TAMAYA CASTRO RIBEIRO

**Análise da expressão e do silenciamento do receptor tipo 1
do fator de crescimento semelhante à insulina em tumores
adrenocorticais humanos.**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Prof. Dra. Ana Claudia Latrônico Xavier

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro, Tamaya Castro

Análise da expressão e do silenciamento do receptor tipo 1 do fator de crescimento semelhante à insulina em tumores adrenocorticais humanos / Tamaya Castro Ribeiro. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientadora: Ana Claudia Latrônico Xavier.

Descritores: 1.Neoplasias do córtex suprarrenal 2.Receptor IGF tipo 1 3.siRNA 4.MicroRNAs 5.Proteínas 6.Imuno-histoquímica

USP/FM/DBD-413/14

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

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): bolsa de doutorado 2010/09503-7 e CAPES com bolsa de doutorado de demanda social.

Dedicatória

Aos meus pais, Reine e Eva, e ao meu esposo, Gabriel
por serem o meu porto seguro e pelo apoio irrestrito em
todos os momentos.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Ana Claudia Latronico, que me acolheu quando cheguei a São Paulo para fazer pós-graduação. A oportunidade de convivência me proporcionou um grande crescimento profissional e pessoal. Seu ânimo, sabedoria, dedicação, paciência e, principalmente, compreensão foram fundamentais durante todos esses anos de parceria. Obrigada por ter me ensinado a fazer pesquisa e pela chance de fazer parte de um grupo de pesquisa tão importante.

À Dra. Berenice, pelo incentivo constante e pelo exemplo de dedicação e preocupação com todos.

Ao Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge, por me auxiliar em toda a trajetória no LIM 42. Obrigada pelas sugestões sempre pertinentes e a pronta disponibilidade em me auxiliar.

Ao Dr. Madson Queiroz de Almeida, que a partir de seu trabalho de doutorado pude desenvolver meus projetos de mestrado e doutorado. Obrigada por pelo suporte em diversas etapas do projeto e pela cuidadosa análise de resultados.

À Dra. Maria Cândida Barisson Villares Fragoso, ao Dr. Bruno Ferraz de Souza e ao Dr. Antônio Marcondes Lerario por terem participado de minha banca de qualificação e por todas as sugestões para um bom prosseguimento do meu projeto.

À Dra. Luciana Ribeiro Montenegro, pelo convívio agradável e pela ajuda na realização do Western Blot.

À Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini, pela análise e leitura das lâminas de imunohistoquímica.

À Sr^a. Alda Wakamatsu, funcionária do LIM14, pelo processamento das lâminas de imunohistoquímica.

À Dra. Miriam Yumie Nishi pela paciência e auxílio em novos experimentos.

À Dra. Luciani Carvalho, por ter cedido gentilmente o reagente *Cell Titer*.

À Nilda e Rosangele pela disponibilidade sempre. Obrigada pelo auxílio e conversas na secretaria.

À Cidinha, por sua gentileza e por efetuar todas as compras necessárias.

À Fran e Luciana, pela dedicação em deixar todo o material necessário sempre preparado.

À Cris, por todos os momentos que passamos juntas na sala de cultura.

Às secretarias da Clínica Médica, Rose e Angélica, pelo auxílio e prontidão.

Aos pacientes com tumores adrenocorticais, por terem permitido que a pesquisa fosse realizada.

Às minhas amigas e companheiras de longa data, Aline e Mariana. Obrigada pela amizade, aprendizado, paciência e companheirismo em todos os momentos. Aline, muito obrigada por ter me ensinado os primeiros passos na cultura celular.

Às amigas, Gabriela, Andresa, Delanie e Isadora, obrigada por todo apoio e momentos de convivência e aprendizado.

Aos meus pais, Reine e Eva, pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas. Obrigada por todo o amor e carinho que foi fundamental para que eu seguisse firme por mais que os caminhos não fossem os mais fáceis a serem seguidos.

Ao meu esposo, Gabriel, o meu grande companheiro de caminhada. Obrigada por sua paciência, ânimo e apoio que nunca me deixam desanimar.

Finalmente, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

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

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

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de anexos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Tumores adrenocorticais.....	2
1.2	Sistema IGF	4
1.3	Sistema IGF e tumorigênese adrenocortical.....	10
1.3.1	Hiperexpressão de <i>IGF2</i>	10
1.3.2	Receptores de IGFs.....	13
1.3.3	Inibidores de IGF-1R	15
1.4	RNAs de interferência	16
1.5	MicroRNAs e câncer	20
2	OBJETIVOS.....	23
3	MÉTODOS.....	25
3.1	Considerações éticas.....	26
3.2	Linhagem de células de tumor adrenocortical humano.....	26
3.3	Pacientes	27
3.4	Silenciamento gênico de IGF1R por siRNA	29
3.5	Extração de RNA e transcrição reversa	30

3.6	Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real	31
3.7	Avaliação da expressão proteica por Western Blot.....	32
3.8	Ensaio de proliferação celular e apoptose	33
3.9	Extração de RNA e transcrição reversa para avaliação da expressão de microRNAs.....	34
3.10	Avaliação da expressão de microRNAs por PCR em tempo real	35
3.11	Micromatriz tecidual (TMA) e imunohistoquímica	36
3.12	Análise estatística	39
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Avaliação da expressão gênica de IGF1R após o silenciamento	42
4.2	Avaliação da expressão proteica de IGF-1R após o silenciamento	43
4.3	Efeito inibitório do silenciamento de IGF-1R na proliferação das células NCI H295R	45
4.4	Indução de apoptose pelo silenciamento de IGF-1R nas células NCI H295R.....	46
4.5	Avaliação da expressão de microRNAs relacionados a IGF1R	47
4.6	Avaliação de expressão proteica de IGF-1R	48
5	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÕES.....	60
7	ANEXOS	62
8	REFERÊNCIAS	88

Lista de abreviaturas e siglas

3' UTR	Região 3' não traduzida
AKT	Proteína quinase B
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Ciclo em que cada curva de amplificação ultrapassa o limiar de detecção da fluorescência
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA dupla fita (<i>Double strand RNA</i>)
H19	Gene de supressão tumoral não traduzido
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	Proteína que se liga aos IGFs
IGF-R	Receptor dos fatores de crescimento semelhantes à insulina
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato de receptor de insulina
LEF	<i>Enhancer</i> de fator linfóide
LIM	Laboratório de investigação médica
M6P	Manose-6-fosfato
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
miRNA	microRNA
mTOR	Via alvo da rapamicina mamífera
NCI H295R	Linhagem celular de carcinoma adrenocortical de adulto
p53	Proteína de supressão tumoral p53
<i>p57kip2</i>	Gene do inibidor da quinase dependente de ciclina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
RISC	Complexo silenciador induzido por RNA

RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNU 44	RNA nucleolar não traduzido 44
RNU 48	RNA nucleolar não traduzido 48
Shc	Proteína homóloga ao colágeno com domínio SH2
siRNA	RNA pequeno interferente (<i>Small interfering RNA</i>)
SW-13	Linhagem celular de carcinoma adrenocortical
TCF	Fator celular T
TMA	Micromatriz tecidual (<i>Tissue microarray</i>)

Lista de símbolos

Kb	Kilo base
min	Minuto
mm	Milímetro
mM	Mili molar
nm	Nano metro
α	Alfa
β	Beta
μm	Micro metro
# 1	Número 1
# 2	Número 2
Δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\pm$	Mais ou menos
=	Igual a
$\leq$	Menor ou igual
$\geq$	Maior ou igual
%	Porcentagem
χ^2	Qui-quadrado

Lista de figuras

- Figura 1 -** Sistema IGF. O sistema IGF é constituído por dois ligantes IGF-1 e IGF-2, receptores de membrana IGF-1R, IGF-2R, receptores de insulina (IR), receptores híbridos e IGFBPs..... 6
- Figura 2 -** Vias de sinalização de IGF-1R. A ligação de IGF-1 ou IGF-2 ao receptor IGF-1R ativa a transdução de sinais por meio das vias PI3K-AKT e RAS-RAF-MAPK que promovem a diminuição de apoptose e aumento nas taxas de proliferação celular, respectivamente..... 8
- Figura 3 -** Representação esquemática das alterações no *locus* 11p15 em tumores adrenocorticais. No córtex adrenal normal o gene *IGF2* sofre *imprinting* materno, enquanto os genes *H19* e *p57* sofrem *imprinting* paterno. No processo de tumorigênese ocorre perda do alelo materno e duplicação do alelo paterno, culminando em expressão bialélica de *IGF2* e silenciamento dos genes *p57* e *H19*..... 11
- Figura 4 -** Mecanismos de silenciamento gênico por RNAs de interferência. A: siRNAs. Os dsRNAs são clivados pela enzima Dicer em siRNAs. Estes são então incorporados ao complexo RISC. Uma vez ativado, este complexo se ligará ao RNAm complementar e promoverá a clivagem do RNAm alvo. B: miRNAs. O precursor dos miRNAs em forma de grampo de cabelo é clivado pela Dicer e em seguida o RNA clivado é acoplado ao complexo RISC. Este se ligará à região 3'UTR do RNAm alvo, impedindo a tradução..... 19
- Figura 5 -** Representação de parte do TMA construído para estudo da proteína IGF-1R em tumores adrenocorticais 37
- Figura 6 -** Perfil de expressão gênica de células da linhagem de tumor adrenocortical NCI H295R após 48 horas de transfecção com siRNAs controle negativo, siRNA # 1 e siRNA # 2. Entre o

grupo de células não tratadas e tratadas com siRNA controle negativo não houve diferença significativa no padrão de expressão ($p = 0,856$). Os siRNA # 1 e siRNA # 2 apresentaram padrão de eficiência bem semelhante ($p = 0,983$). A comparação do grupo tratado com controle negativo com o grupo tratado com siRNA # 1 e siRNA # 2 observou-se uma diferença significativa entre os níveis de expressão gênica ($p < 0,001$ para ambos siRNAs). NT: células não tratadas, CN: células tratadas com siRNA controle negativo, 1: células tratadas com siRNA # 1, 2: células tratadas com siRNA # 2..... 43

Figura 7 - Perfil de expressão proteica de células da linhagem de tumor adrenocortical NCI H295R após 48 horas de transfecção com siRNAs controle negativo, siRNA # 1 e siRNA # 2. Não se observou diferença significativa no padrão de expressão entre o grupo de células não tratadas e tratadas com siRNA controle negativo ($p = 0,248$). Também não houve diferença entre os grupos siRNA # 1 e siRNA # 2 ($p = 0,837$). A comparação do grupo tratado com controle negativo com o grupo tratado com siRNA # 1 e siRNA # 2 observou-se uma diferença significativa entre os níveis de expressão proteica ($p = 0,027$ e $p = 0,009$, respectivamente). NT: células não tratadas, CN: células tratadas com siRNA controle negativo, 1: células tratadas com siRNA # 1, 2: células tratadas com siRNA # 2 44

Figura 8 - Perfil de expressão proteica de células da linhagem de tumor adrenocortical NCI H295R após 48 horas de transfecção com siRNAs controle negativo, siRNA # 1 e siRNA # 2 44

Figura 9 - Efeitos de siRNAs específicos para IGF-1R na proliferação celular da linhagem de tumor adrenocortical NCI H295R. As células foram avaliadas em diferentes tempos: 24, 48 e 72 horas. Após 72 horas de transfecção observou-se 40% de redução na taxa de proliferação celular ($p < 0,001$). NT: células não tratadas, CN: células tratadas com siRNA controle negativo, 1: células tratadas com siRNA # 1, 2: células tratadas com siRNA # 2. 45

Figura 10 - Efeitos de siRNAs específicos para IGF-1R nas taxas de apoptose da linhagem de tumor adrenocortical NCI H295R.

As células foram avaliadas em diferentes tempos: 24, 48 e 72 horas. Após 72 horas de transfecção observou-se 45% de redução na taxa de apoptose. NT: células não tratadas, CN: células tratadas com siRNA controle negativo, 1: células tratadas com siRNA # 1, 2: células tratadas com siRNA # 2..... 47

- Figura 11 -** Expressão dos microRNAs 100, 375, 145 e 126 em trinta e duas amostras de tumor adrenocortical com expressão normal ou aumentada de *IGF1R*. Não se observou diferença de expressão de todos os microRNAs entre o grupo de expressão de *IGF1R* normal e aumentada ($p = ns$)..... 48
- Figura 12 -** A: Tumor adrenocortical diagnosticado em uma paciente adulta com imunorreatividade negativa para IGF-1R (aumento 20X) B: Tumor adrenocortical diagnosticado em uma paciente adulta com imunorreatividade forte para IGF-1R nuclear (aumento 20X)..... 49
- Figura 13 -** Curva de sobrevida global de pacientes adultos portadores de carcinoma adrenocortical de acordo com a expressão proteica do IGF-1R. Esta análise revelou que a expressão do IGF-1R não se correlacionou com sobrevida global ($p = 0,385$)..... 50
- Figura 14 -** Curva de sobrevida livre de doença em pacientes adultos portadores de carcinoma adrenocortical de acordo com a expressão proteica do IGF-1R. Esta análise revelou que a expressão do IGF-1R não se correlacionou com sobrevida livre de doença ($p = 0,37$)..... 51

Lista de tabelas

Tabela 1 -	MicroRNAs diferencialmente expressos em carcinomas adrenocorticais de adultos quando comparados com adenomas adrenocorticais	22
Tabela 2 -	Características clínicas de 202 pacientes com tumores adrenocorticais.....	28
Tabela 3 -	Características clínicas e moleculares de 32 pacientes com tumor adrenocortical selecionados para o estudo de expressão de microRNAs.....	29
Tabela 4 -	siRNAs selecionados para o silenciamento de <i>IGF1R</i>	30
Tabela 5 -	MicroRNAs selecionados para avaliação de expressão por PCR em tempo real	36
Tabela 6 -	Expressão e localização de IGF-1R em amostras de tumor adrenocortical.....	50

Lista de anexos

Anexo A	Dados clínicos de 202 pacientes com tumor adrenocortical..... 63
Anexo B	Dados clínicos e moleculares de 32 pacientes com tumor adrenocortical selecionados para estudo de expressão de microRNAs..... 72
Anexo C	Mapa da micromatriz tecidual de 202 pacientes com tumor adrenocortical..... 73
Anexo D	Trabalho publicado: <i>“Insulin-like growth factor system on adrenocortical tumorigenesis”</i> 74
Anexo E	Trabalho publicado: <i>“Amplification of the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Gene Is a Rare Event in Adrenocortical Adenocarcinomas: Searching for Potential Mechanisms of Overexpression”</i>80

Resumo

Ribeiro TC. *Análise da expressão e do silenciamento do receptor tipo 1 do fator de crescimento semelhante à insulina em tumores adrenocorticais humanos*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 99p.

Introdução O sistema dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) desempenha importante papel no crescimento e desenvolvimento celular normal. Hiperexpressão do gene *IGF1R* tem sido demonstrada em diversos tumores, sugerindo que a expressão deste receptor represente um pré-requisito fundamental para transformação celular. Nosso grupo de pesquisa demonstrou o aumento de expressão de *IGF1R* em tumores adrenocorticais pediátricos. **Objetivos:** Induzir o silenciamento do gene *IGF1R* por siRNA na linhagem de tumor adrenocortical humano NCI H295R, bem como avaliar os efeitos *in vitro* por meio da análise de proliferação celular e apoptose desta linhagem celular. Adicionalmente, avaliar a expressão de IGF-1R e de microRNAs relacionados a sua transcrição em tumores adrenocorticais humanos. **Pacientes e métodos:** A linhagem celular de carcinoma adrenocortical humano NCI H295R foi cultivada e submetida ao tratamento com 2 siRNAs específicos para IGF-1R. Todos os experimentos foram realizados em quatro grupos: (1) células não tratadas com siRNA, (2) células tratadas com siRNA # 1, (3) células tratadas com siRNA # 2 e (4) células tratadas com o siRNA controle negativo. A expressão gênica e proteica de IGF-1R foram determinadas por meio das técnicas de PCR em tempo real e Western Blot, respectivamente. Os efeitos do silenciamento de IGF-1R *in vitro* foram avaliados por ensaios de proliferação celular e análise de atividade de caspases. Além disso, 202 pacientes com tumor adrenocortical foram selecionados para o estudo de expressão proteica de IGF-1R por imunohistoquímica. Para avaliação de expressão de microRNAs relacionados à expressão de IGF-1R (miR-100, 375, 145 e 126) por PCR em tempo real foram selecionados 32 pacientes dos 202 disponíveis. **Resultados:** A expressão de IGF-1R foi significativamente diminuída nas células tratadas com siRNA # 1 e siRNA # 2. Os valores relativos de RNA mensageiro de *IGF1R* diminuíram aproximadamente 50% e as análises de Western Blot revelaram uma redução de 30% na proteína de IGF-1R. A diminuição de expressão foi acompanhada por uma redução de 40% na taxa de crescimento celular *in vitro* e um aumento de 45% das taxas

de apoptose. A análise de expressão dos microRNAs 100, 375, 145 e 126 demonstrou que a expressão de IGF-1R não se correlaciona com a expressão destes RNAs pequenos. Adicionalmente, a análise de expressão proteica de IGF-1R em tumores adrenocorticais humanos revelou que expressão forte (20%) de IGF-1R foi mais comum em carcinomas de adultos. Além disso, a imunolocalização do IGF-1R nos carcinomas (19%) foi mais frequentemente nuclear em relação aos adenomas de adultos. **Conclusões:** Os dados obtidos reforçam a importância de IGF-1R nas vias tumorigênicas das neoplasias malignas do córtex da glândula suprarrenal. A inibição deste receptor foi capaz de inibir o crescimento tumoral *in vitro* por meio da redução das taxas de proliferação celular e aumento da apoptose em linhagem celular de carcinoma adrenocortical humano. Além disso, a expressão proteica nuclear de IGF-1R foi mais comum entre os carcinomas, sugerindo representar um marcador biológico desta neoplasia.

Descritores: 1. Neoplasias do córtex suprarrenal 2. Receptor IGF tipo 1 3. siRNA 4. microRNAs 5. Proteínas 6. Imunohistoquímica

Summary

Ribeiro TC. *Analysis of expression and silencing of insulin-like growth factor 1 receptor in human adrenocortical tumors*. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 99p.

Introduction: The insulin-like growth factor (IGF) system plays a key role in normal cell growth and development. *IGF1R* overexpression has been demonstrated in several tumors suggesting that its expression is a prerequisite for cell transformation. We demonstrated *IGF1R* overexpression in pediatric adrenocortical tumors. **Objectives:** To induce *IGF1R* silencing by siRNA in a human adrenocortical cell line NCI H295R and evaluate its effects on cell proliferation and apoptosis. Additionally, evaluate the expression of IGF-1R protein and microRNAs related to its transcription in human adrenocortical tumors. **Patients and methods:** The human adrenocortical tumor cell line NCI H295R was cultured and treated with 2 specific *IGF1R* siRNA. All experiments were carried out in four groups: (1) untreated NCI H295R cells, (2) NCI H295R cells transfected with specific *IGF1R* siRNA # 1, (3) NCI H295R cells transfected with specific *IGF1R* siRNA # 2 and (4) NCI H295R cells transfected with a negative control. *IGF-1R* gene and protein expression was determined by the techniques of real-time PCR and Western blot, respectively. We assessed the effects of IGF-1R silencing on cell proliferation and apoptosis. Moreover, 202 patients with adrenocortical tumors were selected for the study of IGF-1R protein expression by immunohistochemistry. In the analysis of microRNAs that are related to *IGF1R* (miR-100, 375, 145 e 126) by real time PCR, 32 out 202 patients were selected. **Results:** IGF-1R levels were significantly decreased in cells that were treated with IGF-1R siRNA # 1 and siRNA # 2. The relative values of *IGF1R* mRNA decreased approximately 50% and Western blot analysis revealed a 30% of reduction in IGF-1R protein. Downregulation of this gene was accompanied by a reduction in 40% of cell growth *in vitro* and an increase in 45% of apoptosis. The analysis of microRNAs demonstrated that *IGF1R* expression is not correlated with the expression of these small RNAs. Additionally, the analysis of IGF-1R protein expression in human adrenocortical tumors revealed that strong expression (20%) of IGF-1R was more common in adult carcinomas. Moreover, the nuclear IGF-1R was more frequent in carcinomas diagnosed in adults (19%) when compared to adenomas. **Conclusions:** These data demonstrate the importance of IGF-1R

in tumorigenic pathways of malignant neoplasms of the adrenocortical gland. IGF-1R silencing could inhibit tumor growth *in vitro* by reducing cell proliferation and increasing apoptosis in a cell line of human adrenocortical carcinoma. Furthermore, nuclear IGF-1R expression was more frequent in carcinomas diagnosed in adults, suggesting that IGF-1R may be a biological marker of this neoplasia.

Descriptors: 1. Adrenal cortex neoplasms 2. Receptor, IGF type 1 3. siRNA
4. microRNAs 5. Proteins 6. Immunohistochemistry

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumores adrenocorticais

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

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

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

Em 1984, foram propostos os critérios de Weiss baseados em nove características histopatológicas: altas taxas de mitoses, mitoses atípicas, aumento nuclear, pequena porcentagem de células claras, necrose, arquitetura difusa do tumor, invasão capsular, invasão sinusoidal e invasão venosa (9). Apesar de apresentar boa acurácia em pacientes adultos, o sistema proposto por Weiss, tem como limitação a não aplicabilidade em tumores pediátricos (10). Tumores adrenocorticais pediátricos que apresentam prognóstico desfavorável baseado somente em critérios histopatológicos, frequentemente, apresentam evolução clínica favorável sem recorrência (2, 10). Os critérios definitivos de malignidade nesse grupo são a presença de invasão de tecidos e órgãos adjacentes ou metástases. Diante dessas observações, embora rotineiramente utiliza-se em nosso serviço o sistema de Weiss para pontuar os tumores adrenocorticais pediátricos, optou-se por utilizar as nomenclaturas “cl clinicamente benignos” e “cl clinicamente malignos” para classificação dos mesmos.

O fator prognóstico mais importante nos tumores adrenocorticais pediátricos é o estadiamento proposto por MacFarlane (11) e modificado por Sullivan (12). O prognóstico de pacientes com doença localizada (estádios I e II) geralmente é bom, enquanto que os portadores de doença avançada (estádios III e IV) apresentam um prognóstico mais desfavorável (7). A maior parte dos casos encontra-se nos estádios III e IV ao diagnóstico, embora séries mais recentes tenham mostrado tendência a um diagnóstico em

estádios mais precoces, provavelmente pela maior disponibilidade e melhor qualidade técnica dos exames de imagem (13). A ressecção tumoral é o melhor tratamento para os carcinomas adrenocorticais em estágios iniciais. No entanto, observa-se um prognóstico desfavorável, com mortalidade de 15 a 47% em cinco anos (7).

O diagnóstico diferencial entre processos benignos e malignos ainda representa um desafio. A distinção exata entre adenomas e carcinomas é muito importante visto que o tratamento é radicalmente diferente (14). Nos últimos anos, avanços consideráveis para a compreensão da patogênese de tumores adrenocorticais foram alcançados e diferentes estratégias tem permitido essas conquistas: 1) Identificação de alterações genéticas nas síndromes familiares raras e avaliação se os mesmos defeitos estão presentes em tumores esporádicos; 2) Investigação de vias de sinalização consideradas importantes em outros tipos de tumores; 3) Emprego de novas técnicas para identificar novas vias de sinalização; 4) Estudos em modelos animais com um ou mais defeitos genéticos em vias de sinalização conhecidas (15).

1.2 Sistema IGF

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) desempenham importante função no crescimento e desenvolvimento de muitos tecidos por meio da regulação da proliferação, diferenciação, apoptose e transformação

celular (16). Inicialmente estes fatores foram identificados como hormônios polipeptídeos expressos no fígado (17). Posteriormente, foi demonstrado que IGFs são sintetizados pela maioria dos tecidos extra-hepáticos como cérebro, rins, estômago e glândula suprarrenal, nos quais exibem ações autócrinas ou parácrinas (17, 18). Adicionalmente, células tumorais e fibroblastos podem produzir IGFs (19), que são capazes de interagir com outros fatores produzidos localmente, incluindo os hormônios esteróides (20).

O sistema IGF é constituído pelos ligantes IGF-1 e IGF-2, quatro receptores de membrana, seis proteínas ligadoras (IGFBP 1 - 6) e proteases de IGFBPs (Figura 1) (21).

IGF-1 e IGF-2 são polipeptídeos de cadeia simples que possuem grande homologia em suas sequências de aminoácidos (22). IGF-1 atua como um importante fator na progressão do ciclo celular (23), bem como nos efeitos anabólicos do hormônio de crescimento na vida pós-natal e sua concentração aumenta durante o desenvolvimento (24). Além disso, dados sugerem que altas concentrações de IGF-1 estejam relacionadas ao risco de desenvolvimento de cânceres de mama e próstata (25). IGF-2 tem relevante papel durante o desenvolvimento fetal e sua função durante a fase adulta ainda não está bem definida (24). Este fato é ilustrado pelo declínio significativo das concentrações séricas e teciduais de IGF-2 no período pós-natal (26).

Fottner *et al.* (18) demonstraram que o sistema IGF desempenha função fundamental na regulação secretora da glândula suprarrenal. Os peptídeos IGF-1 e IGF-2 são capazes de induzir esteroidogênese em células adrenocorticais *in vitro* e *in vivo* (27-29). Além disso, o sistema IGF está envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento adrenocortical (18). IGF-2 parece ser um fator de crescimento importante na glândula suprarrenal fetal, na qual são expressas altas concentrações deste fator.

Figura 1 – Sistema IGF. O sistema IGF é constituído por dois ligantes IGF-1 e IGF-2, receptores de membrana IGF-1R, IGF-2R, receptores de insulina (IR), receptores híbridos e IGFBPs. Ryan PD *et al.* (30).

O receptor tipo 1 dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1R) é um receptor tetramérico constituído por duas subunidades α e duas subunidades β , de localização transmembrana, que estão unidas por pontes dissulfídicas. As subunidades α são estruturas extracelulares nas

quais os IGFs se ligam, enquanto as subunidades β contêm um domínio tirosina quinase intracelular (31). IGF-1R apresenta 84% de homologia com o receptor de insulina em seu domínio tirosina quinase (32).

IGF-1R é ativado por IGF-1 e IGF-2. A ligação do receptor com estes fatores de crescimento promove a autofosforilação das tirosinas 1131, 1135 e 1136, localizadas no domínio quinase da subunidade β , gerando resíduos fosfotirosina. Estes atuam como sítios acopladores para moléculas sinalizadoras, como os substratos de IR (IRS-1 a IRS-4) e domínios homólogos de Shc. O recrutamento destas moléculas ativa a sinalização de IGF-1R por meio das vias fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K-AKT) que desencadeia decréscimo de apoptose e da via RAS-RAF-proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) que promove o aumento de proliferação celular (33) (Figura 2).

O gene *IGF1R* está localizado no braço longo do cromossomo 15 posição 25-26 (15q25 - 26) e tem aproximadamente 100 Kb organizadas em 21 exons (34). Este gene codifica um único polipeptídeo de 1367 aminoácidos que é constitutivamente expresso na maioria das células. Os exons 1 a 11 codificam a região 5' não traduzida, o peptídeo sinal e a subunidade α , enquanto que os exons 12 a 21 codificam a subunidade β e a região 3' não traduzida (34, 35). Doze dos 21 exons do gene *IGF1R* são idênticos ao gene homólogo do receptor da insulina (36). A região de maior semelhança é a que codifica parte da subunidade β (exons 16 - 20) no domínio tirosina quinase (34).

Figura 2 – Vias de sinalização de IGF-1R. A ligação de IGF-1 ou IGF-2 ao receptor IGF-1R ativa a transdução de sinais por meio das vias PI3K-AKT e RAS-RAF-MAPK que promovem a diminuição de apoptose e aumento nas taxas de proliferação celular, respectivamente. Adaptado de Girnita L. *et al.* (37).

A importância de *IGF1R* no desenvolvimento normal de mamíferos é clara em estudo com camundongos modificados (38). Estes nascem com 45% do tamanho de camundongos normais e morrem rapidamente devido à severa hipoplasia pulmonar (38).

Existem fortes evidências de que a via de IGF-1R tem importância na transformação, crescimento e sobrevivência das células neoplásicas (39). Estudos demonstraram hiperexpressão de *IGF1R* em diversos tumores primários e células derivadas de cânceres (40, 41). Apesar de os

mecanismos moleculares que promovem o aumento de expressão de *IGF1R* ainda não terem sido bem elucidados, dados sugerem que a expressão deste receptor seja pré-requisito fundamental para transformação celular.

IGF-2R, também conhecido como IGF-2/M6PR, é um receptor de cadeia simples que possui sítios de ligação para IGF-2 e proteínas que contém manose-6-fosfato (22). Este receptor desempenha papel fundamental na regulação do crescimento celular promovendo a degradação lisossomal de IGF-2 e, portanto, reduzindo a biodisponibilidade deste peptídeo (20). Em consequência desta degradação, IGF-2R tem sido considerado um potencial supressor tumoral. De fato, IGF-2/M6PR encontra-se mutado ou deletado em alguns tumores malignos (18). Perda de heterozigose do *locus* de IGF-2/M6PR é um evento frequente em tumores adrenocorticais e suporta a hipótese de que este receptor possa ser um gene de supressão tumoral na tumorigênese adrenocortical (42).

Ainda constituem o sistema IGF os receptores de insulina (IR) e receptores híbridos. IR está relacionado ao controle de glicose e metabolismo e possui duas isoformas produzidas por *splicing* alternativo do exon 11, gerando o exon 11- ou isoforma A (IR-A) e exon 11+ ou isoforma B (IR-B) (43). As duas isoformas de IR são expressas de maneira específica, sendo IR-A altamente expressa em tecidos fetais e IR-B encontrada em tecidos adultos (44). IR-A promove o crescimento em resposta ao estímulo de IGF-2 e apresenta elevada expressão em alguns leiomiosarcomas deficientes em IGF-1R (45). Os receptores híbridos são compostos por

hemirreceptores de IR e IGF-1R (46) e sua presença varia de acordo com o tecido. Estes receptores funcionam predominantemente como IGF-1R em função do fato de se ligarem com maior afinidade ao IGF-1 (22).

As ações biológicas de IGF-1 e IGF-2 são moduladas por uma família de proteínas que se ligam com alta afinidade aos IGFs (IGFBP 1 - 6) (47). Estas proteínas tem múltiplas e complexas funções. IGFBPs são capazes de inibir ou aumentar a ação destes fatores de crescimento, resultando na supressão ou no estímulo da proliferação celular (48). As IGFBPs desempenham três principais funções: 1) transportam os IGFs, 2) protegem IGFs de degradação e 3) regulam a interação com IGF-1R. IGF-1 e IGF-2 possuem maior afinidade por IGFBPs quando comparado ao IGF-1R. A ligação destas proteínas regulatórias aos IGFs bloqueia a interação com o receptor e diminui a ação destes fatores de crescimento. No entanto, a ligação destes com IGFBPs os protege de degradação proteolítica e aumenta sua meia vida (49).

1.3 Sistema IGF e tumorigênese adrenocortical

1.3.1 Hiperexpressão de *IGF2*

Avanços consideráveis para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares relacionados à tumorigênese adrenocortical foram obtidos nos últimos anos (50, 51). O estudo de síndromes genéticas associadas a

tumores adrenocorticais contribuiu de maneira significativa para este progresso. Atualmente, o sistema IGF tem sido uma das vias mais investigadas em tumores do córtex adrenal (52).

O gene *IGF2* está localizado na região 11p15 que é organizada em 2 diferentes *clusters*: um domínio telomérico que contém os genes *IGF2* (53) e *H19* (54) e um domínio centromérico que inclui o gene supressor *p57kip2*; relacionado aos mecanismos de controle do ciclo celular (55). *IGF2* sofre *imprinting* materno sendo expresso apenas pelo alelo paterno (53). *H19* não é traduzido e atua como um potencial modulador expressão de *IGF2*. *H19* e *p57kip2* também sofrem *imprinting*, mas ao contrário de *IGF2*, estes genes são expressos a partir do alelo materno (56). Isodissomia uniparental do *locus* 11p15 é associada com a síndrome de Beckwith-Wiedemann (57). Essa alteração estrutural é caracterizada pela perda do alelo materno e duplicação do alelo paterno, promovendo a expressão bialélica de *IGF2* e diminuição da expressão de *H19* e *p57kip2* (57) (Figura 3).

Figura 3 – Representação esquemática das alterações no locus 11p15 em tumores adrenocorticais. No córtex adrenal normal o gene *IGF2* sofre *imprinting* materno, enquanto os genes *H19* e *p57* sofrem *imprinting* paterno. No processo de tumorigênese ocorre perda do alelo materno e duplicação do alelo paterno, culminando em expressão bialélica de *IGF2* e silenciamento dos genes *p57* e *H19*.

Alterações na região 11p15 são frequentemente observadas em carcinomas adrenocorticais esporádicos de adultos, em contrapartida, são raramente encontradas em tumores adrenocorticais benignos (57). Gicquel *et al.* (58) descreveram isodissomia unipatental paterna em tumores adrenocorticais de pacientes adultos que apresentavam tumores com expressão alta de RNA mensageiro (RNAm) de *IGF2*, sugerindo que estes eventos moleculares poderiam estar implicados na tumorigênese adrenocortical. Anos depois, o mesmo grupo de pesquisa confirmou o papel relevante deste fator de crescimento no fenótipo maligno em um grupo de pacientes com tumor adrenocortical (57). Hiperexpressão de *IGF2* e/ou alterações na região 11p15 foram identificadas em 27 de 29 carcinomas e em 3 de 35 adenomas (57).

IGF2 tem sido descrito como um dos genes mais expressos em tumores adrenocorticais malignos (59, 60). O grau de expressão de *IGF2* foi associado a um fenótipo mais agressivo e um risco cinco vezes maior de recorrência (61, 62). Em um grupo de pacientes brasileiros, pediátricos e adultos, demonstramos previamente que os transcritos de *IGF2* estão hiperexpressos principalmente em carcinomas quando comparados aos adenomas (63). IGF-2 também foi um importante fator autócrino na proliferação da linhagem celular NCI H295R (63). Além disso, uma análise de *microarray* realizada em 24 tumores adrenocorticais pediátricos (5 adenomas, 18 carcinomas e 1 não funcionante) revelou que a média de

expressão de *IGF2* nos tumores foi 18 vezes maior que na glândula suprarrenal normal (64).

Animais transgênicos com hiperexpressão de *IGF2* tiveram hiperplasia da zona fasciculada e o peso da glândula suprarrenal foi significativamente maior que nos animais controles (65). Apesar da hiperplasia, estes animais não desenvolveram tumores, sugerindo que apenas o aumento de expressão de *IGF2* não é suficiente para a transformação maligna de células adrenocorticais e que outros fatores são necessários para a tumorigênese.

1.3.2 Receptores de IGFs

Alterações na sinalização de IGF-1R tem sido associadas a diversas patologias, incluindo retinopatia diabética (66), nefropatia diabética (67), doença cardiovascular (68) e diversos cânceres (69). O papel essencial de IGF-1R na transformação celular foi bem estabelecido em estudos realizados em células que não possuem IGF-1R (derivadas de embriões com ablação de *IGF1R* - fenótipo letal). A linhagem celular modificada não é capaz de sofrer transformação quando expostas a diferentes oncogenes celulares e virais (70).

A sinalização de IGF-2 por meio de IGF-1R tem sido considerada um mecanismo relevante na tumorigênese adrenocortical. Em células normais,

os receptores tirosina quinase são altamente regulados e responsáveis por um crescimento controlado. No entanto, em células tumorais, estas moléculas estão ativadas desencadeando um estímulo anormal e consequentemente, falhas na regulação celular. O receptor IGF-1R é comumente hiperexpresso em tumores incluindo melanomas malignos (71), câncer de cólon (72), pâncreas (73) e próstata (74). Em tumores adrenocorticais, um aumento da expressão deste receptor foi descrita apenas em carcinomas (75, 76). Em acordo com estes dados, nós demonstramos em uma coorte brasileira de crianças e adultos com tumores adrenocorticais que a expressão de *IGF1R* foi significativamente maior em carcinomas pediátricos quando comparada a expressão obtida em adenomas (63). Além disso, a expressão de *IGF1R* foi um preditor de metástases no grupo pediátrico (63). Hiperexpressão de *IGF1R* foi confirmada em outro grupo de pacientes pediátricos com tumores adrenocorticais (77). Estes dados demonstraram que a sinalização de IGF, principalmente a mediada por IGF-1R, representa um potencial alvo terapêutico.

IGF2R é considerado um gene de supressão tumoral e defeitos que promovem a perda de função deste receptor foram relacionados a uma ativação de IGF-1R mediada por IGF-2 mais efetiva, além de maiores taxas de proliferação celular (78). De fato, perda de heterozigossidade no *locus* de *IGF2R* foi identificada em tumores adrenocorticais (42). Este defeito molecular foi detectado em 58% dos tumores malignos e em apenas 9% dos tumores benignos, sugerindo que a perda de heterozigose deste *locus* é um

evento tardio na tumorigênese adrenocortical e que este receptor possa representar um potencial gene de supressão tumoral na glândula suprarrenal (42).

1.3.3 Inibidores de IGF-1R

Almeida *et al.* (63) demonstraram que um inibidor seletivo de IGF-1R, NVP-AEW541, apresentou efeitos antitumorais em linhagens celulares de tumor adrenocortical provenientes de um carcinoma de adulto (NCI H295R) e de um tumor pediátrico. Estes dados sugerem que inibidores de IGF-1R representam uma terapia promissora para carcinomas adrenocorticais humanos. De modo semelhante, Shen *et al.* (79) elucidaram a importância do sistema IGF na linhagem de carcinoma adrenocortical SW-13. A exposição das células ao IGF promoveu maiores taxas de proliferação celular e este efeito foi correlacionado positivamente com as concentrações de IGF. Além disso, anticorpos para IGF-1R inibiram os efeitos dos IGFs diminuindo a proliferação das células SW-13 (79). Em um teste pré-clínico, Barlaskar *et al.* (80) estabeleceram que a inibição da via de IGF com dois agentes farmacológicos (NVP-AEW541 e IMC-A12) resultou na redução do crescimento de linhagens celulares de tumor adrenocortical bem como de tumores. De modo interessante, esta terapia foi mais potente que o tratamento com mitotane (80).

1.4 RNAs de interferência

A descoberta dos RNAs de interferência revolucionou o entendimento da regulação gênica. Este mecanismo revelou uma variedade de RNAs não codificantes pequenos (~20 a 30 nucleotídeos) que controlam a informação genética (81). Em 1998, Fire *et al.* (82) descreveram estes RNAs em células do nemátodo *C. elegans* e demonstraram que estas moléculas possuíam a capacidade de silenciar alguns genes por meio da interferência em seus RNAs mensageiros (82). Após essa primeira descrição, os RNAs interferentes se mostraram funcionais em vírus, organismos unicelulares, fungos, plantas e animais (83). Esta descoberta promoveu uma revolução na biologia molecular e nas ciências médicas devido a sua habilidade de identificar funções gênicas ou silenciar genes com possíveis funções patogênicas.

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de moléculas conservadas evolutivamente, não codificantes, endógenas e pequenas (~19 -25 nucleotídeos) que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente. Aproximadamente 5% do genoma humano codifica e produz mais de 1000 miRNAs que regulam pelo menos 30% dos genes humanos (84). Diversos miRNAs tem sido identificados e relacionados com funções importantes no desenvolvimento, proliferação, apoptose e diferenciação (85).

O mecanismo de ação de RNA de interferência pode ser desencadeado por RNAs dupla fita (dsRNA) exógenos ou de infecções

virais, conhecidos como RNAs pequenos interferentes (siRNAs) e microRNAs não codificantes endógenos (86).

Um ponto fundamental é que os RNAs dupla fita que dão origem a siRNAs apresentam perfeito emparelhamento de bases para exibir suas ações, enquanto que nos miRNAs podem ocorrer sequências incompatíveis. Esses erros de emparelhamento não impedem sua atuação, sendo necessário apenas o pareamento dos nucleotídeos 2-8 do miRNA (81). Um mesmo RNAm pode apresentar diversas regiões de pareamento na sua região 3' não traduzida (3'UTR), permitindo a ligação de várias cópias de um mesmo miRNA. De maneira semelhante, miRNAs diferentes são capazes de inibir, com graus de eficiência diferentes, um mesmo RNA mensageiro (87).

As duas vias de RNA de interferência (siRNA e miRNA) possuem um modo de ação comum: atuam por meio do complexo silenciador induzido por RNA (RISC) que promove o silenciamento do RNAm alvo via degradação ou repressão da transcrição (86) (Figura 4).

A biogênese de miRNAs é iniciada no núcleo com a formação de um RNA longo em forma de dupla fita imperfeita, com a presença de uma alça em uma das extremidades, denominado miRNA primário (pri-miRNA) (88). Ainda no núcleo, o pri-miRNA sofre ação da enzima Drosha que levará a formação de uma molécula mais curta, com aproximadamente 70 nucleotídeos, em forma de “grampo de cabelo”, denominada pré-miRNA. O pré-miRNA se associa à proteína transportadora exportina-5 e migra para o citoplasma (81).

No citoplasma, as vias de processamento convergem para os miRNAs endógenos e siRNAs exógenos. Ambos RNA interferentes sofrem clivagem por um complexo formado por uma enzima RNase-III-endonuclease chamado *Dicer*. Essa clivagem retira a alça presente em uma das extremidades dos miRNAs e forma um RNA dupla fita de miRNA e siRNA de aproximadamente 22 nucleotídeos cada, tendo uma delas a principal ação inibitória, denominada miRNA maduro (81). Uma das fitas é ligada ao complexo RISC para direcionar o silenciamento e a outra fita é degradada. A fita guia permanece ligada ao complexo RISC e direciona este complexo até as moléculas de RNAm resultando na degradação do RNAm alvo ou repressão da tradução (89) (Figura 4).

Estes achados demonstram que pelo menos dois mecanismos diferentes podem atuar no silenciamento gênico. Após os primeiros relatos, os RNA interferentes se tornaram importantes no estudo da função gênica em mamíferos. As vantagens destas moléculas em relação a outras estratégias de silenciamento gênico incluem sua alta especificidade (em alguns casos uma mutação de ponto pode anular o efeito de silenciamento), versatilidade (RNAs de interferência podem ser desenvolvidos para qualquer gene), e grande eficiência (em muitos casos os genes podem ser silenciados em mais de 90%) (90).

Figura 4 – Mecanismos de silenciamento gênico por RNAs de interferência. A – siRNAs. Os dsRNAs são clivados pela enzima Dicer em siRNAs. Estes são então incorporados ao complexo RISC. Uma vez ativado, este complexo se ligará ao RNAm complementar e promoverá a clivagem do RNAm alvo. **B – miRNAs.** O precursor dos miRNAs em forma de grampo de cabelo é clivado pela Dicer e em seguida o RNA clivado é acoplado ao complexo RISC. Este se ligará à região 3'UTR do seu RNAm alvo, impedindo a tradução. Adaptado de Mak J (91).

1.5 MicroRNAs e câncer

A falha regulatória de miRNAs, provocando aumento ou diminuição de expressão, desempenha papel relevante em algumas doenças incluindo o desenvolvimento de tumores malignos (92). Os efeitos dessa alteração em células tumorais incluem o silenciamento de genes supressores tumorais, ativação de oncogenes, e/ou fatores que crescimento que são importantes na angiogênese e desenvolvimento de metástases (92). Além disso, os miRNAs podem atuar como marcadores tumorais visto que são mais estáveis que os RNAm e podem ser analisados diretamente em fluidos como plasma e urina (93-95). Portanto, os miRNAs podem ser explorados como biomarcadores para diagnóstico, prognóstico e terapias.

Os primeiros relatos do envolvimento de miRNAs em neoplasias surgiram com a observação da localização dos genes codificadores de miRNAs em regiões frágeis dos cromossomos. Regiões cromossômicas frágeis são sítios propensos a translocações, deleções e amplificações. Estas são regiões nas quais frequentemente ocorrem alterações cromossômicas em neoplasias (96).

Especificamente em tumores adrenocorticais de adultos uma variedade de miRNAs se apresentaram diferencialmente expressos em carcinomas quando comparados com adenomas (97-100) (Tabela 1).

Apenas um trabalho avaliou a expressão de miRNA em tumores adrenocorticais pediátricos (77) que se diferem de tumores de adultos por diversas características clínicas, patológicas e moleculares. Dentre os

miRNAs mais significantemente hipoexpressos estavam miR-99a/miR-100 os quais possuem importante função na regulação da via IGF-1R-mTOR. miR-483-3p estava altamente hiperexpresso, independentemente da malignidade dos tumores (77).

Tabela 1 – MicroRNAs diferencialmente expressos em carcinomas adrenocorticais de adultos quando comparados com adenomas adrenocorticais (101).

	Tombol <i>et al.</i> (97)	Soon <i>et al.</i> (98, 99)	Patterson <i>et al.</i> (100)
miRNAs com expressão aumentada	hsa-mir-196b hsa-mir-210 hsa-mir-184 hsa-mir-376a hsa-mir-506 hsa-mir-181b # hsa-mir-181d hsa-mir-192 hsa-mir-424 hsa-mir-503 # hsa-mir-125 hsa-mir-615	hsa-mir-339-5p hsa-mir-130b hsa-mir-483-5p # hsa-mir-06b hsa-mir-148b hsa-mir-93 hsa-mir-135a hsa-mir-320a hsa-mir-503 hsa-mir-450a hsa-mir-542-3p hsa-mir-143 hsa-mir-181b # hsa-mir-542-5p	hsa-mir-665 hsa-mir-1246 hsa-mir-483-5p # hsa-mir-642 hsa-mir-1308
miRNAs com expressão diminuída	hsa-mir-375 hsa-mir-222 # hsa-mir-214 hsa-mir-491 hsa-mir-511 hsa-mir-342 hsa-mir-30e-3p hsa-mir-365 hsa-mir-299-5p hsa-mir-485-5p	hsa-mir-335 hsa-mir-195 # hsa-mir-557 hsa-mir-708 hsa-mir-29c hsa-mir-617 hsa-mir-647 hsa-mir-7c hsa-mir-202	hsa-mir-1290 hsa-mir-600 hsa-mir-let-7a hsa-mir-195 # hsa-mir-126 hsa-mir-125 ^a -5p hsa-mir-26a hsa-mir-193b hsa-mir-let-7d hsa-mir-29a hsa-mir-125b hsa-mir-let-7f hsa-mir-34a hsa-mir-let-7g hsa-mir-26b hsa-mir-214 # hsa-mir-768-5p hsa-mir-768-3p

#: miRNAs diferencialmente expressos em mais de um estudo estão destacados em negrito.

2 OBJETIVOS

- 1- Induzir o silenciamento do gene *IGF1R* por siRNA na linhagem de tumor adrenocortical humano NCI H295R.
 - 2- Avaliar os efeitos *in vitro* do silenciamento gênico de IGF-1R por meio da análise de proliferação celular e apoptose desta linhagem celular.
 - 3- Avaliar a expressão de microRNAs relacionados a expressão de IGF-1R em tumores adrenocorticais humanos.
 - 4- Avaliar a imunorreatividade para IGF-1R em tumores adrenocorticais humanos.
-

3 MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo nº 0799/10). Após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido por escrito de todos os pacientes ou responsáveis, amostras de tecido tumoral dos pacientes foram coletadas. Todos os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular - LIM 42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2 Linhagem de células de tumor adrenocortical humano

A linhagem celular NCI H295R foi previamente estabelecida a partir de um carcinoma adrenocortical invasivo não funcionante diagnosticado em uma paciente de 48 anos e gentilmente cedida pelo Prof. Walter Miller (Universidade da Califórnia, São Francisco, EUA) (102). Esta linhagem celular foi incubada a 37°C em ambiente umidificado com 5% de CO₂ e mantida em meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco), suplementado com 2% de soro fetal bovino, antibióticos (ampicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL) e insulina, transferrina e selênio (*Invitrogen*).

3.3 Pacientes

Uma série composta de 202 tumores adrenocorticais não relacionados de ambos os sexos foi selecionada no período de 1979 a 2012: 45 tumores adrenocorticais pediátricos (37 clinicamente benignos e 8 clinicamente malignos) e 157 tumores adrenocorticais de adultos (76 adenomas e 81 carcinomas) (Tabela 2) (Anexo A). Todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e tratamento cirúrgico. O diagnóstico de tumor adrenocortical foi confirmado por estudo anátomo-patológico e classificado segundo os critérios histológicos de Weiss (9). Os pacientes foram avaliados a partir do estadiamento proposto por Macfarlane (11) e modificado por Sullivan (12). O diagnóstico de malignidade dos tumores do córtex adrenal foi estabelecido pelas seguintes características: escore de Weiss ≥ 3 e estadiamento III ou IV. Como os critérios histológicos de Weiss não são preditivos de malignidade em crianças com tumores adrenocorticais, o diagnóstico de carcinoma adrenocortical neste grupo foi definido pelo estadiamento tumoral (III ou IV) ou evolução desfavorável.

Os tecidos tumorais foram obtidos durante procedimento cirúrgico habitual e armazenados em nitrogênio líquido até a realização da extração de RNA.

Tabela 2 - Características clínicas de 202 pacientes com tumores adrenocorticais.

	Crianças		Adultos	
	CB (n=37)	CM (n=8)	Adenomas (n=76)	Carcinomas (n=81)
Idade (anos) ^(A)	2,6 ± 0,4	3,6 ± 0,7	44 ± 1,9	40 ± 1,8
Sexo (F:M)	1,8 : 1	1,5 : 1	6,8 : 1	3,6 : 1
Seguimento (meses) ^(A)	127 ± 14	58 ± 22	77 ± 7	54 ± 7
Síndrome clínica <i>n</i>				
Cushing	1	0	47	17
Virilizante	26	2	3	9
Mista	10	6	0	33
Não funcionante	0	0	22	15
Outras	0	0	0	2
Não disponível	0	0	4	5

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

Para o estudo de expressão de microRNAs foram selecionados apenas 32 pacientes deste mesmo grupo: 19 tumores do córtex da glândula suprarrenal pediátricos e 13 tumores de pacientes adultos (Tabela 3) (Anexo B).

Tabela 3 – Características clínicas e moleculares de 32 pacientes com tumor adrenocortical selecionados para o estudo de expressão de microRNAs

	Crianças		Adultos	
	Clinicamente benigno (n = 13)	Clinicamente maligno (n = 6)	Adenomas (n = 6)	Carcinomas (n = 7)
Sexo (F : M)	3,3 : 1	1 : 1	6 : 0	1,3 : 1
Síndrome Clínica (n)				
Cushing	1	0	6	1
Virilização	8	4	0	0
Mista	4	1	0	3
Não Funcionante	0	0	0	3
Feminilizante	0	1	0	0
Expressão <i>IGF1R</i>				
Normal	4	1	4	5
Aumentada	9	5	2	2
P53 p.R337H				
Ausente	4	2	6	5
Presente	9	4	0	2

F: sexo feminino, M: sexo masculino

3.4 Silenciamento gênico de *IGF1R* por siRNA

Ensaio de siRNAs previamente desenhados e validados específicos para *IGF1R* foram adquiridos (*Silencer[®] Pre-Designed & Validated siRNAs*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Dois ensaios específicos para *IGF1R* foram selecionados: siRNA # 1 e siRNA # 2 (Tabela 4), além de um siRNA não relacionado ao gene alvo que serviu como controle negativo .

Tabela 4- siRNAs selecionados para o silenciamento de *IGF1R*

	ID	Exon alvo	Sequência
siRNA # 1	s7211	18	5' GCAUGGUAGCCGAAGAUUUtt 3'
siRNA # 2	74	2	5' GGAUUGAGAAAAAUGCUGAtt 3'

As células NCI H295R foram cultivadas em placas de 6 poços em uma densidade de 200.000 células/poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com siRNA # 1, siRNA # 2 e controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e de acordo com as seguintes condições: (1) células não tratadas com siRNA, (2) células tratadas com siRNA # 1, (3) células tratadas com siRNA # 2 e (4) células tratadas com o siRNA controle negativo.

A transfecção das células NCI H295R foi realizada com LipofectaminaTM 2000 (*Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*) e siRNAs (40 nM em cada poço) conforme descrito pelo fabricante. Com o intuito de verificar se houve um silenciamento efetivo de IGF-1R, 48 horas após a transfecção, RNA e proteínas foram extraídas para avaliação de expressão.

3.5 Extração de RNA e transcrição reversa

A extração do RNA total das células foi realizada com o *RNeasy plus Mini Kit* (*Qiagen, Hilden, Germany*) de acordo com protocolo sugerido pelo

fabricante. A integridade do RNA mensageiro extraído foi testada em gel de agarose 1% após eletroforese para avaliação das bandas de RNA ribossômico. As concentrações das amostras de RNA total foram avaliadas pela leitura em espectrofotômetro.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por transcrição reversa utilizando-se o produto comercial *High Capacity* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). RNA total da cultura celular foi reversamente transcrito e a ausência de DNA genômico demonstrada pela não amplificação do mesmo em cada reação.

3.6 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real

A quantificação da expressão gênica de *IGF1R* foi realizada por meio de um sistema de detecção de sequências *ABI Prism 7000* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando-se um ensaio 5'nuclease do sistema *Taqman* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O ensaio *Taqman* para *IGF1R* (Hs00609566_m1*) e endógeno (β -actin, 43263) continham oligonucleotídeos iniciadores exônicos e sondas específicas inter-exônicas para o fragmento amplificado, que garantiram a não amplificação do DNA genômico.

As sondas dos genes alvos foram marcadas com a fluorescência FAM, enquanto a sonda de β -actina foi marcada com VIC. Estas ondas incitam comprimentos de ondas distintos, que emitem sinais captados pelo

aparelho. Ao final da PCR em tempo real, os resultados foram arquivados em um *software* do SDS 7000 para posterior análise. O ciclo em que cada curva de amplificação ultrapassa o limiar de detecção da fluorescência (C_T) foi utilizado para comparação entre as amostras. A amplificação do gene alvo foi normalizada com o controle endógeno, obtendo-se um valor de expressão do alvo em relação ao total de RNA utilizado na reação. O cálculo da quantificação, de forma a permitir uma comparação expressa em número de vezes, foi realizado utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ conforme descrito por Livak (103), no qual ΔC_T foi a diferença de expressão entre o gene alvo e o endógeno de uma determinada amostra (células adrenocorticais ou calibrador) e o $\Delta\Delta C_T$ correspondeu a diferença entre o ΔC_T de uma amostra tumoral e o ΔC_T do calibrador. O resultado da quantificação pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ consiste em uma ordem de grandeza, que representou a expressão do gene alvo nas células tumorais.

3.7 Avaliação da expressão proteica por Western Blot

Após tratamento das células NCI H295R com os devidos siRNAs, as células foram lisadas para extração de proteínas intracelulares. O extrato de proteínas obtidas de cada grupo foi submetido à SDS-PAGE e, na sequência, transferidos do gel para uma membrana de nitrocelulose. Posteriormente, a membrana, contendo as proteínas transferidas do gel, foi bloqueada com leite desnatado 10% por 1 hora e com BSA 3% por mais 1

hora para a redução de sinais inespecíficos. Após o bloqueio, a membrana foi incubada no período noturno com o 1º anticorpo específico para IGF-1R diluído em BSA 1% em concentração 1:200. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T e incubada por mais uma hora com o 2º anticorpo anti-IgG de coelho, associado à peroxidase na concentração de 1:5000 diluído em PBS-T. O resultado foi detectado pelo sistema de quimiluminescência ECLTM Western blotting e as imagens geradas, captadas pelo aparelho Storm860 e analisadas pelo programa ImageQuant 5.2.

3.8 Ensaios de proliferação celular e apoptose

A linhagem NCI H295R foi cultivada em placas de 96 poços em uma densidade de 5.000 células/poço. Após 24 horas, as células foram transfectadas com 1 µM de siRNA # 1, siRNA # 2 e siRNA controle negativo. As culturas celulares foram avaliadas quanto a proliferação celular em diferentes tempos: 24, 48 e 72 horas após a transfecção. 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 (amarelo) em formazan (azul), 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 de apoptose foi baseada na determinação da atividade das caspases 3 e 7 após o tratamento com siRNAs específicos para *IGF1R* (siRNA # 1 e siRNA # 2) e siRNA controle negativo. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, as células foram incubadas com o ensaio *Caspase-Glo® 3/7* (Promega, Madison, WI, USA), que 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 com 100 µl deste reagente. A intensidade do sinal luminescente mensurada em luminômetro foi proporcional à atividade das caspases 3 e 7.

3.9 Extração de RNA e transcrição reversa para avaliação da expressão de microRNAs

Os tecidos tumorais foram obtidos durante procedimento cirúrgico e armazenados em nitrogênio líquido. O RNA total das amostras foi extraído a partir dos tecidos congelados em nitrogênio líquido utilizando-se o método do Trizol Reagente (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A integridade do RNA extraído foi testada em gel de agarose e as concentrações das amostras de RNA total foram determinadas pela leitura em espectrofotômetro. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por

transcrição reversa com o produto comercial *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA).

3.10 Avaliação da expressão de microRNAs por PCR em tempo real

A quantificação da expressão de microRNAs relacionados ao gene *IGF1R* foi realizada no sistema de detecção de sequências *ABI Prism 7000* (Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA). Para esta análise foram selecionados os microRNAs alvo (Tabela 5) e microRNAs endógenos RNU44 (ID: 001094) e RNU 48 (ID: 001006).

As sondas dos microRNAs alvos foram marcadas com a fluorescência FAM bem como as sondas dos endógenos. A amplificação do gene alvo foi normalizada com os controles endógenos, obtendo-se um valor de expressão do alvo em relação ao total de RNA utilizado na reação. O cálculo da quantificação, de forma a permitir uma comparação expressa em número de vezes, foi realizado utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ conforme descrito por Livak (103), no qual ΔC_T foi a diferença de expressão entre o gene alvo e o endógeno de uma determinada amostra (células adrenocorticais ou calibrador) e o $\Delta\Delta C_T$ correspondeu a diferença entre o ΔC_T de uma amostra tumoral e o ΔC_T do calibrador. O resultado da quantificação pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ consiste em uma ordem de grandeza, que representou a expressão do gene alvo nas células tumorais.

Tabela 5 – MicroRNAs selecionados para avaliação de expressão por PCR em tempo real

MicroRNAs alvo	ID
miR-100	002142 – hsa-miR-100
miR-145	002278 – hsa-miR-145
miR-375	000564 – hsa-miR-375
miR-126	002228 – hsa-miR-126-3p

3.11 Micromatriz tecidual (TMA) e imunohistoquímica

Cortes histológicos representativos dos casos, corados pela hematoxilina e eosina foram revisados e as áreas de interesse foram selecionadas nas lâminas. As mesmas áreas foram marcadas nos respectivos blocos de parafina doadores dos tecidos. Cilindros de 1,0 mm de diâmetro das áreas marcadas nos blocos de parafina doadores foram transportados para um bloco de parafina receptor por meio de um sistema mecanizado de precisão (*Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, EUA*), 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 13 linhas e 16 colunas (Figura 5) (Anexo C). No total, o TMA construído contém 208 posições (205 amostras de 202 casos, com 1 amostra por caso, tendo 3 pacientes amostras em duplicata e 1 paciente com perda de representatividade por tratar-se de tecido hepático). Duas

amostras de tecido renal normal foram usadas para determinar o posicionamento do TMA. O bloco de TMA foi então cortado em secções histológicas numeradas e consecutivas de 3 μ m (*Leica Instruments, Singapore*). Outros dois blocos de TMA semelhantes foram feitos para obter-se uma triplicata.

Figura 5 - Representação de parte do TMA construído para estudo da proteína IGF-1R em tumores adrenocorticais.

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 de imunoperoxidase com recuperação antigênica pelo calor úmido ou digestão enzimática modificada foi utilizado no atual estudo (104). A técnica consiste em desparafinização e hidratação das lâminas contendo os cortes histológicos dos blocos de TMA. Recuperação antigênica com tampão citrato 10 mM pH 6,0 para o anticorpo anti-IGF1R (titulação 1:100; clone G11, Roche, Ventana) foi realizada em

panela a vapor por 40 min a cerca de 95 °C. Após lavagens em PBS pH 7,4, seguiu-se etapa de bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 20V, 1:1 em solução de metanol, repetida 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, foi realizado bloqueio inespecífico de carga com CASBlock™ (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) 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. Em um conjunto extra de três lâminas foram omitidos os anticorpos primários, permanecendo as lâminas em incubação com PBS pH 7,4 com soroalbumina bovina 1% e Na₃N 0,1%, servindo como controles negativos. Após lavagens em PBS pH 7,4, foi realizada incubação com o sistema secundário Novolink (*Vision Biosystems™, Newcastle, GRB*) de tipo polímero curto acoplado a peroxidase por 30 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 minuto em temperatura ambiente, desidratação e montagem das lâminas com resina sintética Entellan (*Merck, Darmstadt, Alemanha*).

Em cada cilindro de amostras tumorais, o compartimento foi avaliado em duas categorias: 1) membrana e/ou citoplasma, 2) núcleo. A intensidade

da imunorreatividade foi avaliada como: ausente (0), fraca (1), moderada (2) ou intensa (3). O percentual de células tumorais positivas foi calculado para cada amostra tumoral e deste percentual estabeleceu-se o seguinte escore: negativo, escore (0); 1 a 25%, escore (1); 26 a 50%, escore (2); 51 a 75%, escore (3), 76 a 100%, escore (4). Este escore que representa o percentual de positividade foi somado ao escore intensidade de imunorreatividade: escore de 0 a 3 foi classificado como expressão fraca; escore > 3 foi classificado como expressão forte. 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.

3.12 Análise estatística

As análises estatísticas de silenciamento de *IGF1R* por siRNA, ensaios de proliferação e apoptose foram realizadas no programa SigmaStat 3.5 (*Systat Software*). As comparações entre os quatro grupos estudados foram analisadas pelo teste *one-way analysis of variance* (ANOVA). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

A análise estatística de expressão dos microRNAs e expressão proteica de IGF-1R foi realizada utilizando os programas SPSS (*PASW version 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL*) e GraphPad Prism (*GraphPad Software, Inc., version 6, La Jolla, CA*). Dados contínuos foram expressos

por valores de mediana (do mínimo ao máximo). Diferenças nos níveis de expressão entre dois grupos foram analisadas por meio do teste Mann-Whitney U de cauda dupla. O teste do χ^2 foi utilizado para investigação de variáveis dicotômicas. A sobrevida global foi definida como o tempo entre a data do diagnóstico primário e a data do óbito relacionado ao carcinoma adrenocortical ou última visita de seguimento. A sobrevida livre de doença foi definida como o tempo entre a data da ressecção tumoral completa e a data da primeira evidência radiológica de recorrência local ou à distância. Todas as curvas de sobrevida foram obtidas por estimativas de Kaplan-Meier. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da expressão gênica de *IGF1R* após o silenciamento

A eficiência do silenciamento de *IGF1R* exercida pelos siRNA # 1 (exon alvo: 18) e siRNA # 2 (exon alvo: 2) na linhagem de células de tumor adrenocortical NCI H295R foi avaliada por meio da técnica de PCR em tempo real. Após 48 horas de transfecção, os valores relativos de RNAm de *IGF1R* diminuíram em aproximadamente 50%. Nenhuma diferença de eficiência entre os siRNA específicos para *IGF1R* ($p < 0,001$) foi observada. Como esperado, o grupo de células que não recebeu tratamento e o grupo que foi transfectado com o controle negativo apresentaram perfil de expressão semelhante, com ausência de redução na expressão gênica de *IGF1R* ($p = ns$) (Figura 6). Os valores de RNAm da β -actina não foram afetados em nenhum dos quatro grupos avaliados.

Figura 6 – Perfil de expressão gênica de células de linhagem de tumor adrenocortical NCI H295R após 48 horas de transfecção com siRNAs controle negativo, siRNA # 1 e siRNA # 2. Entre o grupo de células não tratadas e tratadas com siRNA controle negativo não houve diferença significativa no padrão de expressão ($p = 0,856$). Os siRNA # 1 e siRNA # 2 apresentaram padrão de eficiência bem semelhante ($p = 0,983$). A comparação do grupo tratado com controle negativo com o grupo tratado com siRNA # 1 e siRNA # 2 observou-se uma diferença significativa entre os níveis de expressão gênica ($p < 0,001$ para ambos siRNAs). NT: células não tratadas, CN: células tratadas com siRNA controle negativo, 1: células tratadas com siRNA # 1, 2: células tratadas com siRNA # 2.

4.2 Avaliação da expressão proteica de IGF-1R após o silenciamento

As análises de Western Blot do extrato celular proveniente de células tratadas com siRNA # 1 e siRNA # 2 revelaram uma redução de aproximadamente 30% da proteína de IGF-1R quando comparadas com o grupo controle ($p = 0,027$ e $p = 0,009$). De maneira semelhante ao observado em relação ao RNAm, o grupo de células que não recebeu tratamento e o grupo que foi transfectado com o controle negativo

apresentaram perfil de expressão semelhante, com ausência de redução na expressão proteica de IGF-1R ($p = 0,248$) (Figuras 7 e 8).

Figura 7 – Perfil de expressão proteica de células de linhagem de tumor adrenocortical NCI H295R após 48 horas de transfecção com siRNAs controle negativo, siRNA # 1 e siRNA # 2. Não se observou diferença significativa no padrão de expressão entre o grupo de células não tratadas e tratadas com siRNA controle negativo ($p = 0,248$). Também não houve diferença entre os grupos siRNA # 1 e siRNA # 2 ($p = 0,837$). A comparação do grupo tratado com controle negativo com o grupo tratado com siRNA # 1 e siRNA # 2 observou-se uma diferença significativa entre os níveis de expressão proteica ($p = 0,027$ e $p = 0,009$, respectivamente). NT: células não tratadas, CN: células tratadas com siRNA controle negativo, 1: células tratadas com siRNA # 1, 2: células tratadas com siRNA # 2.

Figura 8 – Perfil de expressão proteica de células de linhagem de tumor adrenocortical NCI H295R após 48 horas de transfecção com siRNAs controle negativo, siRNA # 1 e siRNA # 2.

4.3 Efeito inibitório do silenciamento de IGF-1R na proliferação das células NCI H295R

As análises de crescimento celular demonstraram que as células transfectadas com siRNA # 1 e siRNA # 2 apresentaram um padrão de proliferação notavelmente menor quando comparado com as células não tratadas e tratadas com siRNA controle negativo. A inibição ocorreu de modo tempo dependente e a maior taxa foi de 40%, 72 horas após a transfecção ($p < 0,001$). Como esperado, não observou-se diferença entre os padrões de proliferação das células não tratadas e células transfectadas com siRNA controle negativo ($p = ns$) (Figura 9).

Figura 9 – Efeitos de siRNAs específicos para IGF-1R na proliferação celular da linhagem de tumor adrenocortical NCI H295R. As células foram avaliadas em diferentes tempos: 24, 48 e 72 horas. Após 72 horas de transfecção observou-se 40% de redução na taxa de proliferação celular ($p < 0,001$). NT: células não tratadas, CN: células tratadas com siRNA controle negativo, 1: células tratadas com siRNA # 1, 2: células tratadas com siRNA # 2.

4.4 Indução de apoptose pelo silenciamento de IGF-1R nas células NCI H295R

A atividade das caspases 3 e 7 nos quatro grupos estudados demonstrou que não houve diferença entre os padrões das células NCI H295R não tratadas e células transfectadas com siRNA controle negativo para os três tempos avaliados (24, 48 e 72 horas) ($p = ns$). Interessantemente, não observou-se o aumento de apoptose das células transfectadas com siRNA # 1 quando comparado com os dois grupos controles (células não tratadas e tratadas com controle negativo) em 24, 48 e 72 horas ($p = ns$). A transfecção do siRNA # 2 mostrou-se mais eficiente e a partir de 48 horas ocorreram maiores taxas de apoptose quando comparado aos controles: em 48 horas ocorreu um aumento de 23% ($p = 0,052$) e em 72 horas um aumento de aproximadamente 50% ($p = 0,001$) (Figura 10).

Figura 10 – Efeitos de siRNAs específicos para IGF-1R nas taxas de apoptose da linhagem de tumor adrenocortical NCI H295R. As células foram avaliadas em diferentes tempos: 24, 48 e 72 horas. Após 72 horas de transfecção observou-se 45% de redução na taxa de apoptose. NT: células não tratadas, CN: células tratadas com siRNA controle negativo, 1: células tratadas com siRNA # 1, 2: células tratadas com siRNA # 2.

4.5 Avaliação da expressão de microRNAs relacionados a *IGF1R*

A análise de expressão de microRNAs relacionados a *IGF1R* pela metodologia de PCR em tempo real realizada em 32 tecidos de tumor adrenocortical revelou que miR-100 [média 0,3 (de 0,07 a 1,97)] e miR-375 [média 0,05 (de 0,01 a 0,27)] estavam hipoexpressos em tumores adrenocorticais. Essa redução foi observada em tumores benignos bem como em tumores malignos e não foi associada com a hiperexpressão de *IGF1R* ($p = 0,61$ e $p = 0,49$, respectivamente). miR-145 [média 2,2 (de 0,01 a 12,6)] apresentou expressão variável nos tumores adrenocorticais, no entanto, esses valores não se correlacionaram com a expressão de *IGF1R*

em adenomas e carcinomas adrenocorticais ($p = 0,19$). A expressão de miR-126 [média 596,6 (de 30,8 a 2667,4)] estava aumentada em tumores adrenocorticais benignos e malignos e não estava relacionado com a expressão de *IGF1R* ($p = 0,81$) (Figura 11).

Figura 11 – Expressão dos microRNAs 100, 375, 145 e 126 em trinta e duas amostras de tumor adrenocortical com expressão normal ou aumentada de *IGF1R*. Não se observou diferença de expressão de todos os microRNAs entre o grupo de expressão de *IGF1R* normal e aumentada ($p = ns$).

4.6 Avaliação de expressão proteica de IGF-1R

A análise de expressão proteica do IGF-1R foi realizada em 202 tumores adrenocorticais. No grupo de adultos, foram avaliados 157 tumores adrenocorticais. Dentre estas amostras, 134 (85%) apresentaram expressão

fraca para o IGF-1R e 23 (15%) apresentaram expressão forte para IGF-1R. A expressão proteica forte foi mais frequente em carcinomas (20%, 16 de 81) que em adenomas (9%, 7 de 76; $p= 0,06$, $X^2= 3,49$). A avaliação do compartimento revelou que a proteína IGF-1R estava localizado no citoplasma e/ou membrana em 88% (138 de 157) das amostras e em 12% (19 de 157) no núcleo. A imunolocalização do IGF-1R nos carcinomas (19%, 15 de 81) foi mais frequentemente nuclear em relação aos adenomas de adultos (5%, 4 de 76; $p= 0,01$, $X^2= 6,4$) (Tabela 6) (Figura 12).

A análise de sobrevida dos pacientes adultos com carcinoma adrenocortical revelou que a expressão proteica do IGF-1R não se correlacionou com sobrevida global ($n= 81$; $p = 0,385$) (Figura 13) e nem com sobrevida livre de doença ($n= 64$; $p= 0,37$; 17 pacientes foram excluídos desta análise por apresentarem metástase ao diagnóstico) (Figura 14).

Figura 12 – A: Tumor adrenocortical diagnosticado em uma paciente adulta com imunoreatividade negativa para IGF-1R (aumento 20X) **B:** Tumor adrenocortical diagnosticado em uma paciente adulta com imunoreatividade forte para IGF-1R nuclear (aumento 20X).

Tabela 6 – Expressão e localização de IGF-1R em amostras de tumor adrenocortical.

	Crianças (n= 42)		Adultos (n=157)	
	CB (n= 34)	CM (n= 8)	Adenomas (n=76)	Carcinomas (n=81)
Expressão forte	2	1	7	16
Expressão fraca	32	7	69	65
Citoplasma e/ou membrana	32	8	72	66
Núcleo	2	0	4	15

CB, clinicamente benigno; CM, clinicamente maligno

Figura 13 – Curva de sobrevida global de pacientes adultos portadores de carcinoma adrenocortical de acordo com a expressão proteica do IGF-1R. Esta análise revelou que a expressão do IGF-1R não se correlacionou com sobrevida global ($p = 0,385$).

Figura 14 – Curva de sobrevida livre de doença em pacientes adultos portadores de carcinoma adrenocortical de acordo com a expressão proteica do IGF-1R. Esta análise revelou que a expressão do IGF-1R não se correlacionou com sobrevida livre de doença ($p = 0,37$).

No grupo de crianças ($n = 42$; 3 crianças que não tinham dados evolutivos superiores a 12 meses foram excluídas), 39 (93%) tumores adrenocorticais apresentaram expressão fraca para o IGF-1R e 3 (7%) tumores apresentaram expressão forte. Não se observou diferença da expressão proteica entre os tumores clinicamente benignos e malignos neste grupo ($p = 0,5$). A avaliação da expressão por compartimento revelou que 40 (95%) amostras tiveram marcação no citoplasma e/ou membrana e somente 2 (5%) tumores tiveram marcação no núcleo (Tabela 6). A comparação de localização de IGF-1R entre tumores clinicamente benignos e malignos não demonstrou diferença ($p = 0,48$). Além disso, a expressão do IGF-1R não se correlacionou com sobrevida global ($p = 0,45$) e sobrevida livre de doença ($p = 0,47$) no grupo pediátrico.

5 DISCUSSÃO

A sinalização promovida pelo sistema IGF, amplamente conhecida pelo delicado ajuste de diversos processos biológicos tem sido muito estudada em diversos tipos de tumores. Os receptores de IGF se tornaram um alvo anticâncer atrativo em função de sua hiperexpressão em uma variedade de processos neoplásicos malignos (39).

IGF-1R possui papel central na proliferação celular normal bem como nos processos de transformação. Evidências sugerem que a sinalização aumentada do sistema IGF-1/IGF-1R represente fator chave para as vias proliferativas e oncogênicas (105). Expressão aumentada de IGF-1 está associada aos estágios iniciais da carcinogênese que é caracterizada por altas taxas de divisão celular e acúmulo de danos genéticos (106).

Em 2008, Almeida *et al.* (63) publicaram trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa em 57 tumores adrenocorticais (37 adenomas e 20 carcinomas) diagnosticados em crianças e adultos. Hiperexpressão de *IGF1R* foi identificada em 69% e 20% dos tumores adrenocorticais pediátricos e de adultos, respectivamente, por meio da técnica de PCR em tempo real (63). A expressão do gene *IGF1R* foi significativamente mais elevada nos carcinomas adrenocorticais pediátricos e constituiu um marcador prognóstico independente para o desenvolvimento de metástases neste grupo (63). Além disso, *IGF2* estava hiperexpresso em adenomas e carcinomas pediátricos. No grupo de adultos, *IGF2* teve expressão aumentada nos carcinomas adrenocorticais (63), confirmando estudos prévios.

Os dados do aumento de expressão de *IGF1R* em tumores adrenocorticais foram responsáveis por investigarmos potenciais mecanismos envolvidos neste evento como amplificação gênica e a presença de variantes alélicas no gene *IGF1R* (107). Na análise de amplificação gênica avaliamos 64 pacientes com tumor adrenocortical (25 crianças e 39 adultos). Amplificação de *IGF1R* foi detectada em apenas um carcinoma adrenocortical diagnosticado em uma paciente adulta com síndrome de Cushing e virilização. Hiperexpressão de *IGF1R* foi demonstrada neste caso. Além disso, amplificação gênica de outros *loci* foi identificada neste tumor adrenocortical maligno. Destes 64 pacientes com tumores adrenocorticais, 32 (os mesmos pacientes em que avaliamos a expressão dos microRNAs 145, 100, 375 e 126) foram selecionados para o estudo da região codificadora de *IGF1R* que revelou apenas três polimorfismos (rs_3743262 , rs_2229765, rs_17847203) conhecidos e que não se correlacionaram com os dados de expressão de *IGF1R* (107). Nossos resultados sugerem que a combinação de amplificação gênica e hiperexpressão de *IGF1R* é um evento raro em tumores adrenocorticais. Além disso, polimorfismos na região codificadora de *IGF1R* não se correlacionaram com sua expressão (107).

No atual estudo, nós induzimos o silenciamento de IGF-1R em uma linhagem celular de tumor adrenocortical (NCI H295R). As análises da expressão gênica de *IGF1R* por PCR em tempo real demonstraram que as células tratadas com os siRNA # 1 e siRNA # 2 apresentaram uma

diminuição de aproximadamente 50% quando comparadas com os grupos controles (células não tratadas e células tratadas com siRNA controle negativo). Em relação à expressão proteica observou-se uma redução de 30% nas células transfectadas com siRNA # 1 e siRNA # 2. Como esperado, o tratamento das células NCI H295R com siRNA # 1 e siRNA # 2 promoveu uma diminuição de 40% na taxa de proliferação celular. Em relação às análises das atividades de caspases, um aumento de aproximadamente 50% nas taxas de apoptose das células tratadas com siRNA # 2 foi demonstrado. O siRNA # 1 não foi capaz de promover esse aumento.

Apesar de muitas evidências sugerirem que IGF-1R desempenha papel central na tumorigênese, poucos trabalhos indicam que IGF-1R pode ser utilizado como um alvo molecular em tumores adrenocorticais. Almeida *et al.* (63) demonstraram que o inibidor seletivo da atividade tirosina quinase, NVP-AEW541, apresentou efeitos antitumorigênicos em duas linhagens de células provenientes de tumores adrenocorticais. De modo semelhante, Shen *et al.* (79) demonstraram a importância do sistema IGF na linhagem celular de tumor adrenocortical SW-13. A administração de IGFs nesta linhagem aumentou significativamente a proliferação celular e este efeito se correlacionou positivamente com as concentrações de IGFs (79). Além disso, anticorpos para IGF-1R foram capazes de inibir a proliferação das células SW-13 (79). Em ensaios pré-clínicos, Barlaskar *et al.* (80) evidenciaram que a via de IGF pode ser antagonizada por dois agentes

farmacológicos (NVP-AEW541 e IMC-A12) resultando na inibição do crescimento de células de tumores adrenocorticais (80).

O silenciamento de *IGF1R* tem sido realizado em algumas neoplasias humanas (108-112). A transfecção de siRNA em células de câncer de cólon demonstrou redução de aproximadamente 95% na expressão gênica e proteica (108). Uma diminuição na taxa de crescimento destas células e uma maior sensibilidade a agentes quimioterápicos foram também observadas (108). Estudos em células de câncer de pulmão também evidenciaram a eficiência dos siRNAs com diminuição de quase 80% da expressão de *IGF1R*. Além disso, camundongos que foram submetidos a injeções intratumorais de siRNA específico para *IGF1R* tiveram tumores de pulmão menores que os animais controles (109). Ainda em linhagens celulares de câncer de pulmão, Cosaceanu *et al.* (110) realizaram estudo comparativo de três metodologias empregadas no silenciamento gênico e siRNA foi o mecanismo mais eficiente na indução de apoptose. Em linhagens de câncer de fígado tratadas com siRNAs, maiores taxas de apoptose e um aumento da sensibilidade ao quimioterápico adriamicina foram observadas (111). Análises realizadas em células de carcinoma endometrial demonstraram que o silenciamento de IGF-1R foi capaz de promover maiores taxas de apoptose, menor fosforilação das proteínas da cascata de IGF-1R e menor potencial tumorigênico *in vivo* (112). A diferença no padrão de silenciamento de IGF-1R observado por nosso grupo e os dados da literatura podem estar relacionados ao tipo de siRNA utilizado, metodologia e eficiência de transfecção e também o tipo de células

utilizadas. No entanto, observa-se que mesmo com padrões de silenciamento menores do que os apresentados na literatura, os efeitos finais do silenciamento do gene *IGF1R* foram semelhantes.

A expressão alterada de microRNAs tem sido relacionada a diversos tipos tumorais, podendo atuar como oncogenes ou genes supressores tumorais. Em humanos, 50% dos genes de microRNAs estão localizados em sítios genômicos associados ao câncer (113). Nosso trabalho demonstrou que a expressão dos microRNA 100 e microRNA 375 está diminuída nos tumores adrenocorticais benignos e malignos avaliados (107). Apesar de estarem hipoexpressos não encontramos relação entre este evento e o aumento de expressão de *IGF1R* nos tumores do córtex da glândula suprarrenal. O microRNA 145 também não se correlacionou com os valores de expressão de *IGF1R* aumentado ou diminuído. Nossos dados corroboram com os dados de Doghman *et al.* (77) que demonstraram que o microRNA 100 tem sua expressão diminuída em tumores adrenocorticais. Adicionalmente, este microRNA regula a expressão de *IGF1R* e a cascata de sinalização mTOR em células de tumores adrenocorticais por meio da modulação da expressão de proteínas chaves implicadas nestas vias (77). O microRNA 375 encontra-se com expressão diminuída também em cânceres gástricos e carcinomas hepatocelulares (114). Estudos em células de carcinoma de esôfago demonstraram que o microRNA 375 tem um poder de supressão tumoral via inibição de *IGF1R* (114). Os dados encontrados em nosso trabalho em comparação com este demonstram que possivelmente as células de tumor adrenocortical tenham um mecanismo diferente do

demonstrado em câncer esofágico. Shi *et al.* (115) demonstraram que a região 3' não traduzida (3'UTR) de IGF-1R e do substrato de receptor de insulina 1 (IRS-1) são alvos do miRNA 145. IRS-1 modificado (que não possuía a região 3'UTR) não teve sua expressão diminuída e foi capaz de restabelecer o crescimento de células de câncer de cólon. Adicionalmente, IGF-1R que também não possuía 3'UTR não teve sua expressão diminuída, mas não foi capaz de restabelecer a proliferação de células de câncer de cólon (116). miR-126 estava hiperexpresso em tumores adrenocorticais malignos e benignos. Esse microRNA suprime a migração endotelial alvejando uma série de genes em células de tumores que promovem a migração, por meio da ativação de IGF-1R, que é um promotor da migração endotelial, e da inibição do receptor MERTK, que é um supressor da migração endotelial (117).

A análise de imunohistoquímica de IGF-1R do atual estudo revelou que a hiperexpressão foi mais frequente em carcinomas que em adenomas adrenocorticais no grupo de adultos. Além disso, demonstramos que a imunolocalização do IGF-1R nos carcinomas foi mais frequentemente nuclear em relação aos adenomas de adultos. Sehat *et al.* (118) demonstraram que sumoilação é mediadora da translocação de IGF-1R para o núcleo e também de sua sinalização (118). A sumoilação é uma modificação pós-traducional que leva a alteração da função e/ou localização das proteínas alvo. Em geral, a via de sumoilação tem sido associada a eventos nucleares, como por exemplo, a regulação da transcrição (118). Aleksi *et al.* (119) descreveram grandes concentrações de IGF-1R nuclear

em células primárias de câncer renal e em lesões pré-invasivas de tecido mamário. No câncer renal a presença de IGF-1R nuclear foi associada a um diagnóstico desfavorável (119). Warsito *et al.* (120) demonstraram que IGF-1R nuclear se associa com o *enhancer* de fator linfóide (LEF1) no núcleo das células. A formação do complexo constituído por β -catenina/fator T/*enhancer* do fator linfóide (TCF/LEF) ativa a transcrição de genes alvo como axina 2 (121) e ciclina D1 (122) que são importantes na tumorigênese humana. LEF1 não é capaz de estimular a transcrição sozinho mas pode ser ativado em colaboração com outros fatores. IGF-1R se associa a LEF1 no núcleo das células promovendo um aumento na transcrição de genes *downstream* de TCF/LEF axina 2 e ciclina D1 (120).

Os dados obtidos reforçam a importância de IGF-1R nas vias tumorigênicas das neoplasias malignas do córtex da glândula suprarrenal. O silenciamento deste receptor foi capaz de inibir a expressão gênica e proteica bem como o crescimento tumoral *in vitro* por meio da redução das taxas de proliferação celular e aumento das taxas de apoptose em linhagem celular de carcinoma adrenocortical humano.

O silenciamento pode ser uma ferramenta útil no tratamento de tumores adrenocorticais pediátricos e de adultos com hiperexpressão gênica e proteica. Adicionalmente, a inibição deste receptor, pode reduzir a atuação de *IGF2* visto que uma menor quantidade de receptores tipo 1 estaria disponível para ligação e, conseqüentemente, deflagrar a sinalização de *IGF2* que é um importante fator na tumorigênese adrenocortical.

6 CONCLUSÕES

1 - siRNAs específicos inibiram parcialmente a expressão gênica (50%) e proteica (30%) de IGF-1R em uma linhagem celular de carcinoma adrenocortical (NCI H295R).

2 - O silenciamento de IGF-1R foi capaz de diminuir a proliferação celular (40%) e aumentar as taxas de apoptose (45%) nas células NCI H295R, demonstrando que esta pode ser uma ferramenta útil na inibição do crescimento das células de tumor adrenocortical.

3 - O silenciamento de *IGF1R* pode ser uma ferramenta útil em tumores adrenocorticais pediátricos e de adultos visto que é capaz de reduzir a expressão gênica e proteica deste receptor.

4 - A expressão dos microRNAs 100, 145, 375 e 126 não se correlacionou com os valores de RNAm de *IGF1R* em tumores adrenocorticais humanos.

4 - Hiperexpressão de IGF-1R foi mais frequente (20%) em carcinomas adrenocorticais de adultos.

5 - A imunolocalização do IGF-1R nos carcinomas adrenocorticais (19%) foi mais frequentemente nuclear em relação aos adenomas de adultos, sugerindo que IGF-1R é um marcador biológico desta neoplasia.

7 ANEXOS

Anexo A - Dados clínicos de 202 pacientes com tumor adrenocortical.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Weiss	Tamanho (cm)	Síndrome Hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)
1	49,0	F	Carcinoma	7	9,0	C	Sim	36,0	Sim	32,4
2	72,0	F	Adenoma	1	4,0	NF	Não	69,2		
3	32,0	F	Carcinoma	8	16,0	C/V	Sim	12,4	Sim	0,0
4	1,3	M	CB	2	5,0	V	Não	173,0	Não	
5	2,3	F	CB	5	3,8	V	Não	107,2	Não	
6	0,9	F	CB	3	6,0	C/V	Não	133,0	Não	
7	22,4	F	Carcinoma	6	11,0	NF	Não	29,8	Não	
8	67,6	F	Adenoma	0	3,4	C	Não	30,2		
9	58,8	F	Carcinoma	5	10,0	NF	Não	99,2	Não	
10	35,7	F	Carcinoma	N/D	N/D	C/V	Não	25,8	Sim	0,0
11	62,1	F	Carcinoma	5	8,0	NF	Sim	15,6	Sim	3,9
12	34,3	F	Adenoma	1	3,0	C	Não	18,6		
13	62,7	F	Adenoma	0	2,7	C	Não	52,2		
14	33,0	F	Carcinoma	8	22,5	C/V	Sim	4,1	Sim	0,0
15	66,5	M	Carcinoma	8	20,0	C	Sim	18,0	Sim	16,3
16	72,4	M	Adenoma	1	1,8	NF	Não	52,2		
17	36,5	M	Carcinoma	N/D	N/D	N/D	Não	146,7	Sim	2,0
18	57,4	F	Carcinoma	3	3,7	NF	Não	48,7	Não	
19	65,6	M	Carcinoma	6	13,5	C/V	Não	4,5	Sim	0,0
20	51,4	F	Carcinoma	8	23,0	V	Sim	22,0	Sim	12,0
21	29,0	M	Carcinoma	8	19,0	C	Sim	3,9	Sim	0,0

Anexos

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Weiss	Tamanho (cm)	Síndrome Hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)
22	2,1	F	CB	1	4,0	V	Não	92,0	Não	
23	34,6	M	Adenoma	0	4,4	NF	Não	1,3		
24	23,3	M	Carcinoma	3	10,0	N/D	Não	49,9	Não	
25	2,2	M	CB	6	4,5	V	Não	17,4	Não	
26	36,1	M	Carcinoma	8	11,0	NF	Não	60,0	Sim	20,4
27	57,5	F	Adenoma	0	5,5	V	Não	98,4		
28	36,0	F	Adenoma	1	6,0	C	Não	147,0		
29	15,0	F	Adenoma	1	2,0	C	Não	246,7		
30	63,0	F	Adenoma	2	5,0	NF	Não	164,0		
31	18,0	F	Adenoma	2	3,2	C	Não	153,0		
32	2,2	M	CB	4	6,5	V	Não	188,0	Não	
33	59,0	F	Adenoma	2	3,5	C	Não	154,3		
34	37,0	F	Adenoma	0	3,5	NF	Não	135,0		
35	51,0	F	Carcinoma	6	6,5	ND	Sim	30,0	Sim	24,0
36	74,7	F	Adenoma	0	N/D	NF	Não	36,4		
37	2,5	F	CB	6	8,0	C/V	Não	1,0	Não	
38	4,5	F	CM	5	6,5	C/V	Sim	25,0	Sim	11,0
39	29,7	F	Carcinoma	3	8,0	C	Sim	8,8	Sim	6,7
40	52,0	F	Carcinoma	7	12,5	N/D	Sim	15,0	Sim	3,9
41	2,1	F	CB	1	3,0	V	Não	181,9	Não	
42	2,1	M	CB	5	6,0	V	Não	107,0	Não	
43	23,4	F	Carcinoma	6	11,0	C/V	Não	16,3	Sim	7,9
44	1,7	M	CB	4	6,0	V	Não	94,0	Não	

Anexos

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Weiss	Tamanho (cm)	Síndrome Hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)
45	23,0	F	Carcinoma	7	6,2	C/V	Não	168,8	Não	
46	51,0	F	Adenoma	0	4,2	NF	Não	83,0		
47	27,0	F	Adenoma	2	2,5	C	Não	91,0		
48	40,5	F	Carcinoma	3	3,0	C	Não	51,0	Não	
49	51,6	F	Adenoma	0	2,3	C	Não	24,0		
50	29,0	F	Carcinoma	3	20,0	V	Não	61,0	Não	
51	46,0	F	Adenoma	0	5,0	NF	Não	86,7		
52	31,0	F	Carcinoma	7	12,0	C/V	Sim	16,0	Sim	5,0
53	17,0	M	Carcinoma	7	9,0	C/V/E	Não	60,0	Não	
54	72,0	F	Carcinoma	7	21,0	NF	Sim	31,0	Sim	14,0
55	34,0	F	Adenoma	0	2,5	N/D	Não	0,0		
56	67,5	F	Adenoma	0	6,0	C	Não	112,2		
57	0,8	F	CB	6	3,5	C/V	Não	292,7	Não	
58	1,3	M	CB	7	5,0	C/V	Não	171,3	Não	
59	13,0	F	CB	1	4,5	V	Não	0,0	Não	
60	15,0	F	Carcinoma	8	20,0	C/V	Sim	22,0	Sim	0,0
61	35,0	F	Carcinoma	8	21,0	C/V	Sim	1,7	Sim	0,0
62	35,0	F	Carcinoma	3	2,2	C/V	Não	133,2	Não	
63	29,0	F	Adenoma	2	5,0	C	Não	187,0		
64	30,0	M	Carcinoma	6	11,0	NF	Sim	12,0	Sim	4,0
65	55,5	F	Carcinoma	8	10,5	C/V	Sim	35,1	Sim	8,0
66	21,8	F	Adenoma	0	3,2	C	Não	28,5		
67	40,2	F	Adenoma	2	3,9	C	Não	5,5		

Anexos

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Weiss	Tamanho (cm)	Síndrome Hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)
68	3,0	M	CB	4	3,5	C/V	Não	89,3	Não	
69	2,6	M	CM	7	6,0	V	Sim	12,0	Sim	5,0
70	69,8	M	Adenoma	1	6,0	C	Não	71,0		
71	38,0	F	Adenoma	2	9,5	C	Não	229,1		
72	54,1	M	Carcinoma	3	8,5	C	Não	12,2	Não	
73	66,4	F	Adenoma	1	4,0	NF	Não	0,0		
74	28,3	F	Adenoma	0	4,5	C	Não	49,2		
75	22,0	F	Adenoma	2	4,0	C	Não	180,0		
76	50,0	F	Adenoma	4	4,5	V	Não	152,1		
77	37,0	F	Adenoma	1	10,0	C	Não	54,0		
78	19,0	F	Carcinoma	6	11,0	C	Não	102,0	Não	
79	68,4	F	Adenoma	1	2,9	C	Não	95,3		
80	22,6	F	Carcinoma	6	13,0	NF	Não	55,1	Não	
81	47,0	F	Adenoma	0	7,0	C	Não	98,2		
82	45,0	F	Carcinoma	8	10,0	C/V	Não	152,0	Não	
83	30,4	F	Carcinoma	8	15,0	V	Não	14,1	Não	
84	23,1	F	Carcinoma	5	6,0	C/V	Não	52,7	Sim	7,0
85	19,0	F	Carcinoma	4	2,5	C	Não	125,5	Não	
86	2,6	F	CB	4	2,5	V	Não	128,6	Não	
87	17,7	F	Carcinoma	8	10,0	C/V	Sim	8,0	Sim	0,0
88	64,0	F	Carcinoma	4	9,0	NF	Sim	53,0	Sim	0,0
89	46,0	M	Carcinoma	6	20,0	NF	Não	123,0	Não	
90	38,0	F	Carcinoma	7	15,0	C/V	Sim	26,0	Sim	20,0

Anexos

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Weiss	Tamanho (cm)	Síndrome Hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)
91	54,1	M	Adenoma	0	4,0	C	Não	89,5		
92	49,2	M	Adenoma	0	5,0	C	Não	54,0		
93	1,7	M	CB	6	3,0	V	Não	123,0	Não	
94	64,3	M	Adenoma	0	3,8	C	Não	31,7		
95	1,1	M	CB	5	5,0	V	Não	219,0	Não	
96	53,4	M	Adenoma	0	1,0	NF	Não	22,0		
97	54,0	M	Adenoma	1	3,0	NF	Não	43,0		
98	42,0	M	Carcinoma	5	21,0	NF	Não	21,0	Sim	11,0
99	40,0	F	Adenoma	0	5,5	NF	Não	211,8		
100	35,0	F	Adenoma	1	3,5	C	Não	121,0		
101	23,9	F	Adenoma	2	4,0	C	Não	41,0		
102	2,5	F	CB	6	6,5	V	Não	124,7	Não	
103	3,3	F	CM	5	6,0	C/V	Não	21,3	Sim	6,1
104	49,0	F	Carcinoma	4	15,5	C/V	Não	179,2	Não	
105	0,9	F	CM	4	8,5	V	Não	78,0	Sim	4,0
106	18,0	F	Carcinoma	8	13,0	C/V	Sim	19,0	Sim	8,0
107	23,0	F	Carcinoma	6	14,0	C/V	Sim	17,0	Sim	0,0
108	65,3	F	Carcinoma	4	7,0	C	Não	27,6	Não	
109	28,0	F	Adenoma	2	2,5	NF	Não	86,0		
110	1,6	F	CB	3	4,0	V	Não	44,0	Não	
111	22,0	F	Carcinoma	9	21,0	C/V	Sim	60,0	Sim	48,0
112	27,0	F	Adenoma	1	4,0	C	Não	128,0		
113	42,8	F	Carcinoma	3	4,0	C/V	Não	17,9	Não	

Anexos

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Weiss	Tamanho (cm)	Síndrome Hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)
114	29,0	F	Carcinoma	6	12,0	C/V	Sim	31,0	Sim	0,0
115	41,0	F	Adenoma	0	1,8	C	Não	79,0		
116	53,0	F	Adenoma	2	4,0	C	Não	95,0		
117	3,0	F	CB	6	5,0	C/V	Não	301,0	Não	
118	1,2	F	CB	5	3,7	C/V	Não	30,0	Não	
119	67,8	F	Adenoma	0	3,0	NF	Não	15,7		
120	66,2	F	Carcinoma	4	15,0	NF	Não	9,4	Não	
121	64,0	F	Adenoma	0	3,5	NF	Não	46,0		
122	64,0	F	Adenoma	1	3,2	NF	Não	48,0		
123	70,1	F	Adenoma	0	N/D	C	Não	5,3		
124	24,0	F	Adenoma	1	3,8	C	Não	34,0		
125	33,0	F	Carcinoma	3	10,5	C/V	Não	27,0	Não	
126	31,6	F	Adenoma	2	5,5	N/D	Não	0,0		
127	21,3	F	Carcinoma	4	3,5	C/V	Não	106,1	Não	
128	69,1	F	Carcinoma	3	4,5	C	Não	8,2	Não	
129	49,6	F	Adenoma	0	2,3	C	Não	4,4		
130	27,0	F	Adenoma	0	3,7	C	Não	1,0		
131	37,0	F	Adenoma	1	4,5	C	Não	127,0		
132	56,4	F	Adenoma	0	4,1	NF	Não	123,8		
133	2,7	F	CB	3	1,8	V	Não	15,7	Não	
134	37,8	F	Adenoma	0	3,5	C	Não	89,8		
135	37,7	F	Carcinoma	5	6,0	C/V	Sim	34,0	Sim	6,6
136	58,7	F	Carcinoma	4	12,0	V	Não	97,3	Não	

Anexos

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Weiss	Tamanho (cm)	Síndrome Hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)
137	39,0	F	Adenoma	1	2,5	C	Não	93,0		
138	55,7	F	Carcinoma	4	10,0	C	Não	17,8	Não	
139	50,0	F	Carcinoma	4	6,5	V	Não	58,0	Não	
140	15,0	F	Adenoma	1	7,0	C	Não	24,0		
141	51,2	F	Adenoma	1	5,0	V	Não	73,4		
142	25,2	F	Adenoma	2	3,0	C	Não	12,0		
143	56,8	M	Carcinoma	4	14,0	C/V	Sim	0,6	Sim	0,0
144	39,9	F	Adenoma	0	3,0	C	Não	54,7		
145	26,5	F	Carcinoma	7	16,3	C/V	Sim	7,4	Sim	0,0
146	1,0	F	CB	6	21,0	V	Não	36,0	Não	
147	1,0	F	CB	5	9,0	C/V	Não	217,0	Não	
148	58,8	F	Adenoma	0	5,5	NF	Não	6,8		
149	66,0	F	Carcinoma	4	6,0	NF	Não	87,0	Não	
150	9,0	M	CB	2	4,5	C	Não	117,2	Não	
151	0,5	F	CB	6	4,0	V	Não	274,1	Não	
152	6,0	F	CB	2	5,0	V	Não	129,0	Não	
153	2,0	F	CM	8	7,0	C/V	Sim	27,0	Sim	14,0
154	36,0	F	Adenoma	0	3,5	C	Não	45,2		
155	3,0	F	CB	N/D	6,0	V	Não	129,0	Não	
156	3,1	F	CM	7	13,5	C/V	Sim	20,0	Sim	12,0
157	45,0	F	Carcinoma	6	18,0	C/V	Não	314,0	Sim	0,0
158	40,0	F	Carcinoma	4	11,0	C/V	Não	376,2	Não	
159	47,0	F	Adenoma	1	2,5	C	Não	302,7		

Anexos

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Weiss	Tamanho (cm)	Síndrome Hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)
160	42,0	M	Carcinoma	5	17,5	NF	Sim	4,2	Sim	3,0
161	2,5	M	CM	7	12,0	C/V	Sim	4,4	Sim	0,0
162	2,0	M	CB	5	1,5	V	Não	200,0	Não	
163	37,4	F	Carcinoma	4	6,0	V	Não	27,0	Não	
164	6,0	F	CB	5	7,5	V	Não	217,0	Não	
165	48,8	M	Adenoma	0	2,6	NF	Não	57,0		
166	54,0	F	Adenoma	1	3,0	NF	Não	68,0		
167	2,6	M	CM	5	2,5	V	Não	201,0	Sim	53,0
168	4,9	M	CM	7	8,5	V	Não	173,1	Sim	25,0
169	25,0	M	Adenoma	2	4,0	C	Não	1,0		
170	44,7	M	Carcinoma	7	8,2	NF	Não	73,4	Sim	33,3
171	21,0	F	Adenoma	2	3,0	C	Não	99,0		
172	21,0	F	Adenoma	0	3,0	C	Não	23,0		
173	17,0	F	Carcinoma	4	15,0	V	Não	125,0	Não	
174	1,0	F	CB	6	6,5	C/V	Não	30,4	Não	
175	2,8	F	CB	3	5,0	V	Não	182,0	Não	
176	2,2	F	CB	2	7,0	V/C	Não	48,0	Não	
177	28,0	F	Carcinoma	3	6,5	V	Não	130,0	Não	
178	53,5	M	Carcinoma	9	17,0	C	Sim	10,4	Sim	9,4
179	53,9	M	Carcinoma	3	3,0	C	Não	32,2	Não	
180	27,6	F	Carcinoma	8	13,0	C/V	Sim	10,1	Sim	0,0
181	36,5	F	Carcinoma	N/D	12,0	C/V	Sim	12,4	Sim	5,0
182	40,0	F	Carcinoma	7	17,0	C/V	Sim	38,0	Sim	6,0

Anexos

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Weiss	Tamanho (cm)	Síndrome Hormonal	Óbito	Tempo de seguimento (meses)	Recorrência	Tempo de recidiva (meses)
183	30,0	F	Adenoma	3	3,0	C	Não	25,0		
184	37,4	F	Carcinoma	N/D	12,0	N/D	Não	91,1	Não	
185	37,0	F	Adenoma	2	3,0	C	Não	49,0		
186	35,0	F	Carcinoma	6	10,0	C/V	Sim	21,0	Sim	14,0
187	30,9	F	Adenoma	1	3,0	C	Não	10,1		
188	24,0	F	Adenoma	2	3,0	C	Não	195,9		
189	60,4	F	Adenoma	0	3,0	C	Não	97,7		
190	81,0	F	Carcinoma	4	14,0	C/V	Não	19,6	Sim	19,6
191	39,0	F	Adenoma	1	3,5	C	Não	157,0		
192	42,0	F	Adenoma	2	6,0	NF	Não	73,0		
193	44,0	F	Carcinoma	8	18,0	V	Sim	46,0	Sim	0,0
194	51,2	M	Carcinoma	3	6,0	HAP	Não	32,4	Não	
195	36,0	F	Carcinoma	3	8,0	C	Não	104,0	Não	
196	77,0	F	Adenoma	2	1,5	NF	Não	90,0		
197	1,4	M	CB	4	5,5	V	Não	218,9	Não	
198	2,5	F	CB	1	4,5	V	Não	106,0	Não	
199	9,4	F	CM	7	9,0	C/V	Sim	18,0	Sim	0,0
200	21,5	F	Adenoma	0	1,2	N/D	Não	24,9		
201	2,3	M	CB	5	3,5	V	Não	49,9	Não	
202	43,2	F	Adenoma	0	3,8	N/D	Não	24,6		

M:masculino, F: feminino, CB: clinicamente benigno, CM: clinicamente maligno, C/V: Cushing e virilizante, C: Cushing, V: virilizante, NF: não funcionante, HAP: hiperaldosteronismo primário N/D = não disponível

Anexo B – Dados clínicos e moleculares de 32 pacientes com tumor adrenocortical selecionados para estudo de expressão de microRNAs.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Síndrome Hormonal	Diagnóstico	Weiss	P53 (p.R337H)	RNAM IGF1R
1	1	F	C/V	CB	3	presente	1,69
2	29	M	C	Carcinoma	8	ausente	1,06
3	2,1	F	V	CB	1	presente	5,27
4	2,2	M	V	CB	4	presente	1,63
5	27	F	C	Adenoma	1	ausente	0,61
6	29	F	C/V	Carcinoma	4	ausente	1,69
7	17	M	F	CM	7	ausente	1,32
8	1,2	M	C/V	CB	1	presente	1,16
9	15	F	V	CM	6	presente	9,95
10	33	M	NF	Carcinoma	5	presente	0,46
11	30	M	NF	Carcinoma	4	ausente	0,46
12	3	M	V	CM	7	presente	10,62
13	37	F	C	Adenoma	2	ausente	11,48
14	46	F	C/V	Carcinoma	7	ausente	5
15	2,5	F	V	CB	7	presente	4,67
16	1	F	C/V	CM	4	presente	4,04
17	23	F	C/V	Carcinoma	6	presente	0,9
18	1,2	F	V	CB	5	presente	2,62
19	64	F	C	Adenoma	0	ausente	2,67
20	27	F	C	Adenoma	1	ausente	1,89
21	39	F	C	Adenoma	1	ausente	0,77
22	9	M	C	CB	2	ausente	1,47
23	1,8	F	V	CB	2	ausente	3,51
24	2	F	C/V	CB	7	ausente	9,5
25	2,6	M	V	CM	5	presente	7,4
26	17	F	V	CM	4	ausente	2,95
27	2,8	F	V	CB	2	presente	2,1
28	2,2	F	V	CB	2	presente	2,39
29	24	F	C	Adenoma	1	ausente	1,89
30	44	F	NF	Carcinoma	8	ausente	2,62
31	2,5	F	V	CB	1	presente	2,94
32	9	F	C/V	CB	7	ausente	13

C: síndrome de Cushing, V: virilizante, C/V: síndrome de Cushing e virilizante, F: feminilização, NF: não funcionante, F: sexo feminino, M: sexo masculino, CB: clinicamente benigno, CM: clinicamente maligno

[illegible]

Anexo D – Trabalho publicado

Título: *“Insulin-like growth factor system on adrenocortical tumorigenesis”*

Review

Insulin-like growth factor system on adrenocortical tumorigenesis

Tamaya Castro Ribeiro, Ana Claudia Latronico*

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular, LIM/42, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 14 October 2011

Keywords:

IGF system
IGF2
Beckwith–Wiedemann syndrome
IGF-1R
IGFBPs
Sporadic adrenocortical tumors

ABSTRACT

The insulin-like growth factor (IGF) signaling pathway has many important roles in normal cell growth and development. Remarkably, all of the components of this system (IGFs, receptors, and binding proteins) are expressed in human fetal adrenals. Beckwith–Wiedemann syndrome, a congenital overgrowth disorder characterized by a high risk of development of childhood tumors, is also distinguished by a high incidence of adrenocortical carcinomas. This disease has been associated with structural abnormalities at the 11p15 locus, which harbors the *IGF2* gene as well as the genes coding for insulin, *H19*, and *p57kip2*. Notably, rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of *IGF2* were also described in sporadic adrenocortical tumors. In addition, the *IGF2* overexpression was exclusively demonstrated in adults with adrenocortical tumors as a frequent feature of the malignant state. More recent studies demonstrated that the interaction of IGF-2 with IGF receptor type 1 (IGF-1R) plays also a pivotal role in adrenocortical tumorigenesis. *IGF1R* expression levels were significantly higher in pediatric adrenocortical carcinomas, suggesting that *IGF1R* expression represents a potential prognostic marker in this group of patients. These findings indicate that the IGF system is an important pathway for autonomous growth of adrenocortical cells and potential inhibitors of this system could be a rational therapeutic target for adrenocortical tumors.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	96
2. IGF2 overexpression	97
3. IGF receptors	98
4. IGF-1R inhibitors	98
5. IGF binding proteins	98
6. Conclusion	99
Acknowledgements	99
References	99

1. Introduction

The insulin-like growth factor (IGF) system has an important role in cell proliferation, differentiation and apoptosis of many tissues, including the adrenal gland (Fottner et al., 2004). This system comprises a network of proteins that includes IGF-1, IGF-2, distinct receptors (IGF-1R, IGF-2R and insulin receptor), a family of IGF

* Corresponding author. Address: Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155, 2º andar Bloco 6 05403-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 30697512; fax: +55 11 30697519.

E-mail address: anacl@usp.br (A.C. Latronico).

binding proteins and IGFBP proteases (Yu and Rohan, 2000). These molecules are different from many other regulatory peptides that are relevant to growth because they regulate the physiology at both the whole organism level and the cellular level (Pollak, 2008).

IGF-1 and IGF-2 are single-chain polypeptides that share a high homology in their amino acid sequences (Yu and Rohan, 2000). IGF-1 acts as an important factor in the cell cycle progression and mediates the anabolic effects of GH in postnatal life (Ilvesmaki et al., 1993a). Additionally, higher circulating IGF-1 concentrations are associated with increased risk of cancer (Hankinson et al., 1998; Chan et al., 1998). IGF-2 is expressed at higher levels in the fetus and has a relevant role in fetal development (Calan and

Milne, 2009). Like IGF-1, IGF-2 has mitogenic and antiapoptotic functions.

Considerable advances toward understanding the molecular mechanisms of adrenocortical tumor development have been made in the last decade (Bertherat and Bertagna, 2009; Fassnacht et al., 2011). The study of rare genetic syndromes associated with adrenocortical carcinomas has greatly contributed with this progress (Bertherat and Bertagna, 2009). Indeed, structural and function abnormalities involved the 11p15 locus resulting in IGF-2 overexpression lead to Beckwith–Wiedemann syndrome (Gaston et al., 2001). This congenital overgrowth syndrome is characterized by omphalocele, macroglossia, macrosomia, organomegaly, hemihypertrophy, and a high risk of development of embryonal tumors in pediatric patients, including adrenocortical carcinomas (Gaston et al., 2001; Maher and Reik, 2000). Consistent molecular studies have demonstrated that *IGF2* gene is strongly overexpressed in sporadic adrenocortical carcinomas (Giordano et al., 2003; de Fraipont et al., 2005). In addition, transcriptome analysis has demonstrated that *IGF2* gene is the most overexpressed gene in adrenocortical tumors when compared with normal adrenal glands (Giordano et al., 2003; de Fraipont et al., 2005). Therefore, IGF system is one of the best-investigated pathways involved in autonomous adrenal growth. Here, we reviewed the relevant effects of IGF system in the adrenocortical tumorigenesis.

2. IGF2 overexpression

The IGF system has a fundamental role in the regulation of the normal adrenal gland. Fottner and Weber group established the function of IGFs in the adrenocortical tissue (Weber et al., 1994, 1995, 1997; Fottner et al., 1998, 1999, 2001). They showed that IGF-1 and IGF-2 can induce steroidogenesis in adrenocortical cells *in vitro* and *in vivo*. These effects are mediated by IGF-1R and modulated by IGF-BPs regulated in a specific manner by ACTH and IGFs (Weber et al., 1994, 1995; Fottner et al., 1998, 1999, 2001).

In the normal adrenal gland, high expression of *IGF2* transcripts and its protein were found in the fetal adrenal gland, whereas IGF-1 and IGF-2 have similar levels of expression in the adult adrenal gland (Penhoat et al., 1994). These findings reveal the importance of IGF-1 and IGF-2 in promoting growth during the pre- and post-natal periods, respectively. IGF-2 mediates ACTH-induced adrenal growth since ACTH induces *IGF2* expression in human fetal adrenocortical cells (Mesiano and Jaffe, 1997). Both IGF receptors and insulin receptors are expressed at the same levels in all zones of the normal adrenal cortex (Penhoat et al., 1994).

IGF2 is located at locus 11p15 which is maternally imprinted and consequently, expressed only from the paternal allele (DeChiara et al., 1991). The 11p15 region has two different clusters: a

telomeric domain which includes the *IGF2* (DeChiara et al., 1991) and *H19* (Hao et al., 1993) genes, and a centromeric domain including *CDKN1C* (*p57kip2*), a cyclin-dependent kinase inhibitor involved in the cell cycle arrest (Matsuoka et al., 1995) (Fig. 1). The *H19* mRNA is not translated and this gene may modulate *IGF2* expression (Brannan et al., 1990). Genetic or epigenetics alterations at 11p15 region result in an increased *IGF2* expression and are related to the Beckwith–Wiedemann syndrome. This structural abnormality is characterized by loss of maternal allele with the duplication of paternal allele, leading to biallelic expression of *IGF2* gene and decrease in *H19* and *p57kip2* expression (Gicquel et al., 1997).

Alterations in the 11p15 region are frequently observed in sporadic adult adrenocortical carcinomas, but only rarely in adenomas (Gicquel et al., 1997). Gicquel et al. (1994) described uniparental paternal isodisomy in adrenocortical tumors from adult patients associated with very high *IGF2* mRNA levels (four of six carcinomas, 83%), suggesting that these molecular events could be implicated in the adult adrenocortical tumorigenesis. The role of this growth factor in the malignant phenotype was confirmed in a large cohort of patients with adrenocortical tumors by Gicquel's group (Gicquel et al., 1997). *IGF2* overexpression and/or 11p15 abnormality was found in 27 out of 29 carcinomas and in three out of 35 benign tumors (Gicquel et al., 1997). In addition to mRNA expression and 11p15 alterations, IGF-2 immunohistochemistry is a helpful tool for the differentiation of benign and malignant adrenocortical tumors (Schmitt et al., 2006). Thirteen out of 17 carcinomas showed immunohistochemical reactivity for IGF-2, whereas among the adenomas (22 tumors) all of them, except one were negative (Schmitt et al., 2006).

IGF2 has been described as one of the most expressed genes in adrenocortical carcinomas (Giordano et al., 2003; de Fraipont et al., 2005). *IGF2* mRNA levels were associated with a more aggressive phenotype and a 5-fold increased risk of recurrence of carcinomas (Boulle et al., 1998; Gicquel et al., 2001). In a cohort of pediatric and adult Brazilian patients with adrenocortical tumors, we demonstrated that *IGF2* transcripts were mainly overexpressed in adult adrenocortical carcinomas compared to adenomas (Almeida et al., 2008). *IGF2* was also demonstrated as an important autocrine factor in the proliferation of human adult adrenocortical carcinoma cell line NCI H295R (Almeida et al., 2008). A microarray analysis of 24 pediatric adrenocortical tumors (5 adenomas, 18 carcinomas and 1 undetermined) demonstrated that the median expression of *IGF2* in adrenocortical tumors was 18 times higher than normal adrenal glands (West et al., 2007).

Transgenic mice with *IGF2* overexpression had hyperplasia of the zona fasciculata and the weight of the adrenal gland was significantly higher than animal controls (Wolf et al., 1998). Despite the hyperplasia, these animals did not develop tumors in the adrenal

Fig. 1. Schematic changes at the 11p15 locus in adrenocortical tumors. In the normal adrenal gland *IGF2* is maternally imprinted while *H19* and *p57kip2* are paternally imprinted. In the tumorigenesis process the maternal allele is lost followed by duplication of the paternal allele, leading to biallelic expression of *IGF2* and a decrease in the *H19* and *p57kip2* expression. Gray boxes represent the *H19* and *p57kip2* genes that are expressed in the maternal allele, black boxes represent the *IGF2* gene that is expressed in the paternal allele, white boxes represent the silent genes in the maternal and paternal alleles.

Fig. 2. IGF1R pathways. The binding of IGF-1 or IGF-2 to IGF-1R activates two distinct signal transduction pathways: MAPK responsible for cell proliferation and PI3-AKT that promotes antiapoptotic effects. Tumor suppressors such as p53, BRCA1 and WT1 negatively regulate *IGF1R* expression. The bioactivity of IGFs is modulated by a family of proteins that are able to inhibit or to enhance the IGF actions, resulting in the suppression or stimulation of cell proliferation.

glands, suggesting that *IGF2* overexpression by itself is not sufficient for malignant transformation of adrenocortical cells and that other factors are required for tumorigenesis.

3. IGF receptors

The actions of both IGF-1 and IGF-2 are mediated through IGF-1R. This receptor has a tetrameric structure with two α subunits and two β subunits (Abbott et al., 1992). The binding of IGFs to IGF-1R activates the tyrosine kinase domain which triggers two distinct signal transduction pathways: mitogen-activated protein kinase responsible for cell proliferation (MAPK) and phosphoinositol-3-kinase (PI3-AKT) that promotes antiapoptotic effects (Butler et al., 1998) (Fig. 2).

The fundamental role of IGF-1R as cell-survival factor was demonstrated by the lethal phenotype of *Igf1r* knockout mice (Liu et al., 1993). These animals, which died at birth, exhibited only 45% of birth weight when were compared with normal control mice and had developmental abnormalities, including organ hypoplasia, delayed bone formation and anomalous morphology of skin and central nervous system (Liu et al., 1993).

Abnormal IGF-1R signaling has been associated to diverse pathologies, including diabetic retinopathy (Smith et al., 1999), diabetic nephropathy (Horney et al., 1998), age-related macular degeneration (Slomiany and Rosenzweig, 2004), cardiovascular disease (Sookoian et al., 2010) and a variety of cancers (Rosenzweig and Aterya, 2010). The essential role of IGF-1R in cell transformation was well established by studies performed in cell lines in which *IGF1R* was disrupted. These cells were unable to undergo transformation after exposure to oncogenic agents (Sell et al., 1993).

The signaling of IGF-2 through IGF-1R is thought to represent a relevant mechanism in adrenocortical tumorigenesis. In normal cells, the tyrosine kinase receptors are tightly regulated and responsible for a homeostatic growth. However, in tumor cells, these molecules are activated leading to an abnormal stimulation and cellular dysregulation. The IGF1 receptor is commonly overexpressed in tumors, including malignant melanomas, cancers of the colon, pancreas and prostate (Kanter-Lewensohn et al., 2000; Weber et al., 2002; Bergmann et al., 1995; Hellawell et al., 2002). In adrenocortical tumors, an upregulation of this receptor has been described in carcinomas but not in adenomas (Weber et al., 1997;

Kamio et al., 1991). In agreement with these data, we demonstrated in a cohort of pediatric and adult Brazilian patients with adrenocortical tumors that *IGF1R* expression was significantly higher in pediatric adrenocortical carcinomas than in adenomas (Almeida et al., 2008). In addition, *IGF1R* expression was a predictor of metastases in the pediatric group (Almeida et al., 2008). *IGF1R* upregulation was confirmed in another cohort of pediatric patients (Doghman et al., 2010). Interestingly, two microRNAs, microRNA-99a/microRNA-100, were demonstrated to be involved in the regulation of *IGF1R* expression (Doghman et al., 2010). These findings showed that the IGF signaling, mainly mediated by IGF-1R, represents a potential therapeutic target.

IGF-2R has been considered as a tumor suppressor gene and loss-of-function defects of this receptor was correlated with increased IGF-2-initiated IGF-1R activation and increased proliferation (O’Gorman et al., 2002). In fact, loss of heterozygosity at the *IGF2R* locus was identified in adrenocortical tumors (Leboulleux et al., 2001). This molecular defect was detected in 58% of malignant tumors but only in 9% of benign tumors, suggesting that the loss of heterozygosity at the *IGF2R* locus is a late step in adrenocortical tumorigenesis and that this receptor may represent a potential tumor suppressor gene in the adrenal gland (Leboulleux et al., 2001).

4. IGF-1R inhibitors

Almeida et al. (2008) showed that a selective IGF-1R kinase inhibitor, NVP-AEW541, had anti-tumor effects in adult (NCI H295) and pediatric adrenocortical tumor cell lines, suggesting that IGF-1R inhibitors represent a promising therapy for human adrenocortical carcinoma. Similarly, Shen et al. (2007) demonstrated the importance of IGF system in adrenocortical carcinoma SW-13 cell line. IGF administration significantly promoted proliferation of SW-13 cells and this effect was positively correlated with IGF concentrations (Shen et al., 2007). Furthermore, IGF-1 receptor antibody inhibited the effect of IGF with direct inhibitory effect on proliferation of SW-13 cells (Shen et al., 2007). In a preclinical trial, Barlaskar et al. (2009) established that antagonizing IGF pathway with two pharmacological agents (NVP-AEW541 and IMC-A12) results in inhibition of growth of adrenocortical carcinomas cultured cell lines and xenograft tumors. Importantly, this target inhibition was more potent than mitotane treatment (Barlaskar et al., 2009).

The expression of *IGF1R* gene is regulated by several proteins with oncogenic or antioncogenic properties (Werner et al., 2000). The transcription factors with tumor suppression action such as p53, BRCA1 and WT1, negatively regulate *IGF1R* expression (Fig. 2) and Werner and Maor, 2006. Therefore, loss-of-function mutation of tumor suppressors can lead to aberrant regulation of *IGF1R* expression.

5. IGF binding proteins

The bioactivity of IGF-1 and IGF-2 are modulated by a family of six proteins (IGFBP 1–6) in both circulation and the cellular micro-environment (Hwa et al., 1999). These proteins have a complex spectrum of functions and are able to inhibit or to enhance the IGF actions, resulting in the suppression or stimulation of cell proliferation. Therefore, when IGFBPs levels are low, a great proportion of IGFs are free from these binding proteins and their mitogenic activity would be expected to be high (Pollak et al., 2004). These binding proteins have three major roles: transport IGFs, protect IGF from degradation, increasing their half-lives and regulate the interaction between IGFs and IGF-1R (Yu and Rohan, 2000). IGFBPs can bind to IGFs with more affinity than IGF-1R, diminishing the interaction between IGF and its receptor and

consequently IGF cellular action (Kelley et al., 1996). However, when IGF and IGFBPs are coupled, there is a protection from proteolytic degradation resulting in an increased bioavailability (Kelley et al., 1996). Actually, the functions of IGFBPs are determined by post-translational modifications such as phosphorylation and proteolysis (Coverley and Baxter, 1997; Claussen et al., 1997). Certain functions of IGFBPs are IGF-independent. These proteins appear to play their effects in the absence of cell surface receptors. IGFBP-3 and IGFBP-5 have in their structures, a peptide that is permeable in the cell membrane, demonstrating a mechanism by which these proteins can enter the cells and trigger IGF-independent actions (Goda et al., 2008). Additionally, Zhu et al. (2008) demonstrated that IGFBPs can modulate the canonical Wnt signaling, another relevant pathway in the adrenocortical tumorigenesis.

The six IGFBPs are expressed at variable level in adrenal tumors and hyperplasias (Ilvesmaki et al., 1998). *IGFBP* mRNA expression has also been described in normal human adrenals, showing different *IGFBP* mRNA profiles in fetal and adult adrenocortical glands (Ilvesmaki et al., 1993b). A specific overexpression of IGFBP-2 in tumors with high levels of *IGF2* gene expression was first described by Boule et al. (1998). The malignant phenotype of adrenocortical tumors was associated with specifically high levels of IGF-2 and IGFBP-2. Despite enhanced levels of IGFBP-2 protein in malignant tumors no increase in *IGFBP2* mRNA levels was detected, suggesting post-transcriptional regulation of this protein (Boule et al., 1998).

A subsequent study demonstrated that patients with metastatic adrenocortical tumors had significantly higher IGFBP-2 plasma levels than the control group (Boule et al., 2001). Additionally, IGFBP-2 levels in patients with metastatic disease were inversely correlated with survival. However, there was no significant difference in plasma IGFBP-2 concentration among patients with complete remission, localized disease and healthy controls (Boule et al., 2001).

In vitro analyses demonstrated that the functional consequences of long term IGFBP-2 upregulation in murine tumor adrenocortical cells (Y-1) were associated with morphological alterations, enhanced cell proliferation, and increased cloning efficiency as compared to transfected control cells (Hoeftlich et al., 2000). The mechanisms that are responsible for IGFBP-2 tumor promoting effects are not established, however, a strong and selective upregulation of the catalase activity in IGFBP-2 overexpressing malignant Y-1 cell lines was observed (Hoeftlich et al., 2003).

6. Conclusion

The adrenocortical carcinoma is a rare and heterogeneous malignancy with poor prognosis. It is unquestionable that better therapies are urgently needed. Future advances in the management of these tumors will mainly depend on a better understanding of the molecular pathogenesis. Definitely, the IGF system represents a crucial pathway for development of both familial and sporadic adrenocortical carcinomas. The discovery of new drugs that target IGF signaling, such as receptor-specific antibodies, receptor kinase inhibitors and AMP-activated protein kinase activators represents a new hope of clinical therapy of metastatic adrenocortical carcinomas.

Acknowledgements

Dr. Latronico reports receiving Grant support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq # 300209/2008-8). In addition, Tamaya Castro Ribeiro reports a Grant from Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP # 2010/09503-7).

References

- Abbott, A.M., Bueno, R., Pedrini, M.T., Murray, J.M., Smith, R.J., 1992. Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J. Biol. Chem.* 267, 10759–10763.
- Almeida, M.Q., Fragoso, M.C., Lotfi, C.F., Santos, M.G., Nishi, M.Y., Costa, M.H., Lerario, A.M., Maciel, C.C., Mattos, G.E., Jorge, A.A., Mendonça, B.B., Latronico, A.C., 2008. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 3524–3531.
- Barlaskar, F.M., Spalding, A.C., Heaton, J.H., Kuick, R., Kim, A.C., Thomas, D.G., Giordano, T.J., Ben-Josef, E., Hammer, G.D., 2009. Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 204–212.
- Bergmann, U., Funatomi, H., Yokoyama, M., Beger, H.G., Korc, M., 1995. Insulin-like growth factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles. *Cancer Res.* 55, 2007–2011.
- Bertherat, J., Bertagna, X., 2009. Pathogenesis of adrenocortical cancer. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 23, 261–271.
- Boulet, N., Logie, A., Gicquel, C., Perin, L., Le Bouc, Y., 1998. Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 1713–1720.
- Boulet, N., Baudin, E., Gicquel, C., Logie, A., Bertherat, J., Penfornis, A., Bertagna, X., Luton, J.P., Schlumberger, M., Le Bouc, Y., 2001. Evaluation of plasma insulin-like growth factor binding protein-2 as a marker for adrenocortical tumors. *Eur. J. Endocrinol.* 144, 29–36.
- Brannan, C.I., Dees, E.C., Ingram, R.S., Tilghman, S.M., 1990. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol. Cell Biol.* 10, 28–36.
- Butler, A.A., Yakar, S., Gewolb, I.H., Karas, M., Okubo, Y., LeRoith, D., 1998. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 121, 19–26.
- Callan, A.C. and Milne, E., 2009. Involvement of the IGF system in fetal growth and childhood cancer: an overview of potential mechanisms. *Cancer Causes Control.*
- Chan, J.M., Stampfer, M.J., Giovannucci, E., Gann, P.H., Ma, J., Wilkinson, P., Hennekens, C.H., Pollak, M., 1998. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 279, 563–566.
- Claussen, M., Kubler, B., Wendland, M., Neifer, K., Schmidt, B., Zapf, J., Braulke, T., 1997. Proteolysis of insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins by cathepsin D. *Endocrinology* 138, 3797–3803.
- Coverley, J.A., Baxter, R.C., 1997. Phosphorylation of insulin-like growth factor binding proteins. *Mol. Cell Endocrinol.* 128, 1–5.
- de Fraipont, F., El Atifi, M., Cherradi, N., Le Moigne, G., Defaye, G., Houlgatte, R., Bertherat, J., Bertagna, X., Plouin, P.F., Baudin, E., Berger, F., Gicquel, C., Chabre, O., Feige, J.J., 2005. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 1819–1829.
- DeChiara, T.M., Robertson, E.J., Efstratiadis, A., 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64, 849–859.
- Doghman, M., Wakil, A.E., Cardinaud, B., Thomas, E., Wang, J., Zhao, W., Peralta-Del Valle, M.H., Figueiredo, B.C., Zambetti, G.P., Lalli, E., 2010. Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 70, 4666–4675.
- Fassnacht, M., Libe, R., Kroiss, M., Allolio, B., 2011. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat. Rev. Endocrinol.*
- Fottner, C., Engelhardt, D., Weber, M.M., 1998. 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.* 158, 409–417.
- Fottner, C., Engelhardt, D., Weber, M.M., 1999. Characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) secreted by bovine adrenocortical cells in primary culture: regulation by insulin-like growth factors (IGFs) and adrenocorticotropin (ACTH). *Horm. Metab. Res.* 31, 203–208.
- Fottner, C., Engelhardt, D., Elmlinger, M.W., Weber, M.M., 2001. Identification and characterization of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein expression and secretion by adult human adrenocortical cells: differential regulation by IGFs and adrenocorticotropin. *J. Endocrinol.* 168, 465–474.
- Fottner, C., Hoeftlich, A., Wolf, E., Weber, M.M., 2004. Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis. *Horm. Metab. Res.* 36, 397–405.
- Gaston, V., Le Bouc, Y., Soupre, V., Burglen, L., Donadieu, J., Oro, H., Audry, G., Vazquez, M.P., Gicquel, C., 2001. Analysis of the methylation status of the KCNQ1OT and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 9, 409–418.
- Gicquel, C., Bertagna, X., Schneid, H., Francillard-Leblond, M., Luton, J.P., Girard, F., Le Bouc, Y., 1994. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of Beckwith-Wiedemann factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 1444–1453.
- Gicquel, C., Raffin-Sanson, M.L., Gaston, V., Bertagna, X., Plouin, P.F., Schlumberger, M., Louvel, A., Luton, J.P., Le Bouc, Y., 1997. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2559–2565.

- Gicquel, C., Bertagna, X., Gaston, V., Coste, J., Louvel, A., Baudin, E., Bertherat, J., Chapuis, Y., Duclos, J.M., Schlumberger, M., Plouin, P.F., Luto, J.P., Le Bouc, Y., 2001. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 61, 6762–6767.
- Giordano, T.J., Thomas, D.G., Kuick, R., Lizyness, M., Misek, D.E., Smith, A.L., Sanders, D., Aljundi, R.T., Gauger, P.G., Thompson, N.W., Taylor, J.M., Hanash, S.M., 2003. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am. J. Pathol.* 162, 521–531.
- Goda, N., Tenno, T., Inomata, K., Shirakawa, M., Tanaka, T., Hiroaki, H., 2008. Intracellular protein delivery activity of peptides derived from insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5. *Exp. Cell Res.* 314, 2352–2361.
- Hankinson, S.E., Willett, W.C., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Michaud, D.S., Deroot, B., Rosner, B., Speizer, F.E., Pollak, M., 1998. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 351, 1393–1396.
- Hao, Y., Crenshaw, T., Moulton, T., Newcomb, E., Tycko, B., 1993. Tumour-suppressor activity of H19 RNA. *Nature* 365, 764–767.
- Hellawell, G.O., Turner, G.D., Davies, D.R., Poulsom, R., Brewster, S.F., Macaulay, V.M., 2002. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res.* 62, 2942–2950.
- Hoeflich, A., Fetscher, O., Lahm, H., Blum, W.F., Kolb, H.J., Engelhardt, D., Wolf, E., Weber, M.M., 2000. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res.* 60, 834–838.
- Hoeflich, A., Fetscher, O., Preta, G., Lahm, H., Kolb, H.J., Wolf, E., Weber, M.M., 2003. Increased activity of catalase in tumor cells overexpressing IGFBP-2. *Horm. Metab. Res.* 35, 816–821.
- Horney, M.J., Shirley, D.W., Kurtz, D.T., Rosenzweig, S.A., 1998. Elevated glucose increases mesangial cell sensitivity to insulin-like growth factor I. *Am. J. Physiol.* 274, F1045–F1053.
- Hwa, V., Oh, Y., Rosenfeld, R.G., 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* 20, 761–787.
- Iivasmäki, V., Kahri, A.L., Miettinen, P.J., Voutilainen, R., 1993a. Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 852–858.
- Iivasmäki, V., Blum, W.F., Voutilainen, R., 1993b. Insulin-like growth factor binding proteins in the human adrenal gland. *Mol. Cell Endocrinol.* 97, 71–79.
- Iivasmäki, V., Liu, J., Heikkilä, P., Kahri, A.L., Voutilainen, R., 1998. Expression of insulin-like growth factor binding protein 1–6 genes in adrenocortical tumors and pheochromocytomas. *Horm. Metab. Res.* 30, 619–623.
- Kamio, T., Shigematsu, K., Kawai, K., Tsuchiyama, H., 1991. Immunoreactivity and receptor expression of insulin like growth factor I and insulin in human adrenal tumors. An immunohistochemical study of 94 cases. *Am. J. Pathol.* 138, 83–91.
- Kanter-Lewensohn, L., Dricu, A., Girnita, L., Wejde, J., Larsson, O., 2000. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and p27Kip1 in melanocytic tumors: a potential regulatory role of IGF-1 pathway in distribution of p27Kip1 between different cyclins. *Growth Factors* 17, 193–202.
- Kelley, K.M., Oh, Y., Gargosky, S.E., Gucev, Z., Matsumoto, T., Hwa, V., Ng, L., Simpson, D.M., Rosenfeld, R.G., 1996. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 619–637.
- Lebouilleux, S., Gaston, V., Boule, N., Le Bouc, Y., Gicquel, C., 2001. Loss of heterozygosity at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor locus: a frequent but late event in adrenocortical tumorigenesis. *Eur. J. Endocrinol.* 144, 163–168.
- Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., Efstratiadis, A., 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59–72.
- Maher, E.R., Reik, W., 2000. Beckwith–Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J. Clin. Invest.* 105, 247–252.
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W., Elledge, S.J., 1995. P57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 9, 650–662.
- Mesiano, S., Jaffe, R.B., 1997. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr. Rev.* 18, 378–403.
- O’Gorman, D.B., Weiss, J., Hettiaratchi, A., Firth, S.M., Scott, C.D., 2002. Insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor overexpression reduces growth of choriocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Endocrinology* 143, 4287–4294.
- Penhoat, A., Rainey, W.E., Viard, I., Saez, J.M., 1994. Regulation of adrenal cell-differentiated functions by growth factors. *Horm. Res.* 42, 39–43.
- Pollak, M., 2008. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* 8, 915–928.
- Pollak, M.N., Schernhammer, E.S., Hankinson, S.E., 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* 4, 505–518.
- Rosenzweig, S.A., Atreya, H.S., 2010. Defining the pathway to insulin-like growth factor system targeting in cancer. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1115–1124.
- Schmitt, A., Saremaslani, P., Schmid, S., Rousson, V., Montani, M., Schmid, D.M., Heitz, P.U., Komminoth, P., Perren, A., 2006. IGFII and MIB1 immunohistochemistry is helpful for the differentiation of benign from malignant adrenocortical tumours. *Histopathology* 49, 298–307.
- Sell, C., Rubini, M., Rubin, R., Liu, J.P., Efstratiadis, A., Baserga, R., 1993. Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11217–11221.
- Shen, W., Xian, J., Hu, W.L., Liu, J., 2007. Effect of insulin-like growth factor and its receptor-I antibody on growth of human adrenocortical carcinoma SW-13 cell lines in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 27, 88–91.
- Slomiany, M.G., Rosenzweig, S.A., 2004. IGF-1-induced VEGF and IGFBP-3 secretion correlates with increased HIF-1 α expression and activity in retinal pigment epithelial cell line D407. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2838–2847.
- Smith, L.E., Shen, W., Perruzzi, C., Soker, S., Kinose, F., Xu, X., Robinson, G., Driver, S., Bischoff, J., Zhang, B., Schaeffer, J.M., Senger, D.R., 1999. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat. Med.* 5, 1390–1395.
- Sookoian, S., Gianotti, T.F., Gemma, C., Burgueno, A.L., Pirola, C.J., 2010. Role of genetic variation in insulin-like growth factor 1 receptor on insulin resistance and arterial hypertension. *J. Hypertens.* 28, 1194–1202.
- Weber, M.M., Kiess, W., Beikler, T., Simmler, P., Reichel, M., Adelman, B., Kessler, U., Engelhardt, D., 1994. Identification and characterization of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II/mannose-6-phosphate (IGF-II/M6P) receptors in bovine adrenal cells. *Eur. J. Endocrinol.* 130, 265–270.
- Weber, M.M., Simmler, P., Fottner, C., Engelhardt, D., 1995. Insulin-like growth factor II (IGF-II) is more potent than IGF-I in stimulating cortisol secretion from cultured bovine adrenocortical cells: interaction with the IGF-I receptor and IGF-binding proteins. *Endocrinology* 136, 3714–3720.
- Weber, M.M., Auernhammer, C.J., Kiess, W., Engelhardt, D., 1997. Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. *Eur. J. Endocrinol.* 136, 296–303.
- Weber, M.M., Fottner, C., Liu, S.B., Jung, M.C., Engelhardt, D., Baretton, G.B., 2002. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human colon carcinomas. *Cancer* 95, 2086–2095.
- Werner, H., Maor, S., 2006. The insulin-like growth factor-I receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 236–242.
- Werner, H., Shalita-Chesner, M., Abramovitch, S., Idelman, G., Shaharabani-Gargir, L., Glaser, T., 2000. Regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene by oncogenes and antioncogenes: implications in human cancer. *Mol. Genet. Metab.* 71, 315–320.
- West, A.N., Neale, G.A., Pounds, S., Figueredo, B.C., Rodriguez Galindo, C., Pianovski, M.A., Oliveira Filho, A.G., Malkin, D., Lalli, E., Ribeiro, R., Zambetti, G.P., 2007. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 67, 600–608.
- Wolf, E., Hoeflich, A., Lahm, H., 1998. What is the function of IGF-II in postnatal life? Answers from transgenic mouse models. *Growth Horm. IGF Res.* 8, 185–193.
- Yu, H., Rohan, T., 2000. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1472–1489.
- Zhu, W., Shiojima, I., Ito, Y., Li, Z., Ikeda, H., Yoshida, M., Naito, A.T., Nishi, J., Ueno, H., Umezawa, A., Minamino, T., Nagai, T., Kikuchi, A., Asashima, M., Komuro, I., 2008. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature* 454, 345–349.

Anexo E – Trabalho publicado

Título: *“Amplification of the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Gene Is a Rare Event in Adrenocortical Adenocarcinomas: Searching for Potential Mechanisms of Overexpression”*

Research Article

Amplification of the *Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor* Gene Is a Rare Event in Adrenocortical Adenocarcinomas: Searching for Potential Mechanisms of Overexpression

Tamaya Castro Ribeiro,¹ Alexander Augusto Jorge,^{1,2} Madson Q. Almeida,³ Beatriz Marinho de Paula Mariani,¹ Mirian Yumi Nishi,¹ Berenice Bilharinho Mendonca,¹ Maria Candida Barisson Villares Fragoso,³ and Ana Claudia Latronico¹

¹ Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42, Brazil

² Unidade de Endocrinologia Genética/LIM25, Brazil

³ Unidade de Suprarrenal, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence should be addressed to Ana Claudia Latronico; anacl@usp.br

Received 27 March 2014; Accepted 16 June 2014; Published 10 July 2014

Academic Editor: Maricilda Palandi de Mello

Copyright © 2014 Tamaya Castro Ribeiro et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Context. *IGF1R* overexpression appears to be a prognostic biomarker of metastatic pediatric adrenocortical tumors. However, the molecular mechanisms that are implicated in its upregulation remain unknown. **Aim.** To investigate the potential mechanisms involved in *IGF1R* overexpression. **Patients and Methods.** We studied 64 adrenocortical tumors. *IGF1R* copy number variation was determined in all patients using MLPA and confirmed using real time PCR. In a subgroup of 32 patients, automatic sequencing was used to identify *IGF1R* allelic variants and the expression of microRNAs involved in *IGF1R* regulation by real time PCR. **Results.** *IGF1R* amplification was detected in an adrenocortical carcinoma that was diagnosed in a 46-year-old woman with Cushing's syndrome and virilization. *IGF1R* overexpression was demonstrated in this case. In addition, gene amplification of other *loci* was identified in this adrenocortical malignant tumor, but no *IGF1R* copy number variation was evidenced in the remaining cases. Automatic sequencing revealed three known polymorphisms but they did not correlate with its expression. Expression of miR-100, miR-145, miR-375, and miR-126 did not correlate with *IGF1R* expression. **Conclusion.** We demonstrated amplification and overexpression of *IGF1R* gene in only one adrenocortical carcinoma, suggesting that these combined events are uncommon. In addition, *IGF1R* polymorphisms and abnormal microRNA expression did not correlate with *IGF1R* upregulation in adrenocortical tumors.

1. Introduction

Adrenocortical tumors are rare endocrine malignancies [1]. However, the incidence of these tumors is remarkably high in Southern Brazil, where it is estimated to be 10–15 times greater than the worldwide incidence [2, 3]. These tumors can occur in all age groups and have been characterized as having a bimodal age distribution, with the first peak occurring before 5 years of age and the second between the fourth and fifth decades [3].

The insulin-like growth factor (IGF) signaling system plays an important role in the growth and development of

many tissues, including the adrenal gland [4]. Insulin-like growth factors are mitogens that regulate cell proliferation, differentiation, and apoptosis by interacting with the IGF1 receptor (IGF1R) [5]. This system has also been implicated in various pathophysiological conditions and is thought to play a particular role in tumorigenesis [6]. The IGF1R pathway is important in promoting oncogenic transformation, growth, and survival of cancer cells [7], and *IGF1R* overexpression has been demonstrated in many cancers [8, 9].

We previously demonstrated *IGF1R* overexpression in 65% of children and 13% of adults with adrenocortical tumors

TABLE 1: Clinical characteristics of 64 patients with adrenocortical tumors.

	Children		Adults	
	Clinically benign <i>n</i> = 18	Clinically malignant <i>n</i> = 7	Adenomas <i>n</i> = 24	Carcinomas <i>n</i> = 15
Sex (F:M)	3.5:1	1.3:1	11:1	4:1
Clinical presentation (<i>n</i>)				
Cushing	2	0	20	3
Virilizing	12	4	0	1
Mixed	4	2	2	7
Nonfunctioning	0	0	2	4
Feminizing	0	1	0	0

F: female; M: male.

[10]. Interestingly, this *IGF1R* upregulation was a predictor of metastases in children with adrenocortical tumors. Additionally, a selective *IGF1R* kinase inhibitor exhibited antitumor effects in adult and pediatric adrenocortical tumor cell lines, suggesting that *IGF1R* inhibitors represent a promising therapy for human adrenocortical carcinoma [10]. The *IGF1R* upregulation was confirmed in another cohort of pediatric patients [11]. The molecular mechanisms that lead to increased *IGF1R* expression in these tumors remain unexplained. In this study, we investigated whether *IGF1R* gene amplification and allelic variations could be implicated in *IGF1R* upregulation. In addition, the expression of four distinct microRNAs (miRNA) that were involved in *IGF1R* regulation was evaluated.

2. Patients

The study included 64 Brazilian patients with sporadic adrenocortical tumors (Table 1). Written informed consent, as approved by the Ethics Committee of the Hospital of Clinics from the University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, was obtained from all participants in this study. The consent was acquired directly from the subject if he/she was an adult or from the parent/guardian otherwise. Samples of sporadic adrenocortical tumors were obtained from 25 children and adolescents (18 girls and 7 boys; 1 to 18 years of age) and 39 adult patients (34 women and 5 men; 19 to 73 years of age). The diagnosis of malignancy in the pediatric group was established in 8 of the 25 adrenocortical tumors by advanced tumor stage (III or IV) and/or poor clinical outcome. Adult adrenocortical tumors were classified according to the Weiss criteria and included 23 adrenocortical adenomas (Weiss score < 3) and 16 carcinomas (Weiss score ≥ 3). *IGF1R* expression was previously studied in 45 patients (24 children/adolescents and 21 adults) using real time PCR [10], and the overexpression of this receptor was observed in 17 children and 5 adults [10]. In 32 out of these 45 patients automatic sequencing was used to identify *IGF1R* allelic variants and the expression of microRNAs involved in *IGF1R* regulation was determined by real time PCR. Eight normal adrenal gland cortices, which were obtained from children and adults (range of age: 1 to 72 years) during renal surgery or autopsies, were used as controls. The fragments

of adrenal cortices were properly selected by an experienced pathologist.

3. Molecular Analysis

3.1. DNA Extraction. Genomic DNA was extracted from frozen tumor samples using a Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, WI, USA) and was stored at −35°C. The concentration and purity of the genomic DNA were measured, using spectrophotometer at an absorbance of 260 and 280 nm.

3.2. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). The *IGF1R* copy number of the adrenocortical tumors samples was measured using the SALSA MLPA kit P217 *IGF1R* (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands). This molecular assay was designed to detect deletions/duplications of one or more exons of the *IGF1R* (chromosome 15q26) and *IGFBP3* (chromosome 7p13) genes. The P217 *IGF1R* probe mix contained 22 specific probes for *IGF1R*, 5 probes for *IGFBP3*, and 9 control probes. The *FGFR4* and *NSD1* genes analysis was performed using the SALSA MLPA kit P026-C1 Sotos (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), which contains two probes for *FGFR4* gene and 24 probes for *NSD1* gene (5q35.1). MLPA was performed with a total of 200 ng of genomic DNA for each sample, as previously described [12]. The PCR products were submitted to capillary electrophoresis on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, The Perkin-Elmer Corporation, CA, USA), and the MLPA results were analyzed using the Genescan 3.7 software and further evaluated using the Excel spreadsheet software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). The tumor sample normalized peak height was then divided by the average normalized peak height of normal adrenals. Dosage quotient areas outside the range of 0.70–1.3 were considered abnormal. In addition, visual comparison of peak profiles was performed, three control samples were included in each MLPA experiment, and all results were confirmed by two independent tests.

3.3. SYBR Green Real Time PCR. SYBR Green real time PCR for the *IGF1R* gene (GenBank accession number

NC_000015.9 for genomic and NM_000875.3 for mRNA sequences) was used to confirm the MLPA results for all of the adrenocortical tumors that were studied. The candidate gene copy number was measured using an ABI Prism 7000 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). The Niemann-Pick disease type C1 gene (*NPC1*) (GenBank accession number NC_000018.9 for genomic and NM_000271.4 for mRNA sequences) was used as a house-keeping gene, and specific forward and reverse primers for *IGF1R* were used. The PCR was performed in 25 μ L containing 2.5 μ L of DNA (50 ng), 10 pmol of each primer, and the power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster, CA). The thermal cycling conditions consisted of denaturation for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation for 15 sec at 95°C and annealing/extension for 1 min at 60°C. A cycle threshold (CT) value in the linear range of amplification was selected for each sample in triplicate and normalized to *NPC1*. The *IGF1R* dosage was determined using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [13]. The normalized value (ΔCT) for each tumor sample was then compared with the mean ΔCT of five normal adrenals to generate a fold change ratio (normal = 1) that was multiplied by 2 to obtain the copy number (normal = 2).

3.4. *IGF1R* Sequence Analysis. *IGF1R* sequence analysis was performed in 32 (19 children-adolescents and 13 adults; 19 adenomas and 13 carcinomas) of 64 patients with adrenocortical tumors. Among these patients, 18 (52.6%) exhibited *IGF1R* overexpression. The entire coding region and exon-intron boundaries of *IGF1R* were amplified from genomic DNA using PCR. The oligonucleotide sequences and PCR conditions are available upon request. The PCR products were pretreated with a combination of shrimp alkaline phosphatase and exonuclease I (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH) and directly sequenced using the BigDye™ terminator cycle sequencing ready reaction kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) in an ABI Prism 310 automatic sequencer.

3.5. Expression of MicroRNAs. Some microRNAs can regulate IGF-1R expression. Four microRNAs that were related to *IGF1R* regulation were selected: miR-100, miR-145, miR-375, and miR-126 [11, 14–16]. MicroRNA analysis was performed in 32 samples of adrenocortical tumors and in the same tumors that were submitted to automatic sequencing. To measure microRNA expression, RNA was extracted and quantitative real time PCR was performed. Single-stranded cDNA was synthesized from 1 mg of total RNA using Megaplex RT Primers, Human Pool A v2.1 (PN 4399966, Applied Biosystems), and the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (PN 4366596, Applied Biosystems). Twenty-five nanograms of cDNA was used as a template in a 20- μ L PCR reaction, and the PCR products were amplified using specific primers (TaqMan MicroRNA Assays: hsa-mir100-ID: 002142, hsa-mir 145-ID: 002278, has-mir375-ID: 000564, has-mir126-ID: 002228, Applied Biosystems) and the Taqman Universal Master Mix II, with no UNG (PN 4440040, Applied Biosystems). The PCR products were detected using the ABI Prism 7000 Sequence Detection

System (Applied Biosystems). RNU 44 (ID: 001094, Applied Biosystems) and RNU 48 (ID: 001006, Applied Biosystems) were used as house-keeping genes. The relative expression levels were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. A commercial pool of normal human adrenals RNA was used as a reference sample (Clontech, Palo Alto, CA).

3.6. *P53* Analysis. Genomic DNA was extracted from frozen tumor specimens using a QIAmp DNA mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The entire exon 10 was amplified by PCR using the following intronic primers: 5'-GCTGTATAGGTAAGTGAAGTGCAG-3' and 5'-GATGA-GAATGGAATCCTATG-3'. The amplification protocol consisted of denaturing at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles consisting of annealing at 50°C for 30 sec, primer extension at 72°C for 30 sec, and denaturing at 94°C for 30 sec. All amplified fragments were examined on 1% agarose gel electrophoresis. The PCR products were pretreated with an enzymatic combination of exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH) and directly sequenced using the BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) in an ABI PRISM 310 automatic sequencer (Perkin-Elmer Corp.).

4. Results

4.1. *IGF1R* Copy Number. *IGF1R* amplification was detected using MLPA and confirmed using real time PCR in an adrenocortical carcinoma that was diagnosed in a 46-year-old female patient with Cushing's syndrome associated with clinical virilization (Figure 1). The tumor's size was 10 × 8 × 6 cm, and it was classified as ENSAT stage III and presented a Weiss score of 7 upon histopathological analysis. *IGF1R* mRNA levels were 5 times higher in this tumor than in the normal total adrenal gland pool. Additionally, the amplification of the *IGFBP3*, *FGFR4* (data not shown), and *NSD1* (data not shown) genes was also detected in this carcinoma, but *IGF1R* amplification was not demonstrated in the remaining cases with adrenocortical tumors.

4.2. *IGF1R* Sequence Analysis. Three distinct previously described exomic polymorphisms were detected in *IGF1R*: exon 11 rs_3743262 (10.5%, genotype frequency), exon 16 rs_2229765 (65.8%, genotype frequency), and exon 21 rs_17847203 (7.9%, genotype frequency). No correlation between the *IGF1R* variants and their expression was demonstrated in the adrenocortical tumors. In addition, another 6 previously known polymorphisms were identified in the intronic regions (rs_7174918, rs_2272037, rs_951715, rs_1464430, rs_4486868, and rs_2593053).

4.3. MicroRNA Expression. Real time PCR analysis revealed that miR-100 (median 0.3 (from 0.07 to 1.97)) and 375 (median 0.05 (from 0.01 to 0.27)) were downregulated in adrenocortical tumors. This reduction was observed in benign and malignant tumors and was not associated with increased expression of *IGF1R*. miR-145 (median 2.2 (from

FIGURE 1: (I) Representative MLPA peak patterns of the *IGF1R* and *IGFBP3* genes. The numbers in the top portion of panels (IA) and (IB) represent the fragment size in the capillary electrophoresis analysis. (II) Histogram showing the normalized data with results of three control individuals and internal controls (reference probes). Normalized relative values, ranging within a confidence interval of 0.7 to 1.3, were established by control data variations and correspond to two gene copies in the genotype. The values in y-axis correspond to the normalized relative value and the number on the top of each bar represents the normalized value for each probe. (A) Normal adrenal gland. (B) Adrenocortical tumor with *IGF1R* and *IGFBP3* amplification. Some reference probes in this tumor are also amplified. (a): twenty-two *IGF1R* probes. (b): six *IGFBP3* probes. (c): reference probes.

FIGURE 2: Expression of microRNAs 145, 100, 375, and 126 in adrenocortical tumor samples with normal and increased *IGF1R* expression. No difference of microRNA expression was observed for all microRNAs. (miR-145 $P = 0.19$, miR-100 $P = 0.61$, miR-375 $P = 0.49$, and miR-126 $P = 0.81$).

0.01 to 12.6)) had variable expression in the adrenocortical tumors that were evaluated; however, these values were not correlated with the expression values of *IGF1R* in adrenocortical adenomas and carcinomas. miR-126 (median 596.6 (from 30.8 to 2667.4)) was overexpressed in benign and malignant adrenocortical tumors and was not related to *IGF1R* expression (Figure 2).

4.4. Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using SPSS Software (PASW version 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL). Continuous data are expressed as median values (from minimum to maximum). Differences in expression levels between two groups were analyzed by means of the two-tailed Mann-Whitney U test.

5. Discussion

IGF1R has potent mitogenic, antiapoptotic, and transforming activities [17]. Normal growth and differentiation are result of a fine balance between the process of cell proliferation and death, and the disruption of one or more factors involved in these actions can result in pathologic phenotypes, including malignancy [17]. Indeed, *IGF1R* is overexpressed in several primary tumors and cancer-derived cells [18, 19]. It has been demonstrated that *IGF1R* expression is a fundamental prerequisite for cellular transformation because enhanced *IGF1R* levels and *IGF1* signaling are considered key factors for the cell to adopt the proliferative and oncogenic pathways [20]. Increased expression of the human *IGF1* receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation in different cells

[6, 21]. On the other hand, the absence or decrease of levels of the *IGF1* receptor prevents malignant growth and transformation [22].

We identified *IGF1R* overexpression in metastatic pediatric adrenocortical tumors and found that it was a prognostic biomarker of advanced tumors in these children [10]. In present study, we hypothesized that *IGF1R* overexpression in adrenocortical tumors could be caused by gene amplification, allelic variants, and dysregulated microRNA expression. In fact, *IGF1R* amplification has been reported in malignant melanomas [23], breast cancers [24], pancreatic adenocarcinomas [25], gastric cell lines [26], rhabdomyosarcomas [27], Wilms' tumors [28], and gastrointestinal stromal tumors [29]. Moreover, *IGF1R* amplification was associated with cellular transformation and tumor progression [30].

The *IGF1R* copy number in 64 adrenal tumor samples was analyzed using MLPA in this study. Amplification of *IGF1R* was detected in only one adrenocortical carcinoma (Weiss score 7) that was diagnosed in a woman who had an endocrine hyperfunction that was characterized by hypercortisolism and hyperandrogenism. This patient was treated with mitotane and she had a favorable evolution over the previous 10 years. As expected, the adrenocortical tumor with *IGF1R* amplification diagnosed in this patient had higher *IGF1R* mRNA levels compared to normal adrenal samples. MLPA analysis also demonstrated a multigene amplification, suggesting a potential aneuploidy. *IGF1R* gene amplification was not demonstrated in the remaining adrenocortical tumors, which suggested that other mechanisms could be implicated in *IGF1R* upregulation. Additionally only the previously known exomic and intronic polymorphisms were observed in tumors with or without *IGF1R* overexpression.

Stimulatory and inhibitory transcription factors determine the level of *IGF1R* expression, and, consequently, the proliferative cell status. The *IGF1R* gene is controlled by a number of tumor suppressors, including p53, which is the most frequently mutated molecule in human cancer. P53 was able to suppress *IGF1R* promoter activity by approximately 90%, whereas its mutant forms were associated with *IGF1R* upregulation [31]. A specific germinative mutation (p.R337H) that affected the tetramerization domain of p53 has been identified in high frequency in Brazilian children with adrenocortical tumors [32, 33]. This unique p53 defect was detected in 22 of the 64 (34.3%) patients of the Brazilian cohort that was studied here (data not shown). Nevertheless, *IGF1R* overexpression and gene amplification were not associated with the presence of this p53 mutation. In addition, the adrenocortical carcinoma with *IGF1R* amplification did not harbor the p.R337H mutation in blood or tumor tissue DNA (data not shown).

MicroRNA abnormalities are potential mechanisms that may be associated with *IGF1R* overexpression. Calin et al. [34] demonstrated that more than 50% of microRNA genes were located in cancer-associated genomic regions. In the present work, we demonstrated that the expression of miR-100 and 375 was decreased in benign and malignant adrenocortical tumors; however, no correlation was found between the selected microRNAs and *IGF1R* expression. miR-145 also did not correlate with *IGF1R* expression values. Our data

corroborate with those from previous studies that showed that miR-100 and 375 expression was decreased in adrenocortical tumors and could be tumor suppressor microRNAs [11, 35]. In addition, Doghman et al. [11] showed that miR-100 regulated the expression of *IGF1R* and mTOR signaling in adrenocortical cells by modulating the expression of key proteins involved in these pathways [11]. miR-375 is also downregulated in gastric cancers and hepatocellular carcinomas [15]. Previous studies in esophagus carcinoma cells showed that miR-375 has a tumor suppressor effect by inhibiting *IGF1R* [15]. Shi et al. [14] identified that IGF1R and its docking protein, the insulin receptor substrate-I, are targets of miR-145. miR-126 was overexpressed in benign and malignant adrenocortical tumors. This microRNA suppresses endothelial migration by targeting a set of genes in cancer cells that drive endothelial migration, by activating IGF1R, which is a promoter of endothelial migration, and inhibiting the endothelial MERTK receptor, which is a suppressor of endothelial migration [16].

In conclusion, we detected concurrent *IGF1R* gene copy number variation and *IGF1R* overexpression in a single functioning malignant adrenocortical tumor. This data suggests that the *IGF1R* overexpression, which is common in pediatric adrenocortical tumors, is not driven by increased gene copy number. In addition, *IGF1R* polymorphisms and the abnormal expression of the microRNAs miR-100, miR-145, miR-375, and miR-126 did not correlate with *IGF1R* overexpression in these tumors.

Conflict of Interests

The authors declare no duality of financial interest or direct or indirect conflict of interests on the part of any author of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant nos. 2008/51618-6 and 2010/09503-7 (to Tamaya Castro Ribeiro) and Brazilian Grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq no. 304678/2012 for Alexander Augusto Jorge and no. 302825/2011-8 to Ana Claudia Latronico).

References

- [1] F. M. Barlaskar and G. D. Hammer, "The molecular genetics of adrenocortical carcinoma," *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, vol. 8, no. 4, pp. 343–348, 2007.
- [2] R. Sandrini, R. C. Ribeiro, and L. DeLacerda, "Childhood adrenocortical tumors," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 82, no. 7, pp. 2027–2031, 1997.
- [3] A. C. Latronico and G. P. Chrousos, "Extensive personal, experience: adrenocortical tumors," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 82, no. 5, pp. 1317–1324, 1997.
- [4] C. Fottner, A. Hoefflich, E. Wolf, and M. M. Weber, "Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis," *Hormone and Metabolic Research*, vol. 36, no. 6, pp. 397–405, 2004.
- [5] H. Yu and T. Rohan, "Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 92, no. 18, pp. 1472–1489, 2000.
- [6] D. LeRoith and C. T. Roberts Jr., "The insulin-like growth factor system and cancer," *Cancer Letters*, vol. 195, no. 2, pp. 127–137, 2003.
- [7] P. D. Ryan and P. E. Goss, "The emerging role of the insulin-like growth factor pathway as a therapeutic target in cancer," *Oncologist*, vol. 13, no. 1, pp. 16–24, 2008.
- [8] Y. Xie, B. Skytting, G. Nilsson, B. Brodin, and O. Larsson, "Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in synovial sarcoma: association with an aggressive phenotype," *Cancer Research*, vol. 59, no. 15, pp. 3588–3591, 1999.
- [9] A. Ouban, P. Muraca, T. Yeatman, and D. Coppola, "Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas," *Human Pathology*, vol. 34, no. 8, pp. 803–808, 2003.
- [10] M. Q. Almeida, M. C. Frago, C. F. P. Lotfi et al., "Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 93, no. 9, pp. 3524–3531, 2008.
- [11] M. Doghman, A. El Wakil, B. Cardinaud et al., "Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by MicroRNA in childhood adrenocortical tumors," *Cancer Research*, vol. 70, no. 11, pp. 4666–4675, 2010.
- [12] J. P. Schouten, C. J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwiijnenburg, F. Diepvens, and G. Pals, "Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 12, article e57, 2002.
- [13] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [14] B. Shi, L. Sepp-Lorenzino, M. Prisco, P. Linsley, T. Deangelis, and R. Baserga, "Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 45, pp. 32582–32590, 2007.
- [15] K. L. Kong, D. L. W. Kwong, T. H. Chan et al., "MicroRNA-375 inhibits tumour growth and metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma through repressing insulin-like growth factor 1 receptor," *Gut*, vol. 61, no. 1, pp. 33–42, 2012.
- [16] N. Halberg, C. Alarcón, and S. F. Tavazoie, "microRNA regulation of cancer-endothelial interactions: vesicular microRNAs on the move," *The EMBO Journal*, vol. 31, no. 17, pp. 3509–3510, 2012.
- [17] H. Werner and C. T. Roberts Jr., "The IGF1 receptor gene: a molecular target for disrupted transcription factors," *Genes Chromosomes and Cancer*, vol. 36, no. 2, pp. 113–120, 2003.
- [18] H. Werner and D. LeRoith, "The role of the insulin-like growth factor system in human cancer," *Advances in Cancer Research*, vol. 68, pp. 184–223, 1996.
- [19] C. S. Mitsiades, N. S. Mitsiades, C. J. McMullan et al., "Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors," *Cancer Cell*, vol. 5, no. 3, pp. 221–230, 2004.
- [20] H. Werner and S. Maor, "The insulin-like growth factor-I receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action," *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 17, no. 6, pp. 236–242, 2006.

- [21] A. Grimberg and P. Cohen, "Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 183, no. 1, pp. 1–9, 2000.
- [22] C. Sell, M. Rubini, R. Rubin, J. P. Liu, A. Efstratiadis, and R. Baserga, "Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 23, pp. 11217–11221, 1993.
- [23] J. Zhang, J. M. Trent, and P. S. Meltzer, "Rapid isolation and characterization of amplified DNA by chromosome microdissection: identification of IGF1R amplification in malignant melanoma," *Oncogene*, vol. 8, no. 10, pp. 2827–2831, 1993.
- [24] A. Almeida, M. Muleris, B. Dutrillaux, and B. Malfoy, "The insulin-like growth factor I receptor gene is the target for the 15q26 amplicon in breast cancer," *Genes Chromosomes and Cancer*, vol. 11, no. 1, pp. 63–65, 1994.
- [25] G. Armengol, S. Knuutila, F. Lluís, G. Capellà, R. Miró, and M. R. Caballín, "DNA copy number changes and evaluation of MYC, IGF1R, and FES amplification in xenografts of pancreatic adenocarcinoma," *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 116, no. 2, pp. 133–141, 2000.
- [26] N. Sugimoto, I. Imoto, Y. Fukuda et al., "IQGAP1, a negative regulator of cell-cell adhesion, is upregulated by gene amplification at 15q26 in gastric cancer cell lines HSC39 and 40A," *Journal of Human Genetics*, vol. 46, no. 1, pp. 21–25, 2001.
- [27] J. A. Bridge, J. Liu, S. J. Qualman et al., "Genomic gains and losses are similar in genetic and histologic subsets of rhabdomyosarcoma, whereas amplification predominates in embryonal with anaplasia and alveolar subtypes," *Genes Chromosomes and Cancer*, vol. 33, no. 3, pp. 310–321, 2002.
- [28] R. Natrajan, J. S. Reis-Filho, S. E. Little et al., "Blastemal expression of type I insulin-like growth factor receptor in Wilms' tumors is driven by increased copy number and correlates with relapse," *Cancer Research*, vol. 66, no. 23, pp. 11148–11155, 2006.
- [29] C. Tarn, L. Rink, E. Merkel et al., "Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 24, pp. 8387–8392, 2008.
- [30] A. A. Samani, S. Yakar, D. LeRoith, and P. Brodt, "The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights," *Endocrine Reviews*, vol. 28, no. 1, pp. 20–47, 2007.
- [31] H. Werner, E. Karnieli, F. J. Rauscher III, and D. LeRoith, "Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 16, pp. 8318–8323, 1996.
- [32] R. C. Ribeiro, F. Sandrini, B. Figueiredo et al., "An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 16, pp. 9330–9335, 2001.
- [33] A. C. Latronico, E. M. Pinto, S. Domenice 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," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 86, no. 10, pp. 4970–4973, 2001.
- [34] G. A. Calin, C. Sevignani, C. D. Dumitru et al., "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 9, pp. 2999–3004, 2004.
- [35] Z. Tombol, P. M. Szabo, V. Molnar et al., "Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 16, no. 3, pp. 895–906, 2009.

8 REFERÊNCIAS

1. Abecassis M, McLoughlin MJ, Langer B, Kudlow JE. Serendipitous adrenal masses: prevalence, significance, and management. *Am J Surg* 1985 Jun;149(6):783-8.
 2. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* 2000 Feb 15;88(4):711-36.
 3. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Jul;82(7):2027-31.
 4. Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 May;82(5):1317-24.
 5. Thompson GB, Young WF, Jr. Adrenal incidentaloma. *Curr Opin Oncol* 2003 Jan;15(1):84-90.
 6. Young WF, Jr. Management approaches to adrenal incidentalomas. A view from Rochester, Minnesota. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000 Mar;29(1):159-85, x.
 7. Ng L, Libertino JM. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol* 2003 Jan;169(1):5-11.
 8. Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CA, Saldanha LB, Latronico AC, Zerbini C, et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol* 1995 Dec;154(6):2004-9.
 9. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol* 1984 Mar;8(3):163-9.
 10. Wieneke JA, Thompson LD, Heffess CS. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol* 2003 Jul;27(7):867-81.
 11. Macfarlane DA. Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. *Ann R Coll Surg Engl* 1958 Sep;23(3):155-86.
 12. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. Adrenal cortical carcinoma. *J Urol* 1978 Dec;120(6):660-5.
 13. Tauchmanova L, Colao A, Marzano LA, Sparano L, Camera L, Rossi A, et al. Adrenocortical carcinomas: twelve-year prospective experience. *World J Surg* 2004 Sep;28(9):896-903.
-

14. Fassnacht M, Allolio B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*2009 Apr;23(2):273-89.
 15. Lerario AM, Moraitis A, Hammer GD. Genetics and epigenetics of adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol*2014 Apr 5;386(1-2):67-84.
 16. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*1995 Feb;16(1):3-34.
 17. Werner H, Roberts CT, Jr. The IGF1 receptor gene: a molecular target for disrupted transcription factors. *Genes Chromosomes Cancer*2003 Feb;36(2):113-20.
 18. Fottner C, Hoeflich A, Wolf E, Weber MM. Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis. *Horm Metab Res*2004 Jun;36(6):397-405.
 19. Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res*2008 Oct 15;14(20):6364-70.
 20. Werner H, Bruchim I. The insulin-like growth factor-I receptor as an oncogene. *Arch Physiol Biochem*2009 May;115(2):58-71.
 21. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev*2007 Feb;28(1):20-47.
 22. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst*2000 Sep 20;92(18):1472-89.
 23. Baserga R, Rubin R. Cell cycle and growth control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*1993;3(1):47-61.
 24. Ilvesmaki V, Kahri AI, Miettinen PJ, Voutilainen R. Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*1993 Sep;77(3):852-8.
 25. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science*1998 Jan 23;279(5350):563-6.
 26. Voutilainen R, Miller WL. Developmental and hormonal regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and steroidogenic enzymes in human fetal adrenals and gonads. *DNA*1988 Jan-Feb;7(1):9-15.
-

27. Weber MM, Kiess W, Beikler T, Simmler P, Reichel M, Adelman B, et al. Identification and characterization of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II/mannose-6-phosphate (IGF-II/M6P) receptors in bovine adrenal cells. *Eur J Endocrinol*1994 Mar;130(3):265-70.
 28. Weber MM, Simmler P, Fottner C, Engelhardt D. Insulin-like growth factor II (IGF-II) is more potent than IGF-I in stimulating cortisol secretion from cultured bovine adrenocortical cells: interaction with the IGF-I receptor and IGF-binding proteins. *Endocrinology*1995 Sep;136(9):3714-20.
 29. Fottner C, Engelhardt D, Weber MM. Regulation of steroidogenesis by insulin-like growth factors (IGFs) in adult human adrenocortical cells: IGF-I and, more potently, IGF-II preferentially enhance androgen biosynthesis through interaction with the IGF-I receptor and IGF-binding proteins. *J Endocrinol*1998 Sep;158(3):409-17.
 30. Ryan PD, Goss PE. The emerging role of the insulin-like growth factor pathway as a therapeutic target in cancer. *Oncologist*2008 Jan;13(1):16-24.
 31. Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci*2000 Jul;57(7):1050-93.
 32. De Meyts P, Wallach B, Christoffersen CT, Urso B, Gronskov K, Latus LJ, et al. The insulin-like growth factor-I receptor. Structure, ligand-binding mechanism and signal transduction. *Horm Res*1994;42(4-5):152-69.
 33. Butler AA, Yakar S, Gewolb IH, Karas M, Okubo Y, LeRoith D. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*1998 Sep;121(1):19-26.
 34. Abbott AM, Bueno R, Pedrini MT, Murray JM, Smith RJ. Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J Biol Chem*1992 May 25;267(15):10759-63.
 35. Werner H, Hernandez-Sanchez C, Karnieli E, Leroith D. The regulation of IGF-I receptor gene expression. *Int J Biochem Cell Biol*1995 Oct;27(10):987-94.
 36. Riedemann J, Macaulay VM. IGF1R signalling and its inhibition. *Endocr Relat Cancer*2006 Dec;13 Suppl 1:S33-43.
 37. Girnita L, Worrall C, Takahashi SI, Seregard S, Girnita A. Something old, something new and something borrowed: emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) signaling regulation. *Cell Mol Life Sci*2013 Nov 26.
-

38. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*1993 Oct 8;75(1):59-72.
 39. Seccareccia E, Brodt P. The role of the insulin-like growth factor-I receptor in malignancy: an update. *Growth Horm IGF Res*2012 Dec;22(6):193-9.
 40. Werner H, LeRoith D. The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. *Adv Cancer Res*1996;68:183-223.
 41. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Akiyama M, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell*2004 Mar;5(3):221-30.
 42. Leboulleux S, Gaston V, Boulle N, Le Bouc Y, Gicquel C. Loss of heterozygosity at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor locus: a frequent but late event in adrenocortical tumorigenesis. *Eur J Endocrinol*2001 Feb;144(2):163-8.
 43. Belfiore A. The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *Curr Pharm Des*2007;13(7):671-86.
 44. Sachdev D, Yee D. Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. *Mol Cancer Ther*2007 Jan;6(1):1-12.
 45. Sciacca L, Mineo R, Pandini G, Murabito A, Vigneri R, Belfiore A. In IGF-I receptor-deficient leiomyosarcoma cells autocrine IGF-II induces cell invasion and protection from apoptosis via the insulin receptor isoform A. *Oncogene*2002 Nov 28;21(54):8240-50.
 46. Nakae J, Kido Y, Accili D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev*2001 Dec;22(6):818-35.
 47. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev*1999 Dec;20(6):761-87.
 48. Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, et al. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*1996 Jun;28(6):619-37.
 49. Collett-Solberg PF, Cohen P. The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. *Endocrinol Metab Clin North Am*1996 Sep;25(3):591-614.
-

50. Bertherat J, Bertagna X. Pathogenesis of adrenocortical cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*2009 Apr;23(2):261-71.
 51. Fassnacht M, Libe R, Kroiss M, Allolio B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat Rev Endocrinol*2011 Mar 8.
 52. Ribeiro TC, Latronico AC. Insulin-like growth factor system on adrenocortical tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol*2012 Mar 31;351(1):96-100.
 53. DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*1991 Feb 22;64(4):849-59.
 54. Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E, Tycko B. Tumour-suppressor activity of H19 RNA. *Nature*1993 Oct 21;365(6448):764-7.
 55. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, et al. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*1995 Mar 15;9(6):650-62.
 56. Ferguson-Smith AC, Sasaki H, Cattanach BM, Surani MA. Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene. *Nature*1993 Apr 22;362(6422):751-5.
 57. Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, 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 Aug;82(8):2559-65.
 58. Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, Louvel A, Chapuis Y, Luton JP, et al. Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*1994 Apr;40(4):465-77.
 59. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, et al. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol*2003 Feb;162(2):521-31.
 60. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, 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 Mar;90(3):1819-29.
 61. 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 May;83(5):1713-20.

62. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, et al. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res*2001 Sep 15;61(18):6762-7.

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

64. West AN, Neale GA, Pounds S, Figueredo BC, Rodriguez Galindo C, Pianovski MA, et al. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res*2007 Jan 15;67(2):600-8.

65. Wolf E, Hoeflich A, Lahm H. What is the function of IGF-II in postnatal life? Answers from transgenic mouse models. *Growth Horm IGF Res*1998 Jun;8(3):185-93.

66. Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med*1999 Dec;5(12):1390-5.

67. Horney MJ, Shirley DW, Kurtz DT, Rosenzweig SA. Elevated glucose increases mesangial cell sensitivity to insulin-like growth factor I. *Am J Physiol*1998 Jun;274(6 Pt 2):F1045-53.

68. Sookoian S, Gianotti TF, Gemma C, Burgueno AL, Pirola CJ. Role of genetic variation in insulin-like growth factor 1 receptor on insulin resistance and arterial hypertension. *J Hypertens*2010 Jun;28(6):1194-202.

69. Rosenzweig SA, Atreya HS. Defining the pathway to insulin-like growth factor system targeting in cancer. *Biochem Pharmacol*2010 Oct 15;80(8):1115-24.

70. Sell C, Rubini M, Rubin R, Liu JP, Efstratiadis A, Baserga R. Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*1993 Dec 1;90(23):11217-21.

71. Kanter-Lewensohn L, Dricu A, Girnita L, Wejde J, Larsson O. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and p27Kip1 in melanocytic tumors: a potential regulatory role of IGF-1 pathway in distribution of p27Kip1 between different cyclins. *Growth Factors*2000;17(3):193-202.

72. Weber MM, Fottner C, Liu SB, Jung MC, Engelhardt D, Baretton GB. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human colon carcinomas. *Cancer* 2002 Nov 15;95(10):2086-95.
 73. Bergmann U, Funatomi H, Yokoyama M, Beger HG, Korc M. Insulin-like growth factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles. *Cancer Res* 1995 May 15;55(10):2007-11.
 74. Hellowell GO, Turner GD, Davies DR, Poulson R, Brewster SF, Macaulay VM. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res* 2002 May 15;62(10):2942-50.
 75. 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 Mar;136(3):296-303.
 76. 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 Jan;138(1):83-91.
 77. Doghman M, Wakil AE, Cardinaud B, Thomas E, Wang J, Zhao W, et al. Regulation of Insulin-like Growth Factor-Mammalian Target of Rapamycin Signaling by MicroRNA in Childhood Adrenocortical Tumors. *Cancer Res* 2010 Jun 1;70(11):4666-75.
 78. O'Gorman DB, Weiss J, Hettiaratchi A, Firth SM, Scott CD. Insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor overexpression reduces growth of choriocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Endocrinology* 2002 Nov;143(11):4287-94.
 79. Shen W, Xian J, Hu WL, Liu J. [Effect of insulin-like growth factor and its receptor-I antibody on growth of human adrenocortical carcinoma SW-13 cell lines in vitro]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007 Jan;27(1):88-91.
 80. Barlaskar FM, Spalding AC, Heaton JH, Kuick R, Kim AC, Thomas DG, et al. Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 Jan;94(1):204-12.
 81. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009 Feb 20;136(4):642-55.
 82. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
-

83. Dogini DB, Pascoal VD, Avansini SH, Vieira AS, Pereira TC, Lopes-Cendes I. The new world of RNAs. *Genet Mol Biol*2014 Mar;37(1 Suppl):285-93.
 84. Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*2009 Jan 22;457(7228):405-12.
 85. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*1993 Dec 3;75(5):843-54.
 86. Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys*2013;42:217-39.
 87. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*2008 Feb;9(2):102-14.
 88. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*2001 Oct 26;294(5543):853-8.
 89. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*2007 Jan;8(1):23-36.
 90. Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf JH. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle*2006 Sep;5(18):2103-9.
 91. Mak J. RNA interference: more than a research tool in the vertebrates' adaptive immunity. *Retrovirology*2005;2:35.
 92. Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature*2012 Feb 16;482(7385):347-55.
 93. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol*2009 Dec 1;27(34):5848-56.
 94. Ferracin M, Veronese A, Negrini M. Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*2010 Apr;10(3):297-308.
 95. Xiao YF, Yong X, Fan YH, Lu MH, Yang SM, Hu CJ. microRNA detection in feces, sputum, pleural effusion and urine: novel tools for cancer screening (Review). *Oncol Rep*2013 Aug;30(2):535-44.
 96. Calin GA, Croce CM. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene*2006 Oct 9;25(46):6202-10.
-

97. Tombol Z, Szabo PM, Molnar V, Wiener Z, Tolgyesi G, Horanyi J, et al. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer* 2009 Sep;16(3):895-906.
 98. Soon PS, Tacon LJ, Gill AJ, Bambach CP, Sywak MS, Campbell PR, et al. miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin Cancer Res* 2009 Dec 15;15(24):7684-92.
 99. Soon PS, Gill AJ, Benn DE, Clarkson A, Robinson BG, McDonald KL, et al. Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocr Relat Cancer* 2009 Jun;16(2):573-83.
 100. Patterson EE, Holloway AK, Weng J, Fojo T, Kebebew E. MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer* 2011 Apr 15;117(8):1630-9.
 101. Singh P, Soon PS, Feige JJ, Chabre O, Zhao JT, Cherradi N, et al. Dysregulation of microRNAs in adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2012 Mar 31;351(1):118-28.
 102. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, et al. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* 1990 Sep 1;50(17):5488-96.
 103. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8.
 104. 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 Jun;39(6):741-8.
 105. Werner H, Maor S. The insulin-like growth factor-I receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action. *Trends Endocrinol Metab* 2006 Aug;17(6):236-42.
 106. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2004 Jul;4(7):505-18.
 107. Ribeiro TC, Jorge AA, Almeida MQ, Mariani BM, Nishi MY, Mendonca BB, et al. Amplification of the insulin-like growth factor 1 receptor gene is a rare event in adrenocortical adenocarcinomas: searching for potential mechanisms of overexpression. *Biomed Res Int* 2014;2014:936031.
-

108. Yavari K, Taghikhani M, Ghannadi Maragheh M, Mesbah-Namin SA, Babaei MH. Downregulation of IGF-IR expression by RNAi inhibits proliferation and enhances chemosensitization of human colon cancer cells. *Int J Colorectal Dis*2010 Jan;25(1):9-16.
109. Dong AQ, Kong MJ, Ma ZY, Qian JF, Xu XH. Down-regulation of IGF-IR using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits growth of human lung cancer cell line A549 in vitro and in nude mice. *Cell Biol Int*2007 May;31(5):500-7.
110. Cosaceanu D, Carapancea M, Alexandru O, Budiu R, Martinsson HS, Starborg M, et al. Comparison of three approaches for inhibiting insulin-like growth factor I receptor and their effects on NSCLC cell lines in vitro. *Growth Factors*2007 Feb;25(1):1-8.
111. Niu J, Xu Z, Li XN, Han Z. siRNA-mediated type 1 insulin-like growth factor receptor silencing induces chemosensitization of a human liver cancer cell line with mutant P53. *Cell Biol Int*2007 Feb;31(2):156-64.
112. Shu S, Li X, Yang Y, Zhang Y, Li T, Liang C, et al. Inhibitory effect of siRNA targeting IGF-1R on endometrial carcinoma. *Int Immunopharmacol*2011 Feb;11(2):244-9.
113. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*2004 Mar 2;101(9):2999-3004.
114. Kong KL, Kwong DL, Chan TH, Law SY, Chen L, Li Y, et al. MicroRNA-375 inhibits tumour growth and metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma through repressing insulin-like growth factor 1 receptor. *Gut*2012 Jan;61(1):33-42.
115. Shi B, Sepp-Lorenzino L, Prisco M, Linsley P, deAngelis T, Baserga R. Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells. *J Biol Chem*2007 Nov 9;282(45):32582-90.
116. La Rocca G, Shi B, Badin M, De Angelis T, Sepp-Lorenzino L, Baserga R. Growth inhibition by microRNAs that target the insulin receptor substrate-1. *Cell Cycle*2009 Jul 15;8(14):2255-9.
117. Halberg N, Alarcon C, Tavazoie SF. microRNA regulation of cancer-endothelial interactions: vesicular microRNAs on the move. *EMBO J*2012 Aug 29;31(17):3509-10.
-

118. Sehat B, Tofigh A, Lin Y, Trocme E, Liljedahl U, Lagergren J, et al. SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor. *Sci Signal* 2010;3(108):ra10.
119. Aleksic T, Chitnis MM, Perestenko OV, Gao S, Thomas PH, Turner GD, et al. Type 1 insulin-like growth factor receptor translocates to the nucleus of human tumor cells. *Cancer Res* 2010 Aug 15;70(16):6412-9.
120. Warsito D, Sjostrom S, Andersson S, Larsson O, Sehat B. Nuclear IGF1R is a transcriptional co-activator of LEF1/TCF. *EMBO Rep* 2012 Mar;13(3):244-50.
121. Yan D, Wiesmann M, Rohan M, Chan V, Jefferson AB, Guo L, et al. Elevated expression of axin2 and hnk4 mRNA provides evidence that Wnt/beta -catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Dec 18;98(26):14973-8.
122. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999 Apr 1;398(6726):422-6.
-