das células neoplásicas imunorreativas para o antígeno
40 %	40 a 49 % das células neoplásicas imunorreativas para o antígeno
50 %	50 a 59 % das células neoplásicas imunorreativas para o antígeno
60 %	60 a 69 % das células neoplásicas imunorreativas para o antígeno
70 %	70 a 79 % das células neoplásicas imunorreativas para o antígeno
80 %	80 a 89 % das células neoplásicas imunorreativas para o antígeno
90 %	90 a 99 % das células neoplásicas imunorreativas para o antígeno
100 %	100% das células neoplásicas imunorreativas para o antígeno

3.4 Linhagens celulares de tumores adrenocorticais

A linhagem NCI H295, previamente estabelecida a partir de um carcinoma adrenocortical invasivo não funcionante diagnosticado em uma paciente de 48 anos, foi gentilmente cedida pelo Prof. Walter Miller (*Stanford University, San Francisco CA, USA*) (118). A linhagem do adenoma adrenocortical pediátrico foi estabelecida no Laboratório da Profa. Dra. Claudimara Lotfi (Laboratório de Estrutura e Função Celular, Instituto

de Ciências Biomédicas, USP) a partir de um adenoma adrenocortical (paciente 15, peso 10 g, estágio I, Anexo C) diagnosticado em uma paciente de 1 ano e 2 meses com síndrome mista (síndrome de Cushing e virilizante). As linhagens celulares dos tumores adrenocorticais foram incubadas a 37 °C em ambiente umidificado com 5% de CO₂ e mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, USA*), suplementado com 10% de albumina bovina fetal e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL). As células em cultura do adenoma adrenocortical pediátrico apresentaram uma aparência de fibroblastos quando coradas com Hematoxilina e Eosina e visualizadas através da microscopia em campo invertido (Figuras 9A e 9B). A imunorreatividade para melan-A foi positiva em 100% das células neoplásicas em cultura do adenoma adrenocortical pediátrico (Figuras 9C e 9D). Melan-A, um fator de diferenciação melanocítica, é um marcador útil de neoplasias produtoras de esteróides, como os tumores adrenocorticais (119). A imunorreatividade para vimetina foi detectada em 100% das células neoplásicas, o que sugere que esta cultura originou-se a partir de um único tipo celular isolado dos fragmentos tumorais (Figuras 9E e 9F). Adicionalmente, a expressão gênica de enzimas esteroidogênicas (3β-hidroxi-esteróide desidrogenase, 11β-hidroxilase e 21α-hidroxilase) foi detectada por PCR em tempo real. Esta linhagem celular encontra-se aproximadamente no 8° subcultivo. Os experimentos *in vitro* e as dosagens esteroidais foram realizados no 5° subcultivo desta linhagem celular.

Figura 9. Linhagem adrenocortical estabelecida a partir de um adenoma adrenocortical pediátrico. Microscopia em campo invertido (A, magnificação de 10x). Coloração Hematoxilina & Eosina (B). Imunorreatividade para melan-A detectada em 100% das células neoplásicas (C, imuno-expressão para melan-A; D, controle negativo). A imunorreatividade para vimetina foi detectada em 100% das células neoplásicas (E, imuno-expressão para vimetina; F, controle negativo).

As células da linhagem do tumor adrenocortical pediátrico mantiveram em cultura a capacidade de secreção de esteróides: cortisol 238 µg/dL, testosterona 1098 ng/dL, androstenediona > 8,5 ng/mL and 17-OH

progesterona > 20 ng/mL. Os esteróides foram determinados após 5 dias de subcultivo por ensaios comerciais: cortisol e testosterona, ensaio fluorométrico (*AutoDELFIA, Wallac Oy, Turku, Finland*); androstenediona, imunoensaio enzimático quimioluminescente (*Immulite 2000, Los Angeles, CA, USA*); 17-hidroxiprogesterona, radioimunoensaio (*DSL, Webster, TX, USA*).

3.4.1 Inibidor seletivo do IGF-IR (NVP-AEW541)

NVP-AEW541, um derivado pirrolo[2,3-*d*]pirimidina que compete com a ligação do ATP e seletivamente inibe o IGF-IR, foi gentilmente fornecido pela *Novartis Pharma (Basel, Switzerland)* (82). A droga foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) e mantida a -20 °C. As concentrações finais de DMSO foram menores que 0,3% nos meios de cultura e não apresentaram nenhum efeito inibitório sobre a viabilidade celular.

3.4.2 Ensaios de proliferação celular e apoptose

O gene *IGF-IR* foi expresso nas células NCI H295 ($1,5 \pm 0,3$) e nas células do adenoma adrenocortical pediátrico ($0,4 \pm 0,06$), enquanto o gene *IGF-II* apresentou uma expressão maior nas células NCI H295 ($42,4 \pm 12,5$) em relação às células do adenoma adrenocortical pediátrico ($4,5 \pm 1,1$).

As duas linhagens adrenocorticais foram cultivadas em placas de 96 poços em uma densidade de 20.000 células/poço. Após 24 horas de jejum em meio livre de hormônios, as células foram tratadas com DMEM sem NVP-AEW541 (controle) ou com concentrações crescentes do NVP-AEW541 (0,3, 1,0, 3,0, 10 e 30 μ M).

As culturas celulares tratadas com NVP-AEW541 e não tratadas (controles) foram cultivadas na presença e ausência de estímulo exógeno com IGF-II (50 ng/mL; *R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*), a fim de avaliar a capacidade do NVP-AEW541 em inibir a proliferação celular estimulada por IGF-II. Após 24 a 96 horas, as células adrenocorticais foram incubadas com *CellTiter 96® AQueous One Solution* (*Promega, Madison, WI, USA*) por 3 horas. A intensidade da reação colorimétrica foi mensurada em um leitor de Elisa utilizando um comprimento de onda de 450 nm.

O ensaio de proliferação celular *CellTiter 96® AQueous One Solution* baseia-se na bioedução do composto tetrazólio em formazan, solúvel no meio de cultura. Esta reação de redução é realizada somente por células viáveis. Desta forma, a viabilidade celular é diretamente proporcional à absorbância do formazan mensurada no meio.

A análise da apoptose foi baseada na determinação da atividade das caspases 3 e 7 após o tratamento com NVP-AEW541 (0,3 a 30 μ M). As células tratadas com NVP-AEW541 ou não tratadas (controles) foram incubadas com o ensaio *Caspase-Glo® 3/7* (*Promega, Madison, WI, USA*) após 3 a 9 horas de tratamento. Este ensaio contém um substrato luminescente para as caspases 3 e 7. Após a clivagem pelas caspases, um

substrato para luciferase é liberado (luciferina), com uma subsequente reação enzimática e produção de luz. Após uma hora de incubação, a intensidade do sinal luminescente mensurada em luminômetro é proporcional à atividade das caspases 3 e 7.

3.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS (SPSS 13.0; SPSS, Inc., Chicago, IL). As variáveis contínuas foram expressas com média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os valores de expressão dos genes nos tumores adrenocorticais benignos e malignos foram analisadas pelo teste de *Mann-Whitney U*. A comparação dos dados de expressão envolvendo mais de 2 grupos foram analisadas pelo teste de *Kruskal-Wallis*. Os fatores preditivos de metástases foram identificados pelo modelo de regressão de Cox, que foi aplicado para estimar o risco relativo e seu intervalo de confiança (IC). O tempo do evento (metástases) foi definido como o tempo entre o diagnóstico do tumor primário e o surgimento do primeiro sítio metastático. Inicialmente, as variáveis moleculares e clínico-patológicas que foram significativas na análise univariada foram selecionadas para análise adicional. O modelo multivariado foi realizado utilizando-se o procedimento *forward stepwise*, no qual as variáveis mais significativas são introduzidas progressivamente na análise (entra se $p \leq 0,05$ e sai se $p > 0,1$). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

As medidas de absorbância e luminescência nas diversas concentrações e tempos de tratamento foram comparadas por análise de variância (ANOVA, dois caminhos), seguida do teste de Bonferroni. O valor de significância para o teste de Bonferroni foi ajustado para 0,0024. A concentração inibitória para 50% das células (IC_{50}) foi calculada no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Expressão dos genes *IGF-II* e *IGF-IR* em tumores adrenocorticais

A hiperexpressão do gene *IGF-II* foi evidenciada nos tumores adrenocorticais benignos e malignos de crianças (média $\pm$ EPM, $50,8 \pm 18,5$ vs. $31,2 \pm 3,7$, respectivamente; $p = 0,23$). Em adultos, os valores de RNAm do gene *IGF-II* foram significativamente mais elevados nos carcinomas adrenocorticais quando comparados com os adenomas ($270,5 \pm 130,2$ vs. $16,1 \pm 13,3$; $p = 0,0001$) (Figura 9).

Figura 10. Expressão do gene *IGF-II* em 57 tumores adrenocorticais esporádicos de crianças (A) e adultos (B). Eixo Y, expressão do gene *IGF-II* nos tumores adrenocorticais em relação à média de expressão deste gene no grupo de tecidos adrenocorticais normais. A linha horizontal do *box plot* representa a mediana, os limites referem-se aos percentis 25 e 75 e as barras incluem os percentis de 10 a 90 dos valores de RNAm.

† mediana (variação)

Os valores de RNAm do gene *IGF-IR* foram significativamente mais elevados nos carcinomas adrenocorticais de crianças em relação aos adenomas ($9,1 \pm 1,2$ vs. $2,6 \pm 0,3$; $p = 0,0001$), enquanto a expressão deste receptor foi similar nos tumores adrenocorticais benignos e malignos de adultos ($1,6 \pm 0,3$ vs. $1,8 \pm 0,5$, respectivamente; $p = 0,75$) (Figura 10).

Figura 11. Expressão do gene *IGF-IR* em 57 tumores adrenocorticais esporádicos de crianças (A) e adultos (B). Eixo Y, expressão do gene *IGF-IR* nos tumores adrenocorticais em relação a média de expressão deste gene no grupo de tecidos adrenocorticais normais. A linha horizontal do box plot representa a mediana, os limites referem-se aos percentis 25 e 75 e as barras incluem os percentis de 10 a 90 dos valores de RNAm.

† mediana (variação)

A imunorreatividade para IGF-II foi negativa no córtex de glândulas supra-renais normais obtidas de uma criança e 5 adultos. O percentual das células neoplásicas imunorreativas para IGF-II não foi significativamente diferente entre os adenomas e carcinomas adrenocorticais pediátricos [$14,1 \pm 2,8\%$ ($n=30$) vs. $31,1 \pm 13,1\%$ ($n=6$), respectivamente; $p = 0,32$]. Nos

tumores adrenocorticais diagnosticados em adultos, o percentual das células neoplásicas positivas para IGF-II foi significativamente maior nos carcinomas em relação aos adenomas adrenocorticais [$34,4 \pm 5,8\%$ (n=25) vs. $14,2 \pm 3,2\%$ (n=39), respectivamente; $p= 0,03$] (Figura 12).

Figura 12. Imunohistoquímica para IGF-II em tumores adrenocorticais. A, adenoma adrenocortical, diagnosticado em um paciente adulto com síndrome de Cushing, com 0% das células neoplásicas positivas para IGF-II (400x). B, carcinoma adrenocortical produtor de cortisol e andrógenos, diagnosticado em uma paciente de 49 anos, com 10% das células neoplásicas positivas para IGF-II no citoplasma (400x). C, adenoma adrenocortical não funcionante apresentando 50% das células neoplásicas imunorreativas para IGF-II (400x). D, carcinoma adrenocortical não funcionante, diagnosticado em um paciente de 54 anos, apresentando 100% de positividade para IGF-II (400x).

4.2 Fatores preditivos de metástases em crianças e adultos com tumores adrenocorticais

Metástases foram diagnosticadas em 6 de 23 crianças e em 7 de 34 adultos com tumor adrenocortical. Nos tumores adrenocorticais pediátricos, peso do tumor [risco relativo (RR) 16,6, intervalo de confiança (IC) 95% 1,5 a 178,9; $p=0,02$], critérios histopatológicos de malignidade (escores de Weiss) (RR 2,1; IC 95% 1,2 a 3,7; $p=0,009$) e valores de RNAm do gene *IGF-IR* (RR 1,8; IC 95% 1,3 a 2,7; $p=0,01$) foram associados a um maior risco para o desenvolvimento de metástases na análise univariada. Na análise multivariada, somente os valores de RNAm do gene *IGF-IR* (RR 2,0; IC 95% 1,2 a 3,1; $p=0,004$) foram um marcador prognóstico independente para o diagnóstico de doença metastática em crianças com tumores adrenocorticais (Tabela 5).

Nos tumores adrenocorticais diagnosticados em adultos, sexo masculino (RR 10; IC 95% 1,9 a 51,3; $p=0,006$), peso do tumor (RR 6,4; IC 95% 1,4 a 28,4; $p=0,01$) e escores de Weiss (RR 1,7; IC 95% 1,2 a 2,4; $p=0,01$) foram fatores preditivos de um maior risco de doença metastática na análise univariada. Os valores de RNAm do gene *IGF-II* não foram preditores significativos de metástases nos adultos com tumores adrenocorticais. O modelo multivariado de Cox demonstrou que somente os critérios histopatológicos de Weiss (RR 1,8; IC 95% 1,2 a 2,7; $p=0,003$) foram fatores preditivos do desenvolvimento de metástases neste grupo etário (Tabela 2).

Tabela 5. Fatores preditivos do desenvolvimento de metástases em crianças e adultos com tumores adrenocorticais.

Variáveis	Análise Univariada			Análise Multivariada		
	Risco Relativo	IC 95%	<i>p</i>	Risco Relativo	IC 95%	<i>p</i>
Tumores Adrenocorticais em Crianças						
Idade (anos) ^(A)	1,2	0,99-1,5	0,05			
Sexo ^(B)	0,9	0,2-5,1	0,93			
Síndrome mista ^(C)	2,1	0,5-10,4	0,38			
Peso do tumor (g) ^(A)	16,6	1,5-178,9	0,02			
Critérios de Weiss ^(A)	2,1	1,2-3,7	0,009			
Expressão do <i>IGF-IR</i> ^(A)	1,8	1,3-2,7	0,01	2,0	1,2-3,1	0,004
Tumores Adrenocorticais em Adultos						
Idade (anos) ^(A)	0,9	0,9-1,01	0,09			
Sexo ^(B)	10	1,9-51,3	0,006			
Síndrome mista ^(C)	2,5	0,6-10,4	0,21			
Peso do tumor (g) ^(A)	6,4	1,4-28,4	0,015			
Critérios de Weiss ^(A)	1,7	1,2-2,4	0,001	1,8	1,2-2,7	0,003
Expressão do <i>IGF-II</i> ^(A)	1,0	0,99-1,002	0,94			

^(A): Risco relativo associado com o aumento de uma unidade da variável; ^(B): Sexo feminino foi a categoria de referência;

^(C): Síndrome de Cushing associada à virilização; IC, intervalo de confiança.

4.3 Efeito inibitório do NVP-AEW541 na proliferação das linhagens celulares de tumores adrenocorticais

Os efeitos do NVP-AEW541 em bloquear a proliferação estimulada por IGF-II foram avaliados nas células NCI H295, assim como nas células do adenoma adrenocortical pediátrico. O IGF-II significativamente estimulou a proliferação das linhagens NCI H295 e do adenoma adrenocortical pediátrico a partir de 72 e 48 horas, respectivamente (Figuras 13 e 14). O tratamento com NVP-AEW541 reduziu significativamente a proliferação das células NCI H295 nas concentrações de 10 μ M ($0,21 \pm 0,03$ unidades arbitrárias de densidade óptica, OD) e 30 μ M ($0,1 \pm 0,02$ OD) em relação às células não tratadas ($0,3 \pm 0,02$ OD) após 24 horas ($p = 0,0001$) (Figura 13). Adicionalmente, a inibição do IGF-IR reduziu significativamente a proliferação das células NCI H295 nas concentrações de 0,3 μ M ($0,26 \pm 0,01$ OD), 1,0 μ M ($0,19 \pm 0,02$ OD), 3,0 μ M ($0,13 \pm 0,01$ OD), 10 μ M ($0,07 \pm 0,002$ OD), 30 μ M ($0,01 \pm 0,001$ OD) quando comparadas com as células não tratadas ($0,37 \pm 0,01$ OD) após 48 horas ($p = 0,0001$). O tratamento com NVP-AEW541 promoveu uma redução praticamente total na proliferação das células NCI H295 nas concentrações de 10 μ M e 30 μ M após 96 horas (Figura 13).

O NVP-AEW541 também promoveu uma redução significativa na proliferação das células do adenoma adrenocortical pediátrico nas concentrações de 0,3 μ M ($0,82 \pm 0,03$ OD), 1 μ M ($0,73 \pm 0,02$ OD), 3 μ M ($0,64 \pm 0,02$ OD), 10 μ M ($0,02 \pm 0,003$ OD) e 30 μ M ($0,02 \pm 0,003$ OD) em

relação às células não tratadas ($1,01 \pm 0,05$ OD) após 48 horas de tratamento ($p= 0,0001$). Este inibidor também ocasionou uma redução progressiva na proliferação das células do adenoma adrenocortical pediátrico nas concentrações de $0,3 \mu\text{M}$ ($0,97 \pm 0,07$ OD), $1,0 \mu\text{M}$ ($0,76 \pm 0,02$ OD), $3,0 \mu\text{M}$ ($0,54 \pm 0,03$ OD), $10 \mu\text{M}$ ($0,02 \pm 0,005$ OD) e $30 \mu\text{M}$ ($0,02 \pm 0,003$ OD) em relação às células não tratadas ($1,24 \pm 0,02$ OD) após 96 horas de tratamento ($p= 0,0001$) (Figura 14).

Figura 13. Efeito inibitório do NVP-AEW541 na proliferação das células NCI H295 de carcinoma adrenocortical humano. As células NCI H295 tratadas com NVP-AEW541 foram comparadas com as células não tratadas estimuladas com IGF-II. * $p= 0,0001$

Figura 14. Efeito inibitório do NVP-AEW541 na proliferação das células do adenoma adrenocortical pediátrico humano. As células NCI H295 tratadas com NVP-AEW541 foram comparadas com as células não tratadas estimuladas com IGF-II. * $p = 0,0001$

O tratamento com NVP-AEW541 na ausência de estímulo exógeno com IGF-II também promoveu uma significativa redução na proliferação das células NCI H295 e da linhagem do adenoma adrenocortical pediátrico (Figuras 15 e 16).

Os valores de IC_{50} do NVP-AEW541 foram $0,2 \pm 0,02 \mu M$ e $2,2 \pm 0,06 \mu M$ para as células NCI H295 e para as células do adenoma adrenocortical pediátrico, respectivamente. As células NCI H295 foram mais sensíveis ao NVP-AEW541, apresentando valor de IC_{50} em concentrações submicromolares.

Figura 15. Efeito inibitório do NVP-AEW541 na proliferação das células NCI H295 de carcinoma adrenocortical humano sem estímulo exógeno com IGF-II. As células NCI H295 tratadas com NVP-AEW541 foram comparadas com as células não tratadas sem estímulo com IGF-II. * $p=0,0001$

Figura 16. Efeito inibitório do NVP-AEW541 na proliferação das células do adenoma adrenocortical pediátrico humano sem estímulo exógeno com IGF-II. As células tumorais tratadas com NVP-AEW541 foram comparadas com as células não tratadas sem estímulo com IGF-II. * $p=0,0001$

4.4 Indução da apoptose pelo NVP-AEW541 nas linhagens celulares de tumores adrenocorticais

As células NCI H295 tratadas com NVP-AEW541 apresentaram um aumento significativo na atividade das caspases 3 e 7 nas concentrações de 1,0 μM (3.714 ± 248 unidades relativas de luz, URL), 3,0 μM (5.257 ± 311 URL), 10 μM (7.069 ± 801 URL) e 30 μM (9.060 ± 733 URL) em relação às células não tratadas (2.019 ± 329 URL) após 3 horas de tratamento ($p=0,0001$) (Figure 17).

Figura 17. Indução da apoptose pelo NVP-AEW541 nas células NCI H295 de carcinoma adrenocortical humano após 3 e 6 horas de tratamento. As células tumorais tratadas com NVP-AEW541 foram comparadas com as células não tratadas (controle). * $p=0,0001$

A inibição do IGF-IR nas células do adenoma adrenocortical pediátrico promoveu um aumento significativo na atividade das caspases 3 e 7 nas concentrações de 3,0 μM ($3.220,4 \pm 56,2$ URL), 10 μM ($4.056 \pm 277,9$ URL) e 30 μM ($6.324,6 \pm 198,3$ URL) quando comparadas com as células não tratadas ($1.732,9 \pm 61,4$ URL) após 9 horas de tratamento ($p=0,0001$) (Figure 18). A indução de apoptose nas células do adenoma pediátrico foi menor e mais tardia quando comparada às células NCI H295.

Figura 18. Indução da apoptose pelo NVP-AEW541 nas células do tumor adrenocortical pediátrico humano após 6 e 9 horas de tratamento. As células tumorais tratadas com NVP-AEW541 foram comparadas com as células não tratadas (controle). * $p=0,0001$

4.5 Expressão do SF-1 em tumores adrenocorticais

A mediana de expressão do gene *SF-1* nos tumores adrenocorticais foi 1,0, variando de 0,1 a 6,9. A frequência da hiperexpressão do gene *SF-1* foi semelhante nos tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos (13 e 15%, respectivamente). A expressão do gene *SF-1* não diferiu de forma significativa entre os tumores adrenocorticais produtores de cortisol ($1,5 \pm 0,4$), andrógenos ($1,0 \pm 0,1$), com secreção mista ($1,8 \pm 0,5$) e não funcionantes ($0,8 \pm 0,3$) ($p = 0,41$).

A análise imunohistoquímica da glândula supra-renal normal obtida de uma criança demonstrou que 80% das células corticais eram positivas para SF-1 no compartimento nuclear, enquanto que o percentual das células imunorreativas em 5 glândulas supra-renais normais de adultos foi $4,7 \pm 2,3\%$ (Figura 19).

Figura 19. Imunorreatividade nuclear para SF-1 em glândulas supra-renais normais. A, Imunorreatividade para SF-1 em 80% das células corticais da glândula supra-renal normal de uma criança (400x). B, Córtex adrenal normal de um paciente adulto apresentando ausência de positividade nuclear para SF-1 (400x).

O percentual das células neoplásicas com imunorreatividade nuclear para SF-1 foi significativamente maior nos tumores adrenocorticais pediátricos em relação aos tumores diagnosticados em adultos ($29,1 \pm 5,4\%$ vs. $8,3 \pm 2,3\%$, respectivamente; $p= 0,0001$) (Figura 20). A frequência de tumores adrenocorticais com mais de 50% das células neoplásicas positivas para SF-1 foi 33% e 8% em crianças e adultos, respectivamente. A imunorreatividade nuclear para SF-1 foi semelhante nos adenomas e carcinomas adrenocorticais ($17,4 \pm 3,3\%$ vs. $11,9 \pm 4,0\%$, respectivamente; $p= 0,16$).

Figura 20. Percentual de células neoplásicas imunorreativas para SF-1 em tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos.

A imunorreatividade para SF-1 nos tumores adrenocorticais virilizantes pediátricos foi detectada em $39,3 \pm 7,6\%$ das células neoplásicas. Em contraste, os tumores adrenocorticais virilizantes diagnosticados em adultos apresentaram uma baixa imunorreatividade nuclear para SF-1 ($2,8 \pm 1,8\%$ de células neoplásicas positivas) (Figura 21).

Figura 21. Imunohistoquímica para SF-1 em tumores adrenocorticais. A, carcinoma adrenocortical não funcionante com ausência de imunorreatividade nuclear para SF-1 (400x). B, adenoma adrenocortical virilizante, diagnosticado em uma paciente de 50 anos, apresentando 10% das células neoplásicas positivas para SF-1 no compartimento nuclear (400x). C, adenoma adrenocortical virilizante pediátrico com 50% das células neoplásicas imunorreativas para SF-1 (400x). D, adenoma adrenocortical, diagnosticado em uma criança de 6 anos com virilização, apresentando 90% de positividade nuclear para SF-1 (400x).

4.6 Expressão do DAX-1 em tumores adrenocorticais

A mediana de expressão do gene *DAX-1* foi 1,5, variando de 0,1 a 15,3. A frequência da hiperexpressão deste gene foi 30 e 41% nos tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos, respectivamente. A expressão do gene *DAX-1* não diferiu entre os tumores adrenocorticais produtores de cortisol ($3,6 \pm 1,0$), andrógenos ($1,5 \pm 0,2$), com secreção mista ($2,8 \pm 0,9$) e não funcionantes ($1,2 \pm 0,4$).

A análise imunohistoquímica da glândula supra-renal normal obtida de uma criança demonstrou imunorreatividade para DAX-1 em 90% das células corticais. O percentual das células corticais imunorreativas para DAX-1 em 5 glândulas supra-renais normais de adultos foi $42,7 \pm 20,9\%$ (Figura 22). A expressão da proteína DAX-1 foi detectada principalmente na periferia das glândulas supra-renais normais.

Figura 22. Imunorreatividade nuclear para DAX-1 em glândulas supra-renais normais. A, Imunorreatividade para DAX-1 em 90% das células corticais da glândula supra-renal normal de uma criança (400x). B, Córtex adrenal normal de um paciente adulto apresentando 80% das células com positividade nuclear para DAX-1 (400x).

O percentual das células neoplásicas com imunorreatividade nuclear para DAX-1 não foi significativamente diferente entre os tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos ($31,4 \pm 5,3\%$ vs. $24,2 \pm 4,0\%$, respectivamente; $p = 0,15$) (Figura 23). A frequência de tumores adrenocorticais com mais de 50% das células neoplásicas positivas para DAX-1 foi 36% e 27% em crianças e adultos, respectivamente.

Figura 23. Percentual de células neoplásicas imunorreativas para DAX-1 em tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos.

A imunorreatividade nuclear para DAX-1 foi semelhante nos adenomas e carcinomas adrenocorticais ($29,2 \pm 3,8\%$ vs. $21,4 \pm 5,8\%$ de células neoplásicas, respectivamente; $p = 0,12$). A expressão do DAX-1 não foi significativamente diferente entre tumores adrenocorticais funcionantes e não funcionantes ($24,1 \pm 3,2\%$ vs. $40,1 \pm 10,3\%$ de células neoplásicas positivas, respectivamente; $p = 0,34$) (Figura 24).

Figura 24. Imunohistoquímica para DAX-1 em tumores adrenocorticais. A, adenoma adrenocortical, diagnosticado em uma criança de 3 anos com síndrome de Cushing e virilização, apresentando ausência de imunorreatividade nuclear para DAX-1 (400x). B, carcinoma adrenocortical produtor de cortisol e andrógenos com 10% das células neoplásicas positivas para DAX-1 no compartimento nuclear (400x). C, adenoma adrenocortical virilizante pediátrico com 50% das células neoplásicas imunorreativas para DAX-1 (400x). D, adenoma adrenocortical, diagnosticado em uma criança de 1,2 anos com virilização e síndrome de Cushing, apresentando 90% de positividade nuclear para DAX-1 (400x).

5. DISCUSSÃO

5.1 Expressão dos genes *IGF-II* e *IGF-IR* em tumores adrenocorticais

A patogênese tumoral pode ser desencadeada por alterações em oncogenes, genes supressores tumorais e em genes de microRNAs (120). Estas alterações consistem freqüentemente em eventos somáticos, embora mutações germinativas possam predispor ao aparecimento de tumores herdados ou familiares. Um único defeito genético é raramente suficiente para o desenvolvimento de uma neoplasia maligna. Evidências sugerem que as alterações em oncogenes, genes supressores tumorais ou microRNAs acontecem em múltiplas etapas seqüenciais. Estas alterações podem ser definidas como eventos iniciadores, que contribuem para os estágios iniciais da transformação neoplásica, ou eventos de progressão, relacionados às etapas subseqüentes de transformação. Translocações ou mutações podem ocorrer em etapas iniciais ou durante a progressão tumoral, enquanto que amplificação usualmente ocorre durante a progressão da neoplasia (120).

O sistema IGF tem um importante papel na regulação do processo de diferenciação e crescimento da glândula supra-renal (76). Os componentes do sistema IGF (IGFs, receptores e IGFBPs) são sintetizados e secretados pela glândula supra-renal, e tanto o IGF-I como IGF-II são capazes de estimular a proliferação e a esteroidogênese das células

adrenocorticais *in vitro* (121). Estes efeitos são mediados pela interação com o IGF-IR e modulados localmente pela secreção parácrina de IGFBPs (122). Adicionalmente, a proliferação das células NCI H295 pode ser inibida em 50% pelo uso de anticorpos anti-IGF-IR, indicando que os efeitos mitogênicos do IGF-II são mediados, pelo menos em parte, pelo IGF-IR nesta linhagem de carcinoma adrenocortical (75).

Concentrações locais elevadas do IGF-II em combinação com o aumento da expressão do *IGF-IR* representam uma importante vantagem na proliferação das células tumorais (78). A ativação do IGF-IR pelo excesso de moléculas efetoras (IGFs) ou pela hiperexpressão do próprio receptor leva à proliferação celular e angiogênese, ao desenvolvimento de metástases, além de contribuir para inibição da apoptose (78). O aumento da expressão do IGF-II ou do IGF-IR tem sido documentado em vários tumores malignos, incluindo glioblastomas, meningiomas, cânceres de mama e do trato gastrointestinal, como adenocarcinoma de cólon, reto e pâncreas (78, 123, 124).

A hiperexpressão do gene *IGF-II* é um achado freqüente nos carcinomas adrenocorticais, sendo encontrado em 83% dos tumores adrenocorticais malignos diagnosticados em adultos (31, 66). Na nossa casuística, o aumento da expressão do IGF-II foi também evidenciado predominantemente nos carcinomas adrenocorticais diagnosticados em adultos. Apesar destes achados, a expressão do gene *IGF-II* não foi um fator preditivo do desenvolvimento de doença metastática neste grupo. Nos tumores adrenocorticais pediátricos, demonstramos um aumento da

expressão do IGF-II tanto nos adenomas como nos carcinomas adrenocorticais. Os mecanismos responsáveis pela hiperexpressão do gene *IGF-II* estão relacionados principalmente às alterações do *imprinting* genômico do *locus* 11p15 (65, 66). Em uma série de 112 tumores adrenocorticais, a perda de heterozigose do *locus* 11p15 foi um preditor mais significativo da sobrevida livre de doença quando comparada com a expressão do gene *IGF-II*, indicando que alterações moleculares adicionais no *locus* 11p15, como a perda da expressão dos genes supressores tumorais *p57^{KIP2}* e *H19*, podem também contribuir para o potencial de malignidade dos tumores adrenocorticais (31).

Em uma série de 202 carcinomas adrenocorticais em adultos, Abiven *et al.* (125) demonstraram que idade avançada ao diagnóstico, estágio III ou IV e hipersecreção de cortisol foram associados à redução da sobrevida na análise multivariada. Sexo masculino e hipersecreção de cortisol foram preditores de recorrência tumoral local e metástases (125). Na nossa casuística, idade avançada ao diagnóstico, sexo masculino, peso tumoral e critérios de Weiss foram fatores preditivos de um maior risco de doença metastática em adultos com tumores adrenocorticais na análise univariada. Contudo, somente o escore de Weiss representou um marcador independente para o desenvolvimento de metástases neste grupo.

Neste estudo, a expressão do gene *IGF-IR* foi significativamente mais elevada nos carcinomas adrenocorticais pediátricos e constituiu um marcador prognóstico para o desenvolvimento de metástases neste grupo. Wieneke *et al.* (15) demonstraram que 51 de 74 (69%) crianças americanas

com tumores adrenocorticais e diagnóstico histológico de malignidade (escore de Weiss ≥ 4) tiveram curso benigno, sem recorrência ou morte. Em concordância com esses achados, demonstramos que os critérios histopatológicos de Weiss não foram associados à evolução clínica desfavorável no grupo de crianças brasileiras. Desta forma, a expressão do gene *IGF-IR* pode ser clinicamente útil para identificar tumores adrenocorticais pediátricos associados a um fenótipo mais agressivo.

Em 1991, Kamio *et al.* (126) demonstraram um percentual de imunoreatividade ao IGF-IR semelhante nos carcinomas (94%) e adenomas (96%) adrenocorticais em adultos. Posteriormente, Weber *et al.* (127) identificaram um aumento importante da expressão protéica do IGF-IR em 3 de 4 carcinomas adrenocorticais, enquanto que, nos casos de hiperplasias e adenomas adrenocorticais, a expressão deste receptor foi semelhante ao tecido adrenocortical normal. No nosso estudo, os valores de RNAm do gene *IGF-IR* foram similares nos tumores adrenocorticais benignos e malignos diagnosticados na faixa etária adulta.

Os mecanismos responsáveis pela hiperexpressão do gene *IGF-IR* nos carcinomas adrenocorticais pediátricos não estão elucidados. A expressão do gene *IGF-IR* é controlada por uma série de fatores, incluindo fatores de crescimento, oncogenes e genes supressores tumorais (128, 129). Em células normais, o P53 inibe a expressão do IGF-IR, enquanto que proteínas P53 mutantes promovem um aumento da expressão do IGF-IR em diferentes neoplasias (130, 131). Na nossa casuística, 17 de 22 (77%) crianças com tumores adrenocorticais eram portadoras da mutação

germinativa Arg337His do P53. No entanto, os valores de RNAm do gene *IGF-IR* não foram associados com a presença desta mutação. Portanto, outros eventos moleculares, como a amplificação do gene *IGF-IR*, podem estar implicados na hiperexpressão deste receptor em carcinomas adrenocorticais pediátricos. A amplificação do *locus* 15q26, onde está localizado o gene *IGF-IR*, já foi previamente demonstrada em melanomas, cânceres de mama e adenocarcinomas de pâncreas (132-134).

5.2 Efeitos anti-tumorais do NVP-AEW541 nas linhagens celulares de tumores adrenocorticais

Os inibidores de tirosina quinase constituem uma importante classe de novas drogas contra o câncer, cuja seletividade e eficácia são determinadas por aspectos peculiares envolvidos na tumorigênese de cada neoplasia maligna. Desta forma, a aplicação bem sucedida destes inibidores requer a identificação de marcadores moleculares que definam tumores malignos susceptíveis. A análise de linhagens celulares derivadas de tumores constitui uma abordagem efetiva para estabelecer uma correlação entre genótipo e eficácia das drogas dirigidas para alvos moleculares (135).

O NVP-AEW541 é um inibidor seletivo da atividade tirosina quinase do IGF-IR, cujos efeitos citotóxicos foram demonstrados previamente em diversas linhagens celulares tumorais, a partir da determinação de alterações morfológicas, ativação de caspases e fragmentação nuclear (82,

83, 136, 137). Este composto é capaz de bloquear efetivamente a autofosforilação do IGF-IR, assim como a fosforilação da AKT e da MAPK (82). Apesar da homologia de 84% entre os domínios tirosina quinase do IGF-IR e do receptor de insulina, o NVP-AEW541 mostrou-se bem mais seletivo *in vitro* para o IGF-IR quando comparado com o receptor de insulina (82). As propriedades anti-neoplásicas do NVP-AEW541 foram também demonstradas em modelos de xenotransplante de sarcoma em camundongos (82, 83).

O carcinoma adrenocortical constitui uma doença de prognóstico desfavorável, com uma considerável redução da sobrevida nos casos em que a cura cirúrgica não é possível (24). Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, direcionadas para as vias de sinalização envolvidas na tumorigênese adrenocortical, é necessário. Neste estudo, avaliamos os efeitos inibitórios do NVP-AEW541 nas células NCI H295 e em uma nova linhagem estabelecida a partir de um adenoma adrenocortical pediátrico da nossa casuísta. A inibição do IGF-IR foi capaz de bloquear a proliferação celular estimulada por IGF-II de forma dose e tempo dependentes nas 2 linhagens celulares. Estes efeitos inibitórios podem ser explicados por uma significativa indução da apoptose, evidenciada pelo aumento da atividade das caspases 3 e 7 nestas linhagens. O aumento da atividade das caspases efetoras finais foi mais intenso nas células NCI H295 e ocorreu em fases mais precoces do tratamento com NVP-AEW541, em virtude, provavelmente, da maior expressão do gene *IGF-IR* nesta linhagem de tumor adrenocortical.

As células NCI H295 apresentaram alta sensibilidade ao NVP-AEW541, como demonstrado pelo valor de IC_{50} em concentrações submicromolares. O espectro de efetividade do NVP-AEW541 nas células NCI H295 foi comparável ao de linhagens celulares de sarcoma e neuroblastoma (83, 138). A sensibilidade das células do adenoma adrenocortical pediátrico a este inibidor do IGF-IR foi semelhante à de células de tumores do trato gastrointestinal e de carcinoma hepatocelular (137, 139). Scotlandi *et al.* (83) demonstraram que a sensibilidade *in vitro* ao NVP-AEW541 em linhagens de tumores musculoesqueléticos correlaciona-se com o *status* de fosforilação constitutiva do IGF-IR.

Os resultados da radioterapia no tratamento do carcinoma adrenocortical são controversos, com reduções tumorais de até 42% demonstradas previamente (140-142). Recentemente, a radioterapia adjuvante foi efetiva em reduzir a recorrência local em carcinomas adrenocorticais (143). De forma interessante, fatores de crescimento têm sido implicados na modulação da resposta celular à irradiação (144). Wen *et al.* (145) demonstraram que inibidores do IGF-IR aumentaram a sensibilidade à radiação em células de carcinoma de mama. Desta forma, o uso de inibidores do IGF-IR pode aumentar a eficácia de outras modalidades terapêuticas para o carcinoma adrenocortical, como a radioterapia.

Os efeitos das tiazolidinedionas, agonistas de receptores ativados por proliferadores de peroxissomas gama (PPAR γ), foram avaliados nas células NCI H295 (146, 147). A rosiglitazona inibiu a proliferação celular e

estimulou a apoptose nesta linhagem adrenocortical. No entanto, a inibição da proliferação promovida pela rosiglitazona foi bem menos significativa se comparada com os efeitos anti-proliferativos do NVP-AEW541, demonstrados neste estudo.

Recentemente, um estudo clínico Fase I avaliou os efeitos de um anticorpo monoclonal anti-IGF-IR (CP-751,871) em 24 pacientes com tumores malignos sólidos. Este anticorpo foi administrado de forma intravenosa a cada 21 dias em 4 ciclos, contudo não foram observadas regressões tumorais objetivas. O tratamento com este anticorpo monoclonal aumentou as concentrações séricas de insulina, do hormônio do crescimento e de glicose. Os efeitos adversos mais comuns foram hiperglicemia, anorexia, náusea, elevação de aspartato aminotransferase, diarreia e fadiga (148).

5.3 Expressão do SF-1 e DAX-1 em tumores adrenocorticais

O SF-1, fator de transcrição nuclear, tem uma importante função no desenvolvimento adrenal e gonadal em humanos (46). A relação entre o número de cópias do *SF-1* e o potencial proliferativo adrenocortical foi inicialmente sugerida pela redução do crescimento adrenocortical contralateral compensatório após adrenalectomia unilateral em camundongos heretozigotos para deficiência deste fator de transcrição (*Sf-1*^{+/-}) (91). A amplificação do gene *SF-1* em células adrenocorticais humanas estimula a

proliferação celular através da regulação de transcritos envolvidos com metabolismo dos esteróides, ciclo celular, apoptose e adesão celular, além de induzir a formação de tumores adrenocorticais em camundongos (149).

Recentemente, a amplificação do gene *SF-1* e o aumento da sua expressão protéica foram demonstrados em 8 de 9 tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças brasileiras, indicando que o aumento do número de cópias do gene *SF-1* pode ter um papel crítico na tumorigênese adrenocortical pediátrica (92, 93). No nosso estudo, identificamos um aumento da expressão do gene *SF-1* em somente 14% dos tumores adrenocorticais, com frequência semelhante no grupo de crianças e adultos. Entretanto, na análise imunohistoquímica, a hiperexpressão da proteína SF-1 foi evidenciada predominantemente nos tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças. Estes dados indicam que o aumento da expressão do SF-1 nos tumores adrenocorticais pediátricos ocorre em nível pós-traducional. Desta forma, os nossos resultados, em uma expressiva coorte de tumores adrenocorticais, confirmam o envolvimento do SF-1 na tumorigênese adrenocortical pediátrica.

O aumento da expressão da proteína SF-1 foi previamente demonstrado em tumores adrenocorticais virilizantes (150). Em nosso estudo, a hiperexpressão do SF-1 foi identificada somente em tumores adrenocorticais pediátricos associados à virilização, que constitui a apresentação clínica mais freqüente neste grupo etário. Em contraste, os tumores adrenocorticais virilizantes diagnosticados em adultos apresentaram uma baixa imunorreatividade para SF-1. Adicionalmente, a

expressão do SF-1 não diferiu entre os tumores adrenocorticais funcionantes e não funcionantes, o que indica ausência de correlação entre a expressão do SF-1 e a atividade esteroidogênica dos tumores adrenocorticais avaliados neste estudo.

O DAX-1 antagoniza a atividade transcricional do SF-1 e age como um potente repressor da produção de esteróides em condição basal ou estimulada por AMPc (96). Reincke *et al.* (112) estudaram a expressão do gene *DAX-1* em 16 tumores adrenocorticais (3 adenomas não funcionantes, 8 adenomas produtores de cortisol e 5 carcinomas). A expressão do gene *DAX-1* foi mais elevada nos tumores não funcionantes, intermediária nos adenomas produtores de cortisol e heterogênea no grupo de carcinomas (112).

Em nosso estudo, a hiperexpressão do gene *DAX-1* foi detectada em 39% dos tumores adrenocorticais, com uma prevalência semelhante em crianças e adultos. De forma similar, o aumento da expressão da proteína DAX-1 foi identificado em 36% e 27% dos tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos, respectivamente. Apesar do DAX-1 possuir uma ação inibitória sobre a produção esteroidal *in vitro*, a expressão do DAX-1 não diferiu entre os tumores adrenocorticais funcionantes e não funcionantes avaliados neste estudo.

A persistência do potencial proliferativo do córtex adrenal definitivo e a observação da migração celular centrípeta durante o processo de regeneração após enucleação adrenal suportam a existência de células indiferenciadas na região subcapsular da glândula supra-renal (45, 151). A

região subcapsular do córtex adrenal normal possui uma elevada expressão do DAX-1 (152). Adicionalmente, evidências recentes demonstraram que o DAX-1 tem uma importante função na manutenção do estado de indiferenciação de *stem cells* embrionárias (153, 154). A partir destas observações, o DAX-1 tem sido proposto como fator de transcrição envolvido na manutenção da indiferenciação e da capacidade proliferativa das células progenitoras adrenocorticais subcapsulares (152). Neste estudo, o aumento da expressão do DAX-1 foi detectado em 36% dos tumores adrenocorticais, principalmente na região periférica. Desta forma, a hiperexpressão do DAX-1 pode constituir um dos eventos iniciais envolvidos na patogênese molecular dos tumores adrenocorticais.

6. CONCLUSÕES

- A hiperexpressão do IGF-II foi identificada predominantemente nos carcinomas adrenocorticais diagnosticados em adultos.
- No grupo pediátrico, o aumento da expressão do IGF-II foi evidenciado nos adenomas e carcinomas adrenocorticais.
- Os critérios histopatológicos de Weiss foram preditivos do desenvolvimento de metástases somente nos tumores adrenocorticais diagnosticados em adultos.
- A hiperexpressão do gene *IGF-IR* foi um marcador biológico independente do carcinoma adrenocortical metastático pediátrico.
- O NVP-AEW541, inibidor seletivo do IGF-IR, bloqueou a proliferação estimulada por IGF-II e promoveu a indução da apoptose nas 2 linhagens celulares de tumores adrenocorticais humanos.
- O uso de inibidores do IGF-IR constitui uma promissora estratégia terapêutica para o carcinoma adrenocortical.

- O aumento da expressão do SF-1 foi evidenciado predominantemente nos tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças.
- A hiperexpressão do DAX-1 constitui um evento importante na patogênese molecular dos tumores adrenocorticais benignos e malignos.

7. ANEXOS

Anexo A

Estadiamento proposto pela Organização Mundial de Saúde (24).

	T, N, M	Descrição
I	T ₁ , N ₀ , M ₀	T < 5 cm, confinado à adrenal
II	T ₂ , N ₀ , M ₀	T > 5 cm, confinado à adrenal
III	T ₁₋₂ , N ₁ , M ₀	T confinado à adrenal com linfonodos + ou
	T ₃ , N _x , M ₀	T com extensão extra-adrenal sem invadir órgãos adjacentes
IV	T ₄ , N _x , M ₀	T com invasão de órgãos adjacentes ou
	T _x , N _x , M ₁	presença de metástases

Anexo B

Critérios histopatológicos propostos por Weiss em 1984 (12).

Atipia nuclear

Mitoses atípicas

Número de mitoses (> 5/50 HPF)

Células claras < 25%

Arquitetura difusa > 33%

Necrose

Invasão de cápsula

Invasão de sinusóides

Invasão capsular

Anexo C

Características clínicas e histopatológicas de 23 tumores adrenocorticais pediátricos (continuação).

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Síndrome Clínica	Estágio	Peso do tumor (Kg)	Weiss	Tratamento cirúrgico e adjuvante	Metástase	Seguimento (anos)	Diagnóstico
1	1,3	M	V	I	0,03	4	Adrenalectomia	Não	10,8	Adenoma
2	2,3	F	V	I	0,05	5	Adrenalectomia	Não	2,7	Adenoma
3	0,9	F	V/C	II	0,06	2	Adrenalectomia	Não	0,5	Adenoma
4	2,1	F	V	I	0,02	1	Adrenalectomia	Não	1,6	Adenoma
5	2,2	M	V	II	0,09	4	Adrenalectomia	Não	0,5	Adenoma
6	2,1	F	V	I	0,05	1	Adrenalectomia	Não	8,7	Adenoma
7	2,1	M	V	II	0,14	5	Adrenalectomia	Não	8,2	Adenoma
8	1,3	M	V/C	I	0,04	1	Adrenalectomia	Não	7,8	Adenoma
9	15	F	V/C	IV	1,2	7	Adrenalectomia e nefrectomia; mitotane, cisplatina e etoposide	Pulmão	1,9 (óbito)	Carcinoma
10	2,6	M	V	III	0,1	7	Adrenalectomia e nefrectomia; cirurgia de metástase pulmonar; mitotane	Pulmão	0,8 (óbito)	Carcinoma
11	2,5	F	V	II	0,06	7	Adrenalectomia	Não	5,4	Adenoma

continua

Características clínicas e histopatológicas de 23 tumores adrenocorticais pediátricos (conclusão).

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Síndrome Clínica	Estágio	Peso do tumor (Kg)	Weiss	Tratamento cirúrgico e adjuvante	Metástase	Seguimento (anos)	Diagnóstico
12	1,6	F	V	ND	ND	ND	Adrenalectomia	Não	1	Adenoma
13	1,7	F	V	ND	ND	3	Adrenalectomia	Não	9	Adenoma
14	0,9	F	V	II	0,14	5	Adrenalectomia; mitotane	Pulmão	2,2	Carcinoma
15	1,2	F	V/C	I	0,01	5	Adrenalectomia	Não	0,5	Adenoma
16	9	M	C	I	0,02	2	Adrenalectomia	Não	5,3	Adenoma
17	2	F	V/C	III	0,06	7	Adrenalectomia e nefrectomia; mitotane	Pulmão e linfonodos	2,2 (óbito)	Carcinoma
18	6	F	V	I	0,05	2	Adrenalectomia	Não	6,8	Adenoma
19	2	M	V	II	0,03	8	Adrenalectomia; cirurgia de metástase pulmonar; mitotane	Pulmão	8,3	Carcinoma
20	2,8	F	V	I	0,03	3	Adrenalectomia	Não	12,3	Adenoma
21	2,2	F	V/C	II	0,06	2	Adrenalectomia	Não	4	Adenoma
22	2,3	F	V	I	0,01	1	Adrenalectomia	Não	3	Adenoma
23	7	F	V/C	IV	0,14	7	Adrenalectomia e nefrectomia; mitotane, cisplatina e etoposide	Fígado e linfonodos	1,6	Carcinoma

M: masculino; F: feminino; C: síndrome de Cushing; V: virilização; ND: não disponível.

Anexo D

Características clínicas e histopatológicas de 34 tumores adrenocorticais em adultos (continuação).

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Síndrome Clínica	Estágio	Peso do tumor (Kg)	Weiss	Tratamento cirúrgico e adjuvante	Metástase	Seguimento (anos)	Diagnóstico
24	29	M	C	IV	0,67	8	Adrenalectomia e nefrectomia; mitotane	Fígado e linfonodos	0,5 (óbito)	Carcinoma
25	18	F	C	I	0,02	2	Adrenalectomia	Não	7,4	Adenoma
26	37	F	NF	I	0,02	0	Adrenalectomia	Não	0,5	Adenoma
27	27	M	C	II	0,01	2	Adrenalectomia	Não	7,6	Adenoma
28	29	F	V	II	1,4	4	Adrenalectomia	Não	1	Carcinoma
29	46	F	NF	I	0,03	0	Adrenalectomia	Não	2,4	Adenoma
30	17	M	C/Fe	III	0,17	7	Adrenalectomia	Não	0,8	Carcinoma
31	33	M	NF	III	ND	5	Adrenalectomia	Não	ND	Carcinoma
32	35	F	V/C	I	0,04	3	Adrenalectomia	Não	3,8	Adenoma
33	29	F	C	I	0,02	0	Adrenalectomia	Não	9,8	Adenoma
34	30	M	I	III	0,33	4	Adrenalectomia e nefrectomia	Linfonodos	1 (óbito)	Carcinoma
35	38	F	C	II	0,05	2	Adrenalectomia	Não	13,2	Adenoma
36	26	F	C	II	0,03	1	Adrenalectomia	Não	5,3	Adenoma

continua

Características clínicas e histopatológicas de 34 tumores adrenocorticais em adultos (continuação).

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Síndrome Clínica	Estágio	Peso do tumor (Kg)	Weiss	Tratamento cirúrgico e adjuvante	Metástase	Seguimento (anos)	Diagnóstico
37	50	F	V	I	0,04	2	Adrenalectomia	Não	6,3	Adenoma
38	37	F	C	I	0,04	1	Adrenalectomia	Não	4,5	Adenoma
39	47	F	C	II	0,04	1	Adrenalectomia	Não	4,2	Adenoma
40	45	F	C/V	III	0,3	7	Adrenalectomia	Não	7,1	Carcinoma
41	40	F	NF	I	0,01	0	Adrenalectomia	Não	10,3	Adenoma
42	49	F	V/C	II	0,93	4	Adrenalectomia	Não	9	Carcinoma
43	18	F	V/C	IV	1,0	8	Adrenalectomia	Pulmão	0,8 (óbito)	Carcinoma
44	23	F	V/C	IV	0,6	6	Adrenalectomia e nefrectomia; cirurgia de metástase pulmonar; mitotane; cisplatina e etoposide	Pulmão e linfonodos	1,4 (óbito)	Carcinoma
45	29	F	V/C	IV	0,6	6	Adrenalectomia e nefrectomia; mitotane	Pulmão e linfonodos	2,5 (óbito)	Carcinoma
46	64	F	NF	I	0,02	0	Adrenalectomia	Não	3,8	Adenoma
47	39	F	C	I	0,01	1	Adrenalectomia	Não	7,8	Adenoma
48	27	F	C	I	0,02	0	Adrenalectomia	Não	0,2	Adenoma
49	37	F	C	I	0,03	1	Adrenalectomia	Não	10,6	Adenoma
50	66	F	NF	II	0,06	4	Adrenalectomia	Não	1,5	Carcinoma

continua

Características clínicas e histopatológicas de 34 tumores adrenocorticais em adultos (conclusão).

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Síndrome Clínica	Estágio	Peso do tumor (Kg)	Weiss	Tratamento cirúrgico e adjuvante	Metástase	Seguimento (anos)	Diagnóstico
51	45	F	NF	I	0,02	0	Adrenalectomia	Não	0,2	Adenoma
52	17	F	V	II	0,83	4	Adrenalectomia	Não	9,6	Carcinoma
53	28	F	V	II	0,15	2	Adrenalectomia	Não	2	Adenoma
54	24	F	C	I	0,02	2	Adrenalectomia	Não	10,3	Adenoma
55	22	F	V	IV	0,4	7	Adrenalectomia	Pulmão	0,8 (óbito)	Carcinoma
56	41	F	C	I	ND	1	Adrenalectomia	Não	11,9	Adenoma
57	44	F	NF	II	0,8	8	Adrenalectomia e nefrectomia; cirurgia de metástase pulmonar; mitotane; cisplatina e etoposide	Pulmão e osso	2,3	Carcinoma

M: masculino; F: feminino; C: síndrome de Cushing; V: virilização; NF: não funcionante; Fe: feminilizante; I: inibina; ND: não disponível.

8. REFERÊNCIAS

1. Thompson GB, Young WF, Jr. Adrenal incidentaloma. *Curr Opin Oncol.* 2003; 15:84-90.
2. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev.* 1995; 16:460-84.
3. Young WF, Jr. Management approaches to adrenal incidentalomas. A view from Rochester, Minnesota. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000; 29:159-85, x.
4. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:2027-31.
5. Russell RP, Masi AT, Richter ED. Adrenal cortical adenomas and hypertension. A clinical pathologic analysis of 690 cases with matched controls and a review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1972; 51:211-25.
6. Chudler RM, Kay R. Adrenocortical carcinoma in children. *Urol Clin North Am.* 1989; 16:469-79.
7. Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CA, et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol.* 1995; 154:2004-9.
8. Luton JP, Cerdas S, Billaud L, et al. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med.* 1990; 322:1195-201.

9. Barzilay JI, Pazianos AG. Adrenocortical carcinoma. *Urol Clin North Am*. 1989; 16:457-68.
10. Pommier RF, Brennan MF. An eleven-year experience with adrenocortical carcinoma. *Surgery*. 1992; 112:963-70; discussion 70-1.
11. Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82:1317-24.
12. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*. 1984; 8:163-9.
13. Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, et al. Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*. 2002; 26:1612-9.
14. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer*. 2000; 88:711-36.
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; 27:867-81.
16. Macfarlane DA. Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. *Ann R Coll Surg Engl*. 1958; 23:155-86.

17. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. Adrenal cortical carcinoma. *J Urol*. 1978; 120:660-5.
18. Tauchmanova L, Colao A, Marzano LA, et al. Adrenocortical carcinomas: twelve-year prospective experience. *World J Surg*. 2004; 28:896-903.
19. Ng L, Libertino JM. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol*. 2003; 169:5-11.
20. Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, et al. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. *Endocr Relat Cancer*. 2005; 12:667-80.
21. Bellantone R, Ferrante A, Boscherini M, et al. Role of reoperation in recurrence of adrenal cortical carcinoma: results from 188 cases collected in the Italian National Registry for Adrenal Cortical Carcinoma. *Surgery*. 1997; 122:1212-8.
22. Jensen JC, Pass HI, Sindelar WF, Norton JA. Recurrent or metastatic disease in select patients with adrenocortical carcinoma. Aggressive resection vs chemotherapy. *Arch Surg*. 1991; 126:457-61.
23. Hahner S, Fassnacht M. Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005; 6:386-94.
24. Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:2027-37.
25. Berruti A, Terzolo M, Pia A, Angeli A, Dogliotti L. Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced

- adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. *Cancer*. 1998; 83:2194-200.
26. Berruti A, Terzolo M, Sperone P, et al. Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. *Endocr Relat Cancer*. 2005; 12:657-66.
 27. Khan TS, Sundin A, Juhlin C, Wilander E, Oberg K, Eriksson B. Vincristine, cisplatin, teniposide, and cyclophosphamide combination in the treatment of recurrent or metastatic adrenocortical cancer. *Med Oncol*. 2004; 21:167-77.
 28. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100:57-70.
 29. Diaz-Cano SJ, de Miguel M, Blanes A, Tashjian R, Galera H, Wolfe HJ. Clonality as expression of distinctive cell kinetics patterns in nodular hyperplasias and adenomas of the adrenal cortex. *Am J Pathol*. 2000; 156:311-9.
 30. Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, et al. Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1994; 40:465-77.
 31. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, et al. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2001; 61:6762-7.
 32. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, et al. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary

- deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:1819-29.
33. Almeida MQ, Latronico AC. The molecular pathogenesis of childhood adrenocortical tumors. *Horm Metab Res.* 2007; 39:461-6.
34. Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, et al. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res.* 1996; 56:4219-23.
35. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:1116-21.
36. James LA, Kelsey AM, Birch JM, Varley JM. Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer.* 1999; 81:300-4.
37. Zhao J, Speel EJ, Muletta-Feurer S, et al. Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions. Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis. *Am J Pathol.* 1999; 155:1039-45.
38. Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P. Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000; 28:145-52.

39. Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:3467-74.
40. Ping AJ, Reeve AE, Law DJ, Young MR, Boehnke M, Feinberg AP. Genetic linkage of Beckwith-Wiedemann syndrome to 11p15. *Am J Hum Genet.* 1989; 44:720-3.
41. Reincke M, Karl M, Travis WH, et al. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78:790-4.
42. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:9330-5.
43. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:4970-3.
44. Pinto EM, Billerbeck AE, Fragoso MC, Mendonca BB, Latronico AC. 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.* 2005; 90:2976-81.
45. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 1997; 18:378-403.

-
46. Keegan CE, Hammer GD. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 13:200-8.
 47. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol.* 2002; 9:12-6.
 48. Dai HY, Tsao N, Leung WC, Lei HY. Increase of intracellular pH in p53-dependent apoptosis of thymocytes induced by gamma radiation. *Radiat Res.* 1998; 150:183-9.
 49. Clements WM, Wang J, Sarnaik A, et al. beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res.* 2002; 62:3503-6.
 50. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:8847-51.
 51. Tissier F, Cavard C, Groussin L, et al. 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; 65:7622-7.
 52. Ilvesmaki V, Blum WF, Voutilainen R. Insulin-like growth factor binding proteins in the human adrenal gland. *Mol Cell Endocrinol.* 1993; 97:71-9.
 53. Weber MM, Fottner C, Schmidt P, et al. Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with

adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis. *Endocrinology*. 1999; 140:1537-43.

54. Scott J, Cowell J, Robertson ME, et al. Insulin-like growth factor-II gene expression in Wilms' tumour and embryonic tissues. *Nature*. 1985; 317:260-2.
55. Reeve AE, Eccles MR, Wilkins RJ, Bell GI, Millow LJ. Expression of insulin-like growth factor-II transcripts in Wilms' tumour. *Nature*. 1985; 317:258-60.
56. Gloudemans T, Prinsen I, Van Unnik JA, Lips CJ, Den Otter W, Sussenbach JS. Insulin-like growth factor gene expression in human smooth muscle tumors. *Cancer Res*. 1990; 50:6689-95.
57. Schneid H, Seurin D, Noguez P, Le Bouc Y. Abnormalities of insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) genes in human tumor tissue. *Growth Regul*. 1992; 2:45-54.
58. Ilvesmaki V, Kahri AI, Miettinen PJ, Voutilainen R. Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 77:852-8.
59. DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*. 1991; 64:849-59.
60. Ferguson-Smith AC, Sasaki H, Cattanach BM, Surani MA. Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene. *Nature*. 1993; 362:751-5.

-
61. Hatada I, Mukai T. Genomic imprinting of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse. *Nat Genet.* 1995; 11:204-6.
 62. Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E, Tycko B. Tumour-suppressor activity of H19 RNA. *Nature.* 1993; 365:764-7.
 63. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, et al. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 1995; 9:650-62.
 64. Grundy P, Telzerow P, Paterson MC, et al. Chromosome 11 uniparental isodisomy predisposing to embryonal neoplasms. *Lancet.* 1991; 338:1079-80.
 65. Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, et al. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78:1444-53.
 66. Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, et al. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:2559-65.
 67. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, et al. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol.* 2003; 162:521-31.
 68. Slater EP, Diehl SM, Langer P, et al. Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol.* 2006; 154:587-98.

-
69. Wilkin F, Gagne N, Paquette J, Oligny LL, Deal C. Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:2048-56.
 70. West AN, Neale GA, Pounds S, et al. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2007; 67:600-8.
 71. 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; 83:1713-20.
 72. Boulle N, Baudin E, Gicquel C, et al. Evaluation of plasma insulin-like growth factor binding protein-2 as a marker for adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol.* 2001; 144:29-36.
 73. Grimberg A, Cohen P. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol.* 2000; 183:1-9.
 74. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev.* 2000; 21:215-44.
 75. Logie A, Boulle N, Gaston V, et al. Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line. *J Mol Endocrinol.* 1999; 23:23-32.

-
76. Fottner C, Hoeflich A, Wolf E, Weber MM. Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis. *Horm Metab Res*. 2004; 36:397-405.
 77. 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; 2:191-207.
 78. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev*. 2007; 28:20-47.
 79. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55:178-94.
 80. Zapata JM, Pawlowski K, Haas E, Ware CF, Godzik A, Reed JC. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J Biol Chem*. 2001; 276:24242-52.
 81. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 1990; 348:334-6.
 82. Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Marti A, et al. In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell*. 2004; 5:231-9.
 83. Scotlandi K, Manara MC, Nicoletti G, et al. Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors. *Cancer Res*. 2005; 65:3868-76.

-
84. Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol*. 1992; 6:1249-58.
 85. Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev*. 1997; 18:361-77.
 86. Hammer GD, Krylova I, Zhang Y, et al. Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell*. 1999; 3:521-6.
 87. Achermann JC, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet*. 1999; 22:125-6.
 88. Correa RV, Domenice S, Bingham NC, et al. A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:1767-72.
 89. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*. 1994; 77:481-90.
 90. Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, et al. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:10939-43.

-
91. Beuschlein F, Mutch C, Bavers DL, et al. Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology*. 2002; 143:3122-35.
 92. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, et al. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:615-9.
 93. Pianovski MA, Cavalli LR, Figueiredo BC, et al. SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer*. 2006; 42:1040-3.
 94. Sasano H, Shizawa S, Suzuki T, et al. Ad4BP in the human adrenal cortex and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80:2378-80.
 95. Hossain A, Li C, Saunders GF. Generation of two distinct functional isoforms of dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita-critical region on the X chromosome gene 1 (DAX-1) by alternative splicing. *Mol Endocrinol*. 2004; 18:1428-37.
 96. Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature*. 1997; 390:311-5.
 97. Lalli E, Melner MH, Stocco DM, Sassone-Corsi P. DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. *Endocrinology*. 1998; 139:4237-43.
 98. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, et al. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature*. 1994; 372:635-41.

-
99. Crawford PA, Dorn C, Sadovsky Y, Milbrandt J. Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol*. 1998; 18:2949-56.
 100. Ito M, Yu R, Jameson JL. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol*. 1997; 17:1476-83.
 101. Hanley NA, Rainey WE, Wilson DI, Ball SG, Parker KL. Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. *Mol Endocrinol*. 2001; 15:57-68.
 102. Babu PS, Bavers DL, Beuschlein F, et al. Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. *Endocrinology*. 2002; 143:665-73.
 103. Bakke M, Lund J. Transcriptional regulation of the bovine CYP17 gene: two nuclear orphan receptors determine activity of cAMP-responsive sequence 2. *Endocr Res*. 1995; 21:509-16.
 104. Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC, Rainey WE. Differential regulation of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol*. 2002; 28:125-35.
 105. Clemens JW, Lala DS, Parker KL, Richards JS. Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol side-chain cleavage promoter in rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1994; 134:1499-508.

106. Givens CR, Zhang P, Bair SR, Mellon SH. Transcriptional regulation of rat cytochrome P450c17 expression in mouse Leydig MA-10 and adrenal Y-1 cells: identification of a single protein that mediates both basal and cAMP-induced activities. *DNA Cell Biol.* 1994; 13:1087-98.
107. Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan MP, Parker KL. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol.* 1993; 7:852-60.
108. Leers-Sucheta S, Morohashi K, Mason JI, Melner MH. Synergistic activation of the human type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J Biol Chem.* 1997; 272:7960-7.
109. Liu Z, Simpson ER. Steroidogenic factor 1 (SF-1) and SP1 are required for regulation of bovine CYP11A gene expression in bovine luteal cells and adrenal Y1 cells. *Mol Endocrinol.* 1997; 11:127-37.
110. Sugawara T, Holt JA, Kiriakidou M, Strauss JF, 3rd. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry.* 1996; 35:9052-9.
111. Wang XL, Bassett M, Zhang Y, et al. Transcriptional regulation of human 11 β -hydroxylase (hCYP11B1). *Endocrinology.* 2000; 141:3587-94.
112. Reincke M, Beuschlein F, Lalli E, et al. DAX-1 expression in human adrenocortical neoplasms: implications for steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:2597-600.

113. Shibata H, Ikeda Y, Mukai T, et al. Expression profiles of COUP-TF, DAX-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis. *Mol Genet Metab.* 2001; 74:206-16.
114. Bassett MH, Mayhew B, Rehman K, et al. Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:5446-55.
115. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25:402-8.
116. Rubie C, Kempf K, Hans J, et al. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probes.* 2005; 19:101-9.
117. 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; 39:741-8.
118. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, et al. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res.* 1990; 50:5488-96.
119. Ghorab Z, Jorda M, Ganjei P, Nadji M, Melan A (A103) is expressed in adrenocortical neoplasms but not in renal cell and hepatocellular carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2003; 11:330-3.

-
120. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008; 358:502-11.
 121. Fottner C, Engelhardt D, Weber MM. Regulation of steroidogenesis by insulin-like growth factors (IGFs) in adult human adrenocortical cells: IGF-I and, more potently, IGF-II preferentially enhance androgen biosynthesis through interaction with the IGF-I receptor and IGF-binding proteins. *J Endocrinol*. 1998; 158:409-17.
 122. Penhoat A, Rainey WE, Viard I, Saez JM. Regulation of adrenal cell-differentiated functions by growth factors. *Horm Res*. 1994; 42:39-43.
 123. Perks CM, Holly JM. The insulin-like growth factor (IGF) family and breast cancer. *Breast Dis*. 2003; 18:45-60.
 124. Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F, et al. Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int J Cancer*. 2005; 114:249-56.
 125. Abiven G, Coste J, Groussin L, et al. 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; 91:2650-5.
 126. Kamio T, Shigematsu K, Kawai K, Tsuchiyama H. Immunoreactivity and receptor expression of insulinlike growth factor I and insulin in human adrenal tumors. An immunohistochemical study of 94 cases. *Am J Pathol*. 1991; 138:83-91.

-
127. Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W, Engelhardt D. Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. *Eur J Endocrinol*. 1997; 136:296-303.
 128. Werner H, Shalita-Chesner M, Abramovitch S, Idelman G, Shaharabani-Gargir L, Glaser T. Regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene by oncogenes and antioncogenes: implications in human cancer. *Mol Genet Metab*. 2000; 71:315-20.
 129. Werner H, Le Roith D. New concepts in regulation and function of the insulin-like growth factors: implications for understanding normal growth and neoplasia. *Cell Mol Life Sci*. 2000; 57:932-42.
 130. Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ, LeRoith D. Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:8318-23.
 131. Girnita L, Girnita A, Brodin B, et al. Increased expression of insulin-like growth factor I receptor in malignant cells expressing aberrant p53: functional impact. *Cancer Res*. 2000; 60:5278-83.
 132. Zhang J, Trent JM, Meltzer PS. Rapid isolation and characterization of amplified DNA by chromosome microdissection: identification of IGF1R amplification in malignant melanoma. *Oncogene*. 1993; 8:2827-31.
 133. Armengol G, Knuutila S, Lluís F, Capella G, Miro R, Caballín MR. DNA copy number changes and evaluation of MYC, IGF1R, and FES amplification in xenografts of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000; 116:133-41.

-
134. Almeida A, Muleris M, Dutrillaux B, Malfoy B. The insulin-like growth factor I receptor gene is the target for the 15q26 amplicon in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994; 11:63-5.
 135. McDermott U, Sharma SV, Dowell L, et al. Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:19936-41.
 136. Slomiany MG, Black LA, Kibbey MM, Tingler MA, Day TA, Rosenzweig SA. Insulin-like growth factor-1 receptor and ligand targeting in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2007; 248:269-79.
 137. Hopfner M, Huether A, Sutter AP, Baradari V, Schuppan D, Scherubl H. Blockade of IGF-1 receptor tyrosine kinase has antineoplastic effects in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2006; 71:1435-48.
 138. Tanno B, Mancini C, Vitali R, et al. Down-regulation of insulin-like growth factor I receptor activity by NVP-AEW541 has an antitumor effect on neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2006; 12:6772-80.
 139. Hopfner M, Baradari V, Huether A, Schofl C, Scherubl H. The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2006; 13:135-49.
 140. Percarpio B, Knowlton AH. Radiation therapy of adrenal cortical carcinoma. *Acta Radiol Ther Phys Biol*. 1976; 15:288-92.

-
141. Markoe AM, Serber W, Micaily B, Brady LW. Radiation therapy for adjunctive treatment of adrenal cortical carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 1991; 14:170-4.
 142. Magee BJ, Gattamaneni HR, Pearson D. Adrenal cortical carcinoma: survival after radiotherapy. *Clin Radiol*. 1987; 38:587-8.
 143. Fassnacht M, Hahner S, Polat B, et al. Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:4501-4.
 144. Coleman CN, Stevenson MA. Biologic basis for radiation oncology. *Oncology (Williston Park)*. 1996; 10:399-411; discussion: 11-5.
 145. Wen B, Deutsch E, Marangoni E, et al. Tyrphostin AG 1024 modulates radiosensitivity in human breast cancer cells. *Br J Cancer*. 2001; 85:2017-21.
 146. Betz MJ, Shapiro I, Fassnacht M, Hahner S, Reincke M, Beuschlein F. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists suppress adrenocortical tumor cell proliferation and induce differentiation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:3886-96.
 147. Ferruzzi P, Ceni E, Tarocchi M, et al. Thiazolidinediones inhibit growth and invasiveness of the human adrenocortical cancer cell line H295R. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:1332-9.
 148. Haluska P, Shaw HM, Batzel GN, et al. Phase I dose escalation study of the anti insulin-like growth factor-I receptor monoclonal antibody CP-751,871 in patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2007; 13:5834-40.

149. Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, et al. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol*. 2007; 21:2968-87.
150. Kiiveri S, Liu J, Arola J, et al. Transcription factors GATA-6, SF-1, and cell proliferation in human adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol*. 2005; 233:47-56.
151. Perrone RD, Bengel HH, Alexander EA. Sodium retention after adrenal enucleation. *Am J Physiol*. 1986; 250:E1-12.
152. Kim AC, Hammer GD. Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 265-266:10-6.
153. Mukai T, Kusaka M, Kawabe K, et al. Sexually dimorphic expression of Dax-1 in the adrenal cortex. *Genes Cells*. 2002; 7:717-29.
154. Niakan KK, Davis EC, Clipsham RC, et al. Novel role for the orphan nuclear receptor Dax1 in embryogenesis, different from steroidogenesis. *Mol Genet Metab*. 2006; 88:261-71.