

# **TERAPÊUTICA COM INIBIDORES DO RECETOR IGF1R NO CARCINOMA ADRENOCORTICAL**

**Rita de Almeida Ganhoto**

Estudante do 6ºano do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da  
Universidade de Coimbra

**Endereço:**

ritayavnoto@gmail.com

Trabalho realizado sob orientação de:

**Dr.<sup>a</sup> Isabel Paiva**

Assistente Graduada do Serviço de Endocrinologia do Centro Hospitalar e Universitário de  
Coimbra

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Manuela Rebelo Carvalheiro**

Diretora do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo do Centro Hospitalar e  
Universitário de Coimbra e Regente da Cadeira da Unidade Curricular de Patologia II do  
Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

## Índice

Índice	2
Índice de Figuras	5
Glossário de Abreviaturas	6
Abstract	10
Resumo	11
1. Introdução	12
2. Patogénese Molecular	14
2.1 Genes do Controlo do Ciclo Celular	15
2.1.1 Genes Ciclinas, Cinase e Topoisomerasas	16
2.1.2 Genes de Fatores de Crescimento	18
2.1.2.1 <i>Insulin-like Growth Factor 2, IGF2</i>	18
2.1.2.2 <i>Fibroblast Growth Factor, FGF</i>	20
2.1.2.3 <i>Transforming Growth Factor <math>\alpha</math>, TGF<math>\alpha</math></i>	20
2.1.2.4 <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math>, TGF<math>\beta</math></i>	21
2.1.2.5 <i>Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF</i>	21
2.1.3 <i>TP53</i>	22
2.2 Genes Reguladores da Esteroidogénese	24
2.2.1 <i>MC2R</i>	25
2.2.2 Genes de Enzimas da Esteroidogénese	26
2.3 Vias de Sinalização Intracelular	26
2.3.1 Via da ACTH-cAMP-PKA	27
2.3.3 Via do Ácido Retinoico	28
2.3.4 Via do Complemento e Apresentação Antigénica	29

2.4 Instabilidade Cromossômica	29
3. Sistema IGF	30
3.1 Componentes e Definição	30
3.1.1 Ligandos: IGF1 e IGF2	31
3.1.2 Recetores: IGF1R, IGF2R e IR	31
3.1.3 IGF <i>Binding Proteins</i>	33
3.2 Atividade Biológica	33
3.2.1 Vias de Sinalização Intracelular	34
3.2.2 IGFs e o Ciclo Celular	35
4. Sistema IGF e a Glândula Adrenal	36
5. Sistema IGF e Cancro	37
5.1 Patogénese Molecular	38
5.2 Progressão Tumoral	39
5.2.1 Angiogénese e Linfangiogénese	39
5.2.2 Invasão Tumoral	41
5.2.3 Metastização	42
5.3 Papel na Resistência à Terapia Oncológica Convencional	43
6. Sistema IGF e o Carcinoma Adrenocortical	45
6.1 Hiper-expressão de Gene <i>IGF2</i>	46
6.2 Hiper-secreção da IGFBP2	46
6.3 Hiper-expressão do IGF1R e Hipo-expressão do IGF2R	47
6.4 Produção de IGF1	48
6.5 Papel na Resistência à Terapia Oncológica Convencional	48
7. Terapia Dirigida ao Sistema IGF	49
7.1 Principais Mecanismos de Ação	49

7.1.1 Anticorpos Anti-IGF1R	50
7.1.2 Inibidores Tirosina Cinase	51
7.2 Efeitos Adversos	52
8. Inibidores do Sistema IGF no Tratamento do Carcinoma Adrenocortical	53
9. Conclusão	55
10. Bibliografia	57

## **Índice de Figuras**

Figura 1 - Ciclo Celular. Adaptado a partir de Regateiro, FJ (2002).	16
Figura 2 - Resumo das alterações moleculares no ACC.	30
Figura 3 - Sumário da atividade biológica dos IGFs. Adaptado a partir de Jacobs, CJ (2008).	36
Figura 4 - Atividade do sistema IGF na angiogénese e linfangiogénese.	41
Figura 5 - Papel do sistema IGF na resistência à terapêutica oncológica.	45
Figura 6 - Revisão dos efeitos do sistema IGF nas células adrenocorticais normais e no ACC. Adaptado a partir de Fotter et al (2004).	49

## **Glossário de Abreviaturas**

*ACC - adrenocortical carcinoma*

*ACAVDL - acyl coenzyme-A dehydrogenase, very long chain gene*

*ACTH - adrenocorticotrope hormone*

*ADCC - antibody dependent celular toxicity*

*AKR1B1 - aldo-keto reductase family 1, member B1 gene*

*Akt - protein kinase B*

*ALDH1A1 - aldehyde dehydrogenase 1a1*

*ALDH1A3 - aldehyde dehydrogenase 3*

*ALOX15B - arachidonate 15-lipoxygenase, second type gene*

*AP-2 - transcription factor AP-2*

*APC - adenomatous polyposis coli gene*

*ATM - ataxia telangectasia mutated gene*

*BAX - BCL2-associated X protein*

*BRCA1 - breast cancer 1 gene*

*CCN A –F - cyclin A-F*

*CDC25B - cell division cycle 25 control homolog B*

*CDK 1-20 - cyclin-dependent kinase 1-20*

*CDKN1A - cyclin-dependent kinase inhibitor 1 A (p21, Cip1)*

*CDKN1C - cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*

*CYP11A - cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 gene*

*CYP21A2 - cytochrome P450, family 21, subfamily A, polypeptide 2 gene*

*CYP11B1 - cytochrome P450, family 11, subfamily B, plypeptide1 gene*

*DHEA - dehydroepiandrostenedione*

DNA - *deoxyribonucleic acid*

EF2 - *transcription factor 2*

EGF - *epidermal growth factor*

EGFR - *epidermal growth factor receptor*

EIF2B1 - *eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha, 26kDa*

FGF - *fibroblast growth factor*

GBR2 - *growth factor receptor-bound protein 2*

GH - *growth hormone*

GSK3 $\beta$  - *glycogen synthase kinase 3, subunit  $\beta$*

H19 - *imprinted maternally expressed transcript gene*

HIF1 $\alpha$  - *hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$*

HR - *hybrid receptors*

HSD3B1 - *hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 gene*

HSD3B2 - *hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3-beta and steroid delta-isomerase 2 gene*

IGF - *insulin-like growth factor*

IGFBP 1-6 - *IGF binding proteins 1-6*

IGF2 - *insulin-like growth factor 2*

IGF1 - *insulin-like growth factor 1*

IGF1R - *insulin-like growth factor 1 receptor*

IGF2R - *insulin-like growth factor 2 receptor*

IR - *insulin receptor*

IRA - *insulin receptor isomer A*

IRB - *insulin receptor isomer B*

IRS 1-6 - *insulin receptor substract 1-6*

LOH - *loss of heterozygosity*

MAPK - *mitogen-activated protein kinase*

MC2R – *melanocortin 2 receptor*

MDM2 – *Mdm2 p53 binding protein homolog*

MDR1 - *ATP-binding cassette, subfamily B, member 1 gene; ABCB1 gene*

MEN1- *multiple endocrine neoplasia 1 gene*

MHCII – *major complex histocompatibility*

MMPs - *matrix metalloproteinases*

M6PR - *mannose 6-phospate receptors*

PI3K - *phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate kinase*

PIGF - *placental growth factor*

PKA – *protein kinase A*

PPRAR $\gamma$  - *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*

PRKAR1A – *cAMP-dependent protein kinase type 1  $\alpha$  regulatory subunit*

PTEN - *phosphatase and tensine homolog*

RAR - *retinoic acid receptor*

mRNA – *messenger RNA*

RXR - *retinoic X receptor*

RXRA - *retinoic X receptor  $\alpha$*

RPS6KB2 - *ribossomal protein S6 kinase, 70kDa, polypetide 2*

sCLU - *secretory clusterins*

SOD – *superoxide dismutase gene*

TGF $\alpha$  - *transforming growth factor  $\alpha$*

TGF $\beta$  - *transforming growth factor  $\beta$*



*TGF $\beta$ R1 – tumor growth factor receptor  $\beta$  1*

*TOP2A - topoisomerase II  $\alpha$*

*TP53 – tumor protein p53 gene*

*UBC - ubiquitin C*

*uPA - urokinase-type plasminogen activator*

*uPAR - urokinase-type plasminogen activator receptor*

*VEGF – vascular endothelial growth factor*

*XPO1 –exportin 1*

*WT1 – Wilm’s tumor 1 gene*

*3- $\beta$ -HSD - 3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase*

**Abstract:**

The adrenocortical carcinoma is a rare and aggressive malignancy. Most patients present at diagnosis an advanced stage disease and the therapeutics arsenal is frequently inefficient in controlling the tumour's progression. The overall 5year survival remains under 50% whereas its therapeutic management has not been updated for the last 20years. Radical surgical resection of the lesion followed by adjuvant mitotane remains the main treatment for these cases. Chemotherapy and radiotherapy have recently been introduced in the field with sparse success. Recent studies have shown that the IGF system, implicated in various tumours' progression and resistance to conventional cancer therapy, is altered in these tumours. These tumours present with a hyper-expression of the IGF2 and IGF1R, responsible for an over-activation of its pathway and consequently an increase in cell proliferation in prejudice of programmed cell death. This discovery has established the beginning of a new era in adrenocortical carcinoma's management by introducing a target therapy already seen in other tumours. The IGF1R is the main target of this new generation of drugs for which pre-clinical trails have already taken place with positive results. The aim of this study is to make a revision of adrenocortical carcinoma's molecular pathogenesis, to summarise recent discoveries concerning the IGF system and adrenal carcinogenesis and to present a new category of therapeutic drug candidates, the IGF1R inhibitors.

Keywords: Adrenocortical carcinoma, Adrenocortical carcinoma's treatment, IGF system, IGF1R target therapy

**Resumo:**

O carcinoma adrenocortical é uma neoplasia rara e agressiva. Na grande maioria dos casos a doença encontra-se, no momento do diagnóstico, num estadio avançado, sendo o arsenal terapêutico frequentemente insuficiente no controlo da progressão tumoral. A sobrevida aos 5anos mantém-se inferior a 50% enquanto o plano terapêutico para estes doentes não sofre alterações há cerca de 20anos. A ressecção cirúrgica seguida de terapia adjuvante com mitotano permanece o tratamento de primeira linha. A quimio e a radioterapia foram recentemente introduzidos sem que apresentem grande sucesso. Estudos recentes identificaram alterações no sistema IGF nestes tumores. Este sistema está já implicado na progressão tumoral e resistências à terapia oncológica convencional em diversos tumores. No ACC, verifica-se uma híper-expressão do gene *IGF2* e do recetor IGF1R responsáveis por uma superactivação desta via de sinalização, privilegiando a divisão celular em detrimento da morte celular programada. Esta descoberta marcou o início de uma nova era no tratamento do ACC ao introduzir a terapia dirigida ao sistema IGF já utilizada noutros tumores. O IGF1R é o alvo principal desta nova geração de fármacos sendo que os primeiros ensaios pré-clínicos mostraram resultados positivos. O objetivo deste artigo é rever os mecanismos moleculares subjacentes à patogénese molecular do carcinoma adrenocortical, explorar o papel do na carcinogénese adrenocortical e apresentar uma nova categoria de fármacos candidatos ao tratamento desta neoplasia, os inibidores do IGF1R.

Palavras-Chave: Carcinoma adrenocortical, Tratamento do carcinoma adrenocortical, Sistema IGF, Inibidores do IGF1R

## 1. Introdução

O carcinoma adrenocortical (ACC) é uma das neoplasias mais raras e a segunda mais agressiva no domínio dos tumores endócrinos [8]. Atinge entre 0,5 a 2 pessoas por milhão [3,5,8,9,35,37,43] e apresenta uma distribuição bimodal, afetando preferencialmente crianças com idades inferiores a cinco anos e adultos na sua 4ª e 5ª décadas de vida [16,34,36,46,77]. A incidência no sexo feminino é ligeiramente superior à do sexo masculino com um rácio de 1,5 [16,36,43,77].

O tratamento de eleição neste tipo de tumores é a ressecção cirúrgica completa da lesão [43]. Contudo, a maioria dos casos apresenta, no momento do diagnóstico, uma forma avançada da doença, comprometendo o sucesso do tratamento cirúrgico [7,27]. As taxas de recorrência rondam os 70-80% [8,77] sendo que o período livre de recorrências ronda os 25 meses [16].

A terapia adjuvante baseia-se na quimioterapia com mitotano em exclusivo ou em associação com outros agentes e na radioterapia [16,36,43,46,67,77]. O mitotano (M) é o fármaco de primeira linha no controlo da hipersecreção adrenal. No ACC, atua reduzindo a produção de corticosteroides e estimulando a produção de radicais livres de oxigénio, sendo estes responsáveis pela sua atividade citolítica. A sua utilização acompanha-se de um aumento da sobrevida e do período livre de recorrências [67,70]. Dois esquemas terapêuticos citotóxicos estão atualmente em estudo ([WWW.FIRM-ACT.ORG](http://WWW.FIRM-ACT.ORG)) envolvendo a administração de mitotano em associação com etoposido (E), doxorrubicina (D) e cisplatina (C) [5] ou com streptozotocina (S) [33]. De uma forma geral o ACC é resistente à quimioterapia, sendo que os primeiros resultados obtidos para o esquema EDCM e SM rondam os 49% e 36% de respostas positivas [5,33], respetivamente, com redução da massa tumoral e aumento da sobrevida e do período livre de doença. O papel da radioterapia no tratamento do ACC está ainda longe de consenso. Durante anos aceitou-se que estes tumores não respondiam ao

tratamento por irradiação, sendo a sua utilização limitada ao tratamento paliativo. Contudo, estudos recentes contrariam esta tendência, mostrando uma resposta positiva com redução do risco de recorrência local após radioterapia [48,56].

Apesar do esforço aplicado no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para o ACC, a sobrevida destes doentes mantém-se inferior aos 35% aos cinco anos [6,45,52] e o plano terapêutico não sofre atualizações há cerca de 20anos [45].

Em contraste com a estagnação no campo da terapêutica, observam-se grandes avanços na compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à carcinogénese adrenocortical. A identificação de genes, vias moleculares e alterações cromossómicas implicadas no desenvolvimento destes tumores traduz-se na possibilidade de desenvolver novos agentes terapêuticos. De entre as alterações encontradas destaca-se a hiperprodução de IGF2 nestes tumores. Cerca de 90% de ACC esporádicos apresenta uma híper-expressão do gene *IGF2* [6] comparativamente com as células adrenocorticais normais ou derivadas de adenomas adrenocorticais.

O papel do sistema IGF na carcinogénese de outros tumores é já amplamente reconhecido e a utilização de agentes terapêuticos dirigidos contra este sistema, nos mesmos, mostra resultados positivos. As recentes descobertas tornaram o sistema IGF no principal alvo de ensaios terapêuticos procurando aplicar agentes modeladores da sua atividade no tratamento do carcinoma adrenocortical. Os primeiros resultados de estudos pré-clínicos são otimistas, mostrando uma redução da proliferação tumoral e regressão da massa tumoral.

Com este trabalho pretende-se uma revisão dos mecanismos moleculares subjacentes à carcinogénese corticoadrenal, uma exploração do papel do sistema IGF na carcinogénese em geral e no carcinoma adrenocortical bem como apresentar os inibidores da atividade deste sistema como futuros agentes terapêuticos.

## 2. Patogénese Molecular

Da compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento de tumores poderá resultar um aumento da sobrevivência dos indivíduos por eles afetados. A identificação de genes, vias de sinalização e alterações cromossômicas implicadas na patogénese tumoral têm impacto não só na precisão do diagnóstico, como também na definição de estratégias terapêuticas mais eficazes, contribuindo para uma melhoria do prognóstico da patologia a que se reportam.

Os avanços na compreensão dos mecanismos moleculares implicados na patogénese do ACC devem-se em grande parte à análise de famílias com uma predisposição para o seu desenvolvimento. A presença de mutações genéticas consistentes nos indivíduos afetados marcou o ponto de partida no estudo dos tumores adrenocorticais esporádicos. Síndromas como o de Li-Fraumeni, MEN tipo 1, Polipose Adenomatosa Familiar, o Síndrome de Beckwith-Wiedmann ou de Carney estão na base dos novos conhecimentos adquiridos relativos à fisiopatogenia do ACC. As mutações dos genes *TP53*, *MEN1*, *APC*, *IFG2* e *PRKARIA* encontrados em cada um das síndromes, respetivamente, surgem igualmente implicadas no desenvolvimento de tumores esporádicos [6,7,34,46,60,62,65,79].

De uma forma genérica podemos reunir as alterações moleculares encontradas no ACC em três grandes grupos: alterações genéticas, envolvendo genes reguladores do ciclo celular e os genes reguladores da esteroidogénese; alterações nas vias de sinalização intracelular e as alterações cromossômicas.

## 2.1 Genes do controlo do ciclo celular

Neste grupo encontram-se os genes estimuladores da proliferação celular - os proto-oncogenes - e os genes inibidores da proliferação celular - os genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes estão implicados nos processos de crescimento, diferenciação e proliferação celular normais, codificando fatores de crescimento, recetores membranares e proteínas ligantes do DNA. Os genes supressores tumorais são responsáveis por garantir a constância das características celulares ao longo das várias gerações. Estes genes têm a capacidade de “sentir” o meio intra e extracelular, detetar alterações no mesmo, e coordenadamente alterar a progressão do ciclo celular, inibindo-o.

A transformação neoplásica implica a perda das duas cópias de genes supressores tumorais numa célula (fenótipo mutante recessivo) ou a expressão de um oncogene (fenótipo mutante dominante). O oncogene resulta da mutação de um proto-oncogene, com a sua consequente hiperactivação ou híper-expressão promovendo a proliferação celular [1].

Estudos envolvendo carcinomas adrenocorticais identificaram mutações em ambos os grupos de genes. No grupo dos oncogenes destacam-se as mutações em genes codificadores de ciclinas, cinases, topoisomerasas e de diversas famílias de fatores de crescimento (IGF2, *insulin-like growth factor 2*, FGF, *fibroblast growth factor*, TGF $\alpha$ , *transforming growth factor  $\alpha$* , TGF $\beta$ , *transforming growth factor  $\beta$* , VEGF, *vascular endothelial growth factor*). De entre os genes supressores tumorais distingue-se o gene *TP53*, mutado em 25-35% dos casos esporádicos e em 70% dos casos de Síndrome de Li-Fraumeni [6,7,62].

### 2.1.1 Genes de ciclinas, cinases e topoisomerasas

O ciclo celular compõe-se de quatro fases, G1, S, G2 e M, e dois *check-points* principais (*check-point G1* e *check-point G2*). A fase G1 corresponde a um período de crescimento celular, a fase S ao momento da replicação do DNA, a fase G2 permite um novo período de crescimento antes da divisão celular propriamente dita, a fase M. Entre a fase G1 e a fase S encontra-se o primeiro *check-point* do ciclo celular, *check-point G1*, momento que determina se a célula prosseguirá ou não para a fase S. Células apresentando lesões no DNA ou cujo meio extracelular não é favorável à proliferação celular, não transitarão para a fase S. O segundo *check-point*, *check-point G2*, surge entre a fase G2 e a fase M. Novamente apenas as células aptas para terminar o ciclo transitarão para a fase M. Caso fiquem retidas num dos *check-points* as células poderão: reparar as suas lesões no DNA e prosseguir no ciclo celular; ativar as vias da apoptose e sofrer morte celular programada; entrar em senescência celular; ou entrar num estado especializado designado de G0. Em G0 a célula fica retida numa das fases do ciclo, sendo sua velocidade de síntese proteica muito reduzida, e podendo permanecer nesse estado durante semanas ou anos até novo estímulo para conclusão do ciclo.

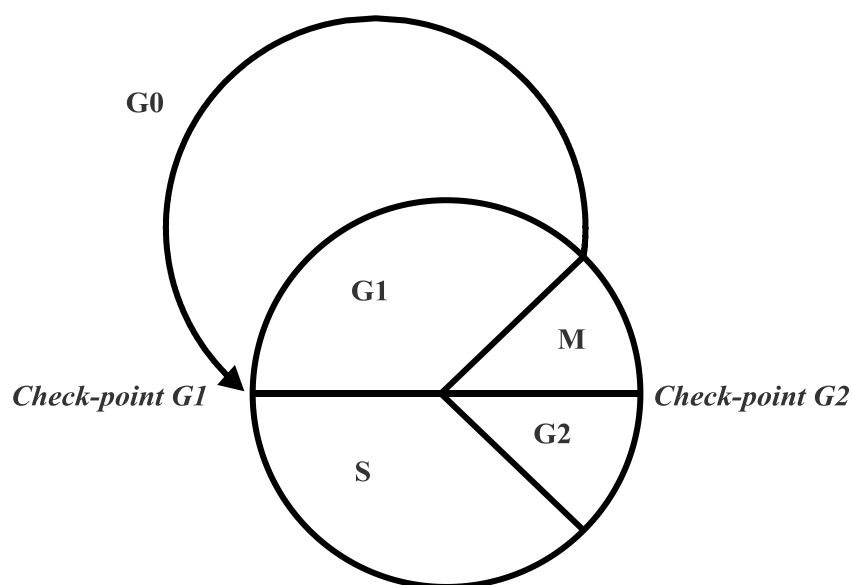


Fig. 1 - Ciclo Celular. Adaptado a partir de Regateiro, FJ (2002).



A transição entre as várias fases é feita graças a variações cíclicas de proteínas que interagem entre si formando um complexo regulador do ciclo celular. Estas são as proteínas cinase dependentes das ciclinas, as CDKs 1 a 20, e as ciclinas, CCN A até F. A interação entre ambas resulta na fosforilação de resíduos de tirosina e serina de diversas proteínas intracelulares, intervenientes na progressão do ciclo celular. Durante todo o ciclo celular a concentração de CDKs mantém-se praticamente constante enquanto os valores para as ciclinas sofrem oscilações. Durante a fase G1 a concentração de ciclinas na célula aumenta de forma progressiva, sendo que após a transição para a fase S estas são degradadas implicando uma nova produção para que ocorra a transição para a fase M. Esta produção cíclica de ciclinas é função de fatores de crescimento existentes no meio extracelular e disponíveis para interagir com a célula [1,53].

Nas células tumorais existe uma desregulação deste complexo cinase-ciclina favorecendo a progressão no ciclo celular. Estudos recentes envolvendo células de ACC constataram a existência de alterações na expressão de genes envolvidos nas transições G1/S, *check-point* G1, e G2/M, *check-point* G2. Nestas células, durante a fase G1 e S há uma hiperexpressão dos genes *CCNE1* e *CCNE2* [25] e dos genes *CDK2* e *CDK4*, facilitando a transição para a fase G2. A fase G2 e M são marcadas por um aumento da expressão dos genes *CCNB1*[61], *CCNB2* [25], *CDK1*, *CDK7*, *CDC25B* (*cell division cycle 25 control homolog B*, uma fosfatase ativadora das CDKs), *TOP2A* (*topoisomerase II alpha*) [25,34,], proteína interveniente na replicação do DNA), o gene *UBC* (*ubiquitin C*) e *MDM2* (*mdm2 p53 binding protein homolog*) [52,79]. Estes dois últimos genes parecem estar implicados na inativação da p53. A proteína MDM2 é responsável pela ubiquitinação da p53 e sua consequente degradação pelo complexo da ubiquina. Zsippai et al (2011) demonstrou ainda um aumento na expressão da proteína exportina (gene *XPO1*), implicada na translocação citoplasmática da

TOP2A e na resistência a vários agentes de quimioterapia. Estas alterações são a favor da disfunção dos mecanismos reguladores do ciclo celular e em benefício da proliferação das células, que se verifica nos tumores adrenocorticais.

### 2.1.2 Genes de Fatores de Crescimento

Os fatores de crescimento atuam como reguladores do crescimento celular em organismos multicelulares. Têm uma produção autócrina ou parácrina e a sua ação é mediada por recetores membranares, sendo que apenas as células que os expressem à superfície serão alvo da sua ação. Da interação ligando-recetor resulta uma cascata de sinalização celular com consequente alteração do padrão de síntese proteica, cujo objetivo final é a progressão no ciclo celular. Existem vários tipos de fatores de crescimento, constituídos em famílias, sendo que alguns apresentam especificidade para os tecidos alvos e outros têm uma ação mais geral [1,53].

#### 2.1.2.1 *Insulin-like Growth Factor, IGF2*

O IGF2 comporta-se como um fator de crescimento estimulando a proliferação celular, por intermédio do recetor IGF1R. Embora a sua atividade predomine durante o período fetal, a sua produção mantém-se constante ao longo de toda a vida do indivíduo. O gene *IGF2* situa-se no cromossoma 11p15 estando sujeito a *imprinting* materno. Nesse mesmo locus localizam-se outros dois genes, o gene *H19* (*imprinted maternally expressed transcript*) e o gene *CDKN1C* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*), sendo que ambos são objeto de *imprinting* paterno. O gene *H19* não tem produto proteico, atuando apenas como regulador da transcrição do gene *IGF2*, sendo que na presença do RNA *H19* há uma redução da produção

de IGF2. A CDK1C é uma proteína inibidora das cinases responsáveis pela transição entre a fase G1 e fase S do ciclo celular, bloqueando-o. Devido ao *imprinting* parental apenas o alelo paterno do gene *IGF2* é expresso enquanto apenas os genes maternos do *H19* e *CDKN1C* são transcritos [6,18,21,22,23,24,54,62].

A síndrome de Beckwith-Wiedemann caracteriza-se por uma hiperprodução de IGF2 com o desenvolvimento de tumores durante a infância (tumor de Wilm's, hepatoblastoma, ACC, entre outros). As alterações genéticas subjacentes a esta síndrome envolvem os genes *IGF2*, *H19* e *CDK1C*. Três mecanismos estão envolvidos na gênese destes tumores: a perda de *imprinting* materno, uma duplicação do alelo paterno com perda do alelo materno (unidissomia parental paterna), e alterações epigenéticas [6,9,16,21] com bloqueio da transcrição do gene *H19*. Os dois primeiros são os mais frequentemente encontrados sendo que todos resultam num aumento da expressão do gene IGF2 com consequente estimulação do crescimento celular.

Estudos em linhas celulares de ACC concluíram que o gene *IGF2* é o gene mais hiper-expresso comparativamente com células adrenocorticais normais e de adenomas corticais [6,7,37]. Verificou-se ainda que nestes tumores a expressão do recetor IGF1R está também aumentada, por mecanismos ainda desconhecidos, bem como a proteína ligante dos IGFs, a IGBP2 [6,7,9]. Pensa-se que estas condições sejam favoráveis ao estabelecimento de estímulos autócrinos e parácrinos de crescimento e proliferação tumorais. Tais factos justificam a tentativa de utilização do IGF2 como marcador tumoral e de prognóstico nos casos de ACC.

### 2.1.2.2 *Fibroblast Growth Factor*, FGF

O FGF é uma família de fatores de crescimento capazes de estimular a proliferação de vários tipos celulares. A sua ação estende-se desde a angiogénese, ao processo de cicatrização e ao desenvolvimento embrionário. Conhecem-se pelo menos 22 membros desta família, FGF 1 a 22, para quatro recetores membranares, FGFR 1 a 4 [30,37].

Na glândula suprarrenal normal, as células adrenocorticais expressam o FGF1 e FGF2, que atuam nesse tecido como potentes agentes mitogénicos.

No ACC verifica-se que existe uma hiper-expressão dos recetores 1 e 4 do FGF [7,16,34,52]. Tal como para outras descobertas, o papel destas moléculas na tumorigénese adrenocortical ainda está por esclarecer. Ainda assim, crê-se que estes recetores participem na transformação tumoral pela sua ação na proliferação celular e da vascularização.

### 2.1.2.3 *Transforming Growth Factor $\alpha$* , TGF $\alpha$

O TGF $\alpha$  é uma subclasse da família TGF, independente do TGF $\beta$ . Ambas as subclasses estão implicadas na transformação tumoral por mecanismos envolvendo o controlo do ciclo celular.

No ACC, ainda que não se constate um aumento da expressão deste fator de crescimento, a sua ação mitogénica parece relacionar-se com uma hiperexpressão do recetor EGFR, *epidermal growth factor receptor* [7,16]. O EGFR surge hiperexpresso em cerca de 90% dos ACC ainda que o seu ligando, EGF, não apresente alterações na sua concentração. Pensa-se então que o TGF $\alpha$ , presente no ACC, atue via recetor do EGF promovendo a proliferação e o crescimento tumoral [7].

#### 2.1.2.4 *Transforming Growth Factor $\beta$* , TGF $\beta$

Tal como as restantes famílias de fatores de crescimento o TGF $\beta$  está igualmente envolvido no crescimento, proliferação e diferenciação celular.

As células corticoadrenais normais produzem o TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 2 responsáveis por modelar o crescimento celular de forma autócrina. Ainda que não tenham uma ação direta no controlo da esteroidogénese estes fatores são também capazes de regular a produção de hormonas através do seu papel no controlo da transcrição génica. Assim, ao inibir a transcrição de genes intervenientes na esteroidogénese, os TGF $\beta$  inibem-na [7].

No ACC, tanto o TGF $\beta$ 2 quanto o seu recetor TGF $\beta$ R1 surgem hiper-expressos comparativamente aos tumores benignos. Outros dois membros desta família, a activina e a inibina, mostraram ter um papel na carcinogénese corticoadrenal, desconhecendo-se ainda o mecanismo subjacente à sua ação.

Sabe-se que em ratinhos, a activina é responsável por regular o crescimento celular e a esteroidogénese, apresentando uma ação inibitória de ambos os processos. Está ainda implicada na estimulação da apoptose em células indiferenciadas do córtex (zona X). A inibina atua como antagonista da ação da activina competindo pelos seus recetores. Ela é ainda responsável por determinar a diferenciação das células adrenocorticais progenitoras em células produtoras de glucocorticoides ou esteroides sexuais [7].

#### 2.1.2.5 *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF

O VEGF é uma sub-família de fatores de crescimento, integrado na família *platelet-derived growth factor*. A sua ação é maioritariamente dirigida ao tecido vascular estimulando a angiogénese (produção de vasos a partir de vasos pré-existentes) e vasculogénese (produção

de vasos de novo). Conhecem-se pelo menos cinco elementos desta sub-família, os VEGFs de A a D e o PIGF (*placental growth factor*) [20,63].

No ACC, verifica-se que há um aumento da expressão de VEGFs relativamente aos tumores benignos. Contrariamente ao que seria esperado, estes tumores não são dos mais vascularizados tendo em conta a sua atividade angiogénica [16].

### 2.1.3 *TP53*

O gene supressor tumoral *TP53* localiza-se no cromossoma 17(17p13) codifica a proteína p53. Esta está implicada no controlo de diversas funções biológicas, como sejam o controlo do ciclo celular, apoptose, senescência, metabolismo do DNA, angiogénese, diferenciação celular e resposta imunitária. Mutações neste gene são identificadas em mais de 50% dos tumores independentemente da sua origem, tornando-o um dos principais alvos de estudo da biologia molecular.

No que respeita à sua atividade supressora tumoral, a p53 é capaz de prevenir a formação de tumores através de dois processos, a senescência celular e a apoptose celular. Esta proteína atua em resposta a *stresses* celulares, como sejam lesões no DNA; dependendo do tipo de *stress* a sua resposta levará a um bloqueio permanente do ciclo celular ou à morte celular programada, sendo que o mecanismo subjacente a esta seleção ainda não está completamente elucidado. A indução da apoptose celular resulta da interação da p53 com a região promotora do gene *BAX* regulando negativamente a sua transcrição. A proteína BAX é um dos membros da família Bcl-2, que ao formar heterodímeros com a Bcl-2 inibe a sua ação, inibindo consequentemente a apoptose. A senescência celular resulta da ação da p53 em dois momentos do ciclo celular, na transição G1/S e na transição G2/M.

A fase G1 do ciclo celular antecede a replicação do DNA, fase S, e serve para o crescimento da célula. A transição entre as duas fases é mediada pela ação de um complexo formado pelas cinases dependentes de ciclinas e ciclinas, que alteram a fosforilação de diversas proteínas intracelulares favorecendo a progressão do ciclo. A p53 é capaz de bloquear o ciclo celular durante este período graças à ativação da CDKN1A, uma proteína inibidora das cinases dependentes da ciclina, capaz de impedir a sua ação. Após a replicação do DNA, a célula dá entrada numa nova fase de crescimento e eventual reparação de erros, a fase G2, à qual se segue a divisão celular propriamente dita, a fase M. A p53 pode novamente bloquear o ciclo celular nesta fase por inibição direta da cinase CDK1. Este bloqueio permanente do ciclo celular corresponde à senescência celular, sendo as células posteriormente eliminadas por ação do sistema imunitário [1,53,64].

No ACC, tal como já referido, o gene *TP53* encontra-se mutado em cerca de 25-30% dos casos esporádicos [6]. Verifica-se ainda que estas alterações surgem maioritariamente em tumores de grandes dimensões e num estágio avançado, donde se conclui que ocorrem tardiamente na evolução tumoral apontando para um pior prognóstico destes casos. No entanto, estudos recentes envolvendo microssatélites, constataram que cerca de 85% dos casos de ACC apresentam alterações no cromossoma 17p13, evidenciando a presença de outros genes, intervenientes na patogénese do ACC, nessa mesma região. Os genes *ACAVDL* (*acyl coenzyme-A dehydrogenase, very long chain*) e *ALOX15B* (*arachidonate 15-lipoxygenase, second type*), são os principais candidatos uma vez que se localizam nesse mesmo cromossoma e surgem hipoexpressos em tumores corticoadrenais malignos comparativamente com tumores benignos [6,7,16,61].

## 2.2 Genes Reguladores da Esteroidogénese

A suprarrenal é a maior glândula do organismo sendo responsável pela produção de diversas hormonas essenciais á sobrevivência do individuo. Histologicamente é composta duas partes distintas, o córtex e a medula. A medula, porção central da glândula, é responsável pela produção de catecolaminas, epinefrina e norepinefrina, em resposta à estimulação simpática. Por seu turno, o córtex constituiu a porção externa da glândula e divide-se em três camadas fisiologicamente distintas. A camada mais externa, a zona glomerulosa, é responsável pela síntese de aldosterona, intervindo na regulação do equilíbrio hidroelectrolítico do organismo. A camada mais interna, a zona reticular, é o local de produção de esteroides sexuais (DHEA, *dehydroepiandrostenedione*) em resposta à estimulação pela hormona pituitária ACTH entre outras (por exemplo, a *Cortical Androgen-stimulating Hormone*). A zona fasciculada é a camada intermédia onde ocorre a produção de glucocorticoides (cortisol e cortisona) em resposta à ACTH.

A produção hormonal é maioritariamente controlada pela hormona ACTH libertada pela glândula pituitária. Ao interagir com o seu recetor, presente nas células adrenocorticais, a ACTH ativa a via cAMP-PKA com conseqüente alteração da transcrição génica em benefício da produção de enzimas esteroidogénicas. A ACTH tem um papel fundamental na esteroidogénese e é determinante para a diferenciação das células corticoadrenais [26].

No ACC verifica-se que, paralelamente a uma disfunção dos mecanismos de regulação do ciclo celular, há uma perda da diferenciação celular. Nestes tumores coexistem células diferenciadas produtoras de hormonas esteroides e células pouco diferenciadas apenas capazes de produzir os seus precursores. Tal facto revela uma falta de maturação na esteroidogénese que vai de encontro à perda de diferenciação celular que ocorre durante a transformação tumoral. De entre os genes particularmente atingidos durante a carcinogénese



destacam-se os genes *MC2R*, do recetor da ACTH, e os genes *CYP11B1*, *HSD3B2* e *AKR1B1*, genes de enzimas intervenientes na esteroidogénese [52].

### 2.2.1 *MC2R*

O *MC2R* é o recetor da ACTH expresso à superfície das células adrenocorticais. Pertence à superfamília dos recetores acoplados à proteína G, estando o seu gene localizado no cromossoma 18 (18p11). Estudos com células derivadas de ACC revelam que há um decréscimo na expressão do recetor nestes tumores, comparativamente aos tumores benignos ou às células adrenocorticais normais [51]. Esta característica é tanto mais marcada quanto menor o grau de diferenciação do tumor [52]. O mecanismo subjacente a esta perda de expressão ainda está por elucidar sendo que, na maioria dos casos, parece envolver uma perda da heterozigotia (LOH, *loss of heterozygosity*) com inativação do gene [6,16,62]. Estas descobertas são a favor de um papel da ACTH na diferenciação celular e restrição do crescimento celular.

### 2.2.2 Genes de Enzimas da Esteroidogénese

Os genes *CYP11B1* (*cytochrome P450, family 11, subfamily B, pypeptide1*) [6,34], *HSD3B2* (*hydroxy-delta-5-esteroid dehydrogenase, 3-beta and esteroid delta-isomerase*) [35,79] e *AKR1B1* (*aldo-keto reductase family 1, member B1*) são os mais afetados pela transformação tumoral das células adrenocorticais [52]. Eles codificam enzimas intervenientes na esteroidogénese, respetivamente, a enzima 11 $\beta$ -hidroxilase, 3- $\beta$ -HSD (3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase) e a aldose reductase humana [38]. As duas primeiras participam na via principal de produção de corticosteroides enquanto a última é responsável pela destoxificação

de radicais livres produzidos durante o processo. As três enzimas limitam o fluxo da esteroidogênese, sendo que na ausência de uma delas há um bloqueio no processo. As alterações constatadas na expressão destas enzimas no ACC estão de acordo com a deficiente produção de hormonas e com a secreção de precursores hormonais que se verifica nestes tumores.

Outros genes da esteroidogênese, tais como os genes *CYP11A1*, *CYP21A2*, *HSD3B1*, entre outros, são também afetados pela transformação tumoral [6]. No geral parece existir uma redução da expressão de genes envolvidos no metabolismo do colesterol e lípidos no ACC, o que justifica o seu baixo teor em gordura comparativamente com os adenomas ou tecido adrenal são.

### 2.3 Vias de sinalização intracelular

As vias de sinalização servem como vias efetoras da ação de ligandos intra ou extracelulares. A sua ativação está dependente da interação ligando-recetor e dessa ativação resultam alterações em diversas proteínas intracelulares culminando com modificações na síntese proteica.

No ACC, diversas vias de sinalização intracelular mostraram estar alteradas. De entre estas destacam-se a via da ACTH-cAMP-PKA, a via do Wnt, a via do ácido retinóico e a do complemento e apresentação antigénica. Ainda que o seu papel na carcinogénese adrenocortical não esteja totalmente elucidado, pensa-se que o seu contributo não seja negligenciável.

### 2.3.1 Via da ACTH-cAMP-PKA

Tal como já foi referido acima, a ACTH medeia as suas ações através da ativação da proteína cinase A (PKA), por ativação do seu recetor MC2R, promovendo a transcrição de genes de enzimas esteroidogénicas, a diferenciação e o crescimento celulares [7].

Acredita-se que esta via esteja implicada na patogénese do ACC por três razões principais: a primeira reporta ao facto de mutações ativadoras de componentes desta via terem sido detetadas noutros tumores endócrinos, como sejam a acromegália e os adenomas tiroideus tóxicos; em segundo lugar, por existir uma correlação positiva entre os níveis de ACTH e o tamanho do córtex suprarrenal, como ocorre na doença de Cushing, e em último lugar, porque alterações nesta via são encontradas em síndromas hereditários com predisposição para o desenvolvimento de tumor adrenocorticais como o Síndrome de Carney [7,62]. Contudo, ainda não foram identificadas alterações concretas nesta via, aguardando-se novos estudos que esclareçam os mecanismos subjacentes às mesmas.

### 2.3.2 Via do Wnt

A família Wnt é composta por um grupo de fatores de crescimento com um papel muito importante no desenvolvimento e homeostasia do organismo. A via canónica de sinalização do Wnt culmina com a acumulação da  $\beta$ -catenina no citoplasma, disponível para sofrer translocação para o núcleo. Esta inicia-se com a interação do Wnt com o seu recetor, membro da família Frizzled, o que resulta na inibição do complexo APC (*adenomatous polyposis coli*) – GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ), responsável pelo sequestro da  $\beta$ -catenina no citoplasma. Na ausência de fosforilação pelo complexo APC-GSK3 $\beta$  a  $\beta$ -catenina está livre para translocar para o núcleo e aí interagir com fatores de transcrição e regular a transcrição

de genes alvo do Wnt. Na ausência de estimulação pelo Wnt a  $\beta$ -catenina é fosforilada e degradada pelo proteossoma [6,12,44,68].

A via de sinalização do Wnt está já implicada na patogénese de diversos tumores, como sejam os tumores coloreticais hereditários e esporádicos [44].

No que respeita ao ACC, em cerca de 85% [7] dos casos verifica-se uma acumulação anormal da  $\beta$ -catenina no citoplasma e núcleo das células tumorais [2,12,16,52,62]. A pesquisa de mutações no seu gene, mostrou que estas eram tão frequentes em tumores benignos quanto em tumores malignos. Tais resultados levam a concluir que a ativação constitutiva da  $\beta$ -catenina é um passo precoce na transformação tumoral adrenocortical [62]. Fica ainda por explorar o papel dos restantes componentes desta via na carcinogénese do ACC.

### 2.3.3 Via do Ácido Retinoico

O ácido retinoico é um metabolito da vitamina A que está envolvido no crescimento e diferenciação celular. Existem dois recetores celulares nesta via, o RAR (*retinoic acid receptor*), que liga o ácido all-trans retinoico, e o RXR (*retinoic X receptor*), que liga o ácido 9-cis retinoico. Estes ligandos estão implicados na patogénese de vários tumores sendo utilizados no tratamento dos mesmos.

O córtex suprarrenal normal produz retinoides, ainda que o seu papel na fisiologia adrenal esteja por esclarecer. Sabe-se que o tratamento de células de ACC com ácido 9-cis-retinoico leva a uma inibição do crescimento celular. Estudos em ACC mostraram que a expressão de recetores do ácido retinoico e a produção de ácido retinoico se encontram reduzidas nestes tumores. O recetor RXRA (*retinoic X receptor  $\alpha$* ) e a ALDH1A1 e ALDH1A3 (*aldehyde dehydrogenase 1a1 and 3*), enzimas intervenientes na síntese do ácido retinoico, estão reduzidos em diversos estudos de microarray em ACC [52,79].

#### 2.3.4 Via do complemento e apresentação antigénica

Zsippai et al (2011) detetou alterações na apresentação antigénica e vias de ativação do complemento. De acordo com este estudo, no ACC, há uma redução na expressão de componentes da via clássica e alternativa do sistema do complemento, como sejam as cadeias C1q, C1QA e C1QB do complemento e os fatores H e D. Verificou ainda que as células tumorais não expressam à superfície moléculas do complexo major de histocompatibilidade classe II (MHCII). Uma vez que estas moléculas são normalmente expressas na zona reticular, as MHCII podem ser utilizadas como marcador de benignidade.

Ainda que relevantes, estas alterações são ainda tema de debate, desconhecendo-se o seu papel na patogénese do ACC.

#### 2.4 Instabilidade Cromossómica

Partindo de mutações génicas pontuais foi possível identificar padrões de alterações cromossómicas presentes na maioria destes tumores. Cerca de 62% dos ACC esporádicos apresentam perdas de material genético nos cromossomas 1p, 17p, 22p, 22q, 2q e 11q, quando estudados por hibridização genómica comparativa [6,16,37]. Sabe-se ainda existir uma correlação positiva entre o número de alterações cromossómicas e o tamanho do tumor, sugerindo uma acumulação das mesmas ao longo da progressão tumoral [6]. Estudos com marcadores de microssatélites permitiram ainda identificar de forma mais específica essas alterações verificando-se uma perda de heterozigotia (LOH) ou desequilíbrios alélicos no cromossoma 11(11q13) em mais de 90% dos casos [6,16,17], no cromossoma 17(17p13) em mais de 85% [6,16] e no cromossoma 2(2p16) em cerca de 95% dos casos de ACC estudados [6,16].

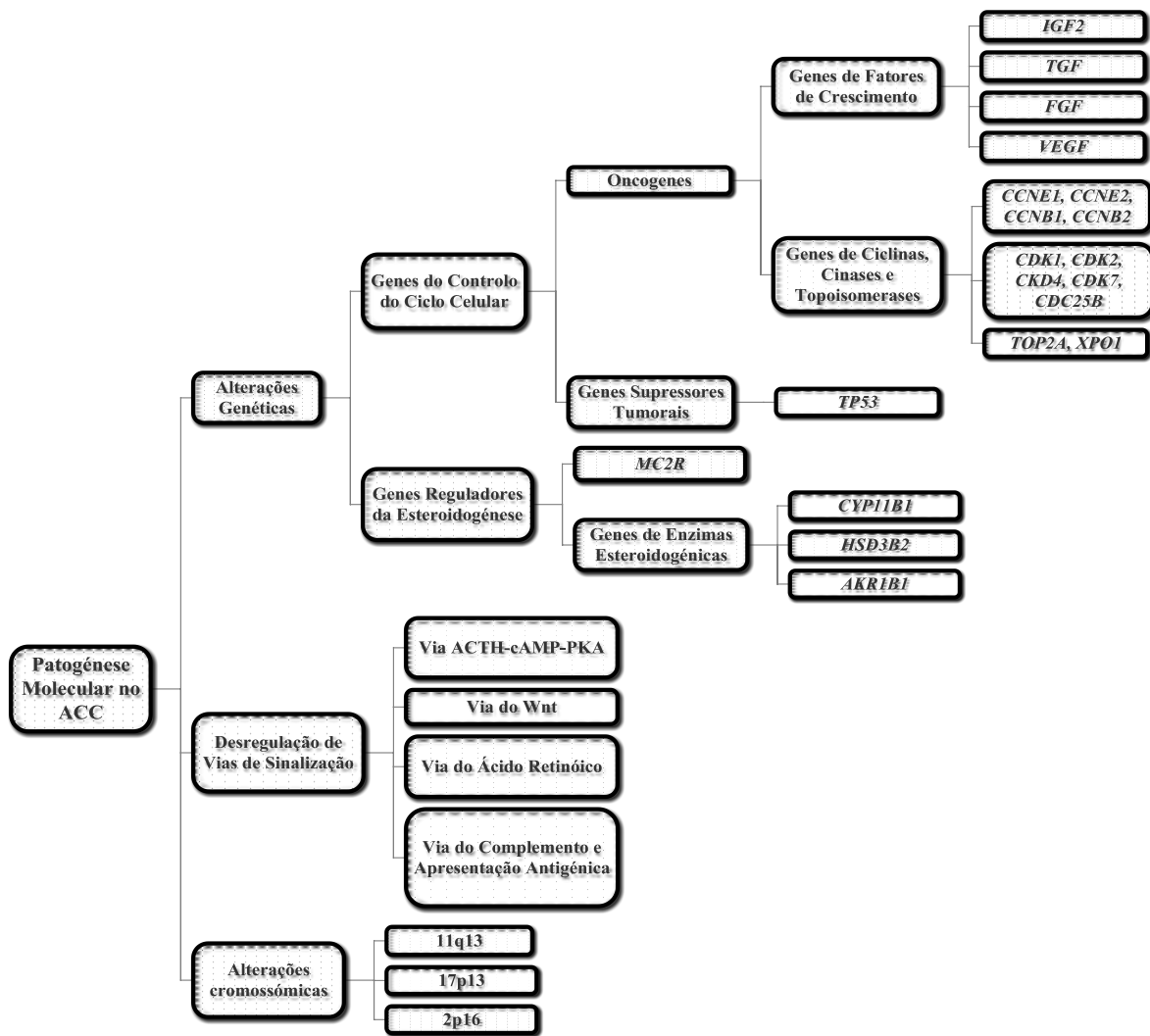


Fig.2 – Resumo das alterações moleculares no ACC.

### 3. Sistema IGF

#### 3.1 Componentes e Definição

O sistema IGF é constituído por dois ligandos, três grupos de recetores membranares e diversas proteínas ligandos dos IGFs, as IGFBP (*IGF binding proteins*). Este grupo de fatores de crescimento, os seus recetores e os modeladores da sua atividade são dos principais

intervenientes no processo de crescimento, desenvolvimento e manutenção das funções do organismo [31,32,39,40,41,49,54,55,57,58,59,71,76].

### 3.1.1 Ligandos: IGF1 e IGF2

O IGF1 é o principal representante deste sistema uma vez que é o responsável pela sua atividade biológica pós-natal. Pelo contrário, o IGF2 é o responsável pelas ações do sistema no período pré-natal, promovendo o crescimento e desenvolvimento fetal e da placenta. A função endócrina do IGF2 após o nascimento é ainda um enigma [19], ainda que este permaneça o ligando em maior concentração no plasma sanguíneo (IGF2~90nmol/L e IGF1~20nmol/L) [49]. É, no entanto, sujeito a um maior controlo de atividade, nomeadamente a nível da sua degradação por intermédio do recetor IGF2R .

Os IGFs são produzidos localmente, atuando autócrina e paracrinamente, e pelas células hepáticas para a corrente sanguínea. A produção hepática de IGF1 é regulada pela Hormona de Crescimento (GH), desconhecendo-se os mecanismos reguladores da produção de IGF2 a este nível. Sabe-se, no entanto, que esta não responde a variações na concentração de GH [13,47].

### 3.1.2 Recetores: IGF1R, IGF2R e IR

No que respeita aos seus recetores, o recetor IGF1R é o principal mediador da atividade biológica do sistema. Trata-se de um recetor tirosina cinase, constituído por quatro cadeias proteicas, duas  $\alpha$  e duas  $\beta$ , organizadas em dois domínios, um intracelular e outro extracelular. O domínio extracelular é o responsável pela interação ligando-recetor, apresentando afinidade para os dois IGFs, IGF1 e IGF2. O domínio intracelular possui atividade de tirosina cinase,

dando início à cascata de sinalização intracelular desencadeada em resposta à ativação do recetor pelo seu ligando.

O recetor IGF2R pertence ao grupo dos M6PR, *mannose 6-phosphate receptors*, não manifestando atividade intrínseca. Este recetor interage apenas com o IGF2 e funciona como um regulador da sua biodisponibilidade. Da interação ligando-recetor resulta a endocitose do complexo com destruição endossómica do IGF2 e reciclagem do recetor IGF2R a nível do complexo de Golgi [39,72,76].

O recetor da insulina, IR, tal como o IGF1R, pertence ao grupo dos recetores tirosina cinase, partilhando uma homologia de 60% com este último. O IR surge à superfície celular sob a forma de dois isómeros, o isómero A (IRA) e o isómero B (IRB). Estes são o resultado de um *splicing* alternativo no exão 11 do RNA, distinguindo-se pela sua distribuição tecidual e pelas suas afinidades para os diferentes ligandos do sistema. O isómero B predomina em tecidos envolvidos no controlo do metabolismo energético, como sejam o fígado, rim, músculo e tecido adiposo, sendo apenas ativado pela insulina. O isómero A tem uma distribuição ubiquitária, sendo que predomina em tecidos com uma elevada atividade mitótica e pouco diferenciados. Este recetor é capaz de interagir com todos os ligandos do sistema, tendo particular afinidade para o IGF2 [4,40,51,69].

Da expressão simultânea de cadeias dos recetores IGF1R e IR resultam os recetores híbridos (HR, *hybrid receptors*). Estes são mais um exemplo da complexidade deste sistema, sendo que as suas potencialidades estão ainda em estudo. Sabe-se apenas que partilham algumas propriedades dos dois recetores IR e IGF1R e que, por isso, poderão fazer parte integrante da fisiopatologia de diversas doenças envolvendo o sistema IGF bem como na resistência a diversos agentes terapêuticos [4,29,32,39,50,74].



### 2.1.3 IGF Binding Proteins

As IGFBPs são um grupo de seis proteínas solúveis capazes de ligar os IGFs com maior afinidade que os seus recetores. Têm atividade IGF-dependente e IGF-independente, sendo as principais modeladoras da atividade do sistema.

No que respeita a sua atividade IGF-dependente, as IGFBPs são responsáveis pelo transporte plasmático dos IGFs, protegendo-os da proteólise, e seu armazenamento nos tecidos, garantindo a obtenção de concentrações adequadas de ligando nos órgãos alvo. São ainda modeladoras da biodisponibilidade dos IGFs, limitando o seu acesso aos recetores membranares e assim atenuando a sua atividade biológica.

Algumas destas IGFBPs têm ainda a capacidade de atravessar a membrana celular e atuar de forma autónoma a nível intracelular (atividade IGF-independente) [29,39,72]. Contudo, desconhecem-se ainda os mecanismos reguladores desta atividade IGF-independente. Por exemplo, sabe-se que a IGFBP3 pode ter uma ação potenciadora ou inibidora da atividade do IGF1 dependendo do contexto celular em que se encontra. Assim, em células epiteliais normais a IGFBP3 potencia a atividade dos IGF1, enquanto em células tumorais tem o efeito contrário [58].

A produção das IGFBPs é regulada pelo próprio sistema IGF (sendo que o IGF1 e IGF2 são capazes de estimular a sua produção) bem como por outros agentes, como sejam a vitamina D, retinoides, a p53, os anti-esterogénios e o TGF- $\beta$  [50,51,55].

## 3.2 Atividade Biológica dos IGFs

Da interação ligando-recetor resulta a ativação de cascatas de sinalização intracelular cujo objetivo final é modificar a transcrição génica com consequente alteração da síntese proteica e

expressão da atividade biológica do ligando. No caso específico do IGF1R, a sua ativação resulta no desenrolar de duas cascatas de sinalização, a via da PI3K (*phosphatidylinositol (3,4,5) -triphosphate kinase*) e a via da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) [31,39,40,57,59,66,72,74].

### 3.2.1 Vias de Sinalização Intracelular: PIP3K e MAPK

No seu domínio intracelular o IGF1R está em relação com diversas proteínas efetoras responsáveis pela transdução do sinal ao longo de toda a via intracelular. Estas são capazes de alterar o seu estado de fosforilação e transmiti-lo a outras proteínas intervenientes na cascata de sinalização, ativando-as ou inibindo-as.

A via PI3K inicia-se pela ativação dos IRS (*insulin receptor substrate 1-6*) e da proteína Shc. O IRS1, após fosforilação pelo domínio cinase do IGF1R, ativa a proteína p85, subunidade reguladora da cinase do fosfatidil inositol (PI3K), com consequente, ativação da RPS6KB2 (*ribossomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 2*), bem como da proteína cinase B (Akt). Da ativação da Akt resulta uma melhoria da síntese proteica, por intermédio da ativação do mTOR, e uma redução da apoptose, pela fosforilação e inativação da BAX, proteína proapoptótica [59]. A atividade do PI3K é contrabalançada pela atividade da enzima PTEN (*phosphatase and tensine homolog*) responsável pela sua desfosforilação [66,58].

Paralelamente a esta cascata desenrola-se a via da MAPK. O IRS1 e a proteína Shc fosforilados são capazes de ativar a proteína GBR2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), membro da cascata da MAPK, com consequente ativação das proteínas Ras, Raf cinase, MEK, e MAPK. A MAPK é responsável pela regulação de fatores de transcrição como o MYC, CREB, FOS, alterando a transcrição de diversos genes intervenientes no ciclo celular [58,59].

### 3.2.2 IGFs e o Ciclo Celular

A nível celular os IGFs comportam-se como fatores de crescimento, promovendo a progressão no ciclo celular. Por intermédio do recetor IGF1, os IGFs facilitam a transição entre as fases G0 e G1 e as fases G1 e S. Durante a fase G0, fase de repouso do ciclo, o IGF1R medeia a ativação da RPS6KB2, via PIP3K, com fosforilação da proteína ribossomal S6 e aumento do *pool* de ribossomas necessário para a entrada no ciclo. A transição G1/S é facilitada pelo aumento da expressão dos genes da ciclina D1 e da CDK4, pela fosforilação e inibição da proteína CDKN1B, libertação do fator de transcrição E2F e síntese da ciclina E. Este aumento da ciclina D1 é conseguido graças às cascatas de sinalização intracelular, que favorecem a transcrição do seu gene e a estabilização do seu mRNA, enquanto inibem a transcrição de genes de proteínas inibidoras das CDKs, como a CDKN1B. A inibição da GSK-3 $\beta$  responsável pela degradação da ciclina D1, e o sequestro citoplasmático da CDKN1A (proteína inibidora das CDKs) após fosforilação pela proteína Akt. Esta inibição contribui igualmente para a transposição do *check-point G1*. O IGF1R poderá também auxiliar na transição G2/M ao promover o aumento da síntese das ciclinas A e B e da CDK1 [32,58,59].

Para além do seu papel indutor do ciclo celular, o IGF1R é capaz de inibir a apoptose celular. Esta sua atividade anti-apoptótica é mediada pela proteína cinase B (Akt), por inativação da BAX, e por inibição da GSK3 $\beta$  e da proteína p53 [59]. A BAX é uma proteína pró-apoptótica responsável por permear a membrana mitocondrial a ativadores das caspases como sejam o citocromo c. A proteína GSK3 $\beta$ , é responsável pela ativação do fator de iniciação da tradução EIF2B1 cuja fosforilação é pró-apoptótica. Ao inibir a proteína GSK3 $\beta$  a PKB consegue uma redução na apoptose celular. A PKB é capaz de antagonizar a ação da p53 através da fosforilação e consequente translocação nuclear do seu inibidor, a MDM2 [32,58].

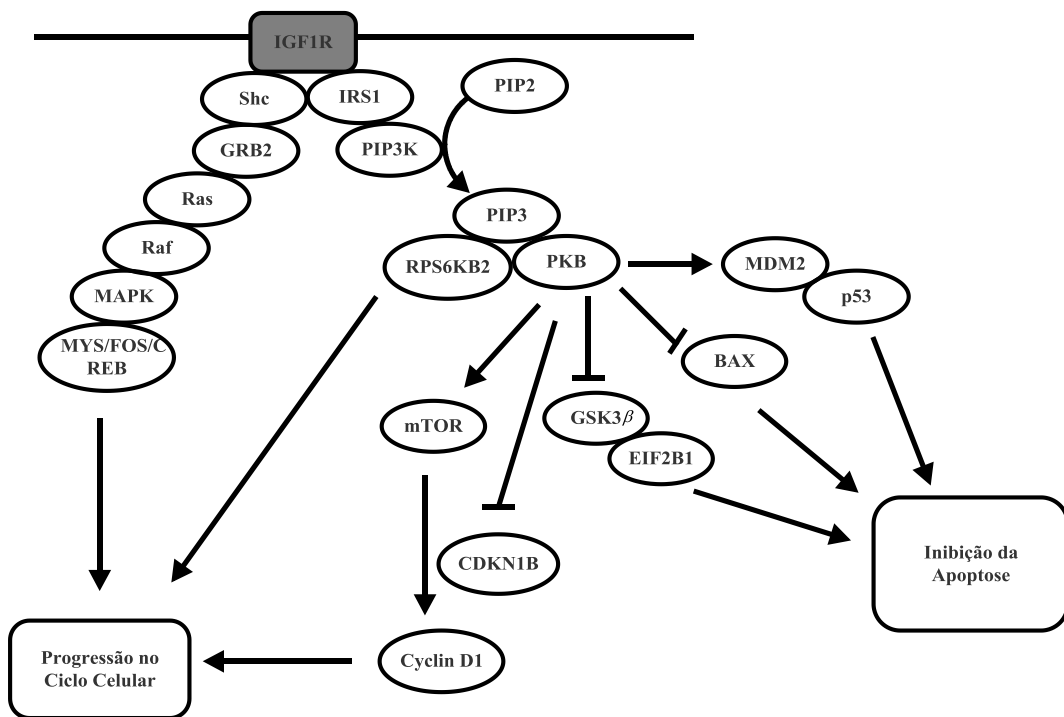


Fig. 3 – Sumário da atividade biológica dos IGFs. Adaptado a partir de Jacobs, CJ (2008).

#### 4. Sistema IGF e a Glândula Adrenal

Os IGFs estão implicados no desenvolvimento, crescimento e manutenção das funções do córtex adrenal. As células corticais são responsáveis pela produção de IGFs que atuam localmente como fatores de crescimento. Também no córtex adrenal são expressas as seis IGFBPs e os recetores IGF1R, IGF2R e IR. A produção local de IGFs é estimulada pela ACTH, igualmente responsável pela produção das IGFBPs 1 e 4. As IGFBPs 3 e 5 estão sob controlo dos IGFs, desconhecendo-se os mecanismos reguladores da produção das IGFBPs 2 e 6 [19].

Tal como na maioria dos organismos, o período fetal é marcado pelo predomínio do IGF2. Produzido localmente, atua de forma autócrina ou parácrina sobre os recetores IGF1R mediando o crescimento e a diferenciação do córtex adrenal. Sob controlo da ACTH, o IGF2

estimula a esteroidogénese, pelo aumento da produção das suas enzimas, e a expressão de recetores de ACTH à superfície das células corticais. Cria-se assim um ciclo autócrino e parácrino favorável ao desenvolvimento da glândula.

No período pós-natal inicia-se a atividade do IGF1 que passa a liderar as ações mediadas pelo IGF1R. Tal como o IGF2 na vida fetal, o IGF1 é responsável pelo crescimento e manutenção das funções do córtex adrenal. Embora o IGF1 seja o principal mediador do sistema IGF neste período e para o resto da vida do indivíduo, o IGF2 permanece o principal agente estimulador da esteroidogénese, nomeadamente da androgénese. Este aparente contrassenso está relacionado com o facto das concentrações plasmáticas de IGF2 se manterem elevadas apesar do decréscimo de produção a nível local. A interação IGFs-IGFBPs parece contribuir igualmente para esta diferença de potencial esteroidogénico entre os dois IGFs [18,19,54].

## **5. Sistema IGF e Cancro**

Diversos estudos concluíram existir uma correlação positiva entre os níveis de IGFs e o risco de desenvolver uma neoplasia [2,29,66,71,72]. Em diversos tumores foi já documentada a presença de uma expressão aumentada de IGF1, IGF2 e do recetor IGF1R [2,66] associada a uma redução da expressão do recetor IGF2R [31,32,40,58,72]. Tendo em consideração o seu papel no controlo do ciclo celular, não é difícil compreender a sua ação no crescimento tumoral. Continua, no entanto, por esclarecer em muitos casos o mecanismo subjacente a estas alterações.

Variações nos valores de IGFBPs estão igualmente implicadas na transformação tumoral mediada por este sistema [2,32]. Por exemplo, as elevadas concentrações de IGFs que se observam em tumores, fazem-se acompanhar de uma redução da IGFBP3. Esta proteína para além da sua função de transporte de IGFs, manifesta atividade pró-apoptótica IGF-

independente [58,73]. Este é outro domínio do sistema IGF cujo significado ainda está por esclarecer.

### 5.1 Patogénese Molecular

Diversos mecanismos moleculares foram propostos para explicar estas alterações no controlo da expressão de elementos do sistema IGF:

- perda de *imprinting* paterno no gene *IGF2*, com aumento da sua expressão [51,58];
- amplificação do gene *IGF1R*, com aumento da sua expressão [58];
- desregulação das proteínas convertases, responsáveis pela degradação de IGFBPs, e consequentemente aumento da biodisponibilidade dos IGFs [58];
- aumento da expressão dos fatores de transcrição AP-2 (*transcription factor AP-2*), promotores da transcrição dos genes *IGF* e *IGF1R* [58];
- modificações postranscripcionais do IGF1R, com maior eficiência da sua ativação em baixas concentrações de IGFs [58];
- hiper-expressão do recetor IRA [58];
- redução da expressão de IGFBPs [58];
- hiper-expressão ou ativação constitutiva de moléculas efetoras da via de sinalização do IGF1R [58];
- perda de expressão de genes supressores tumorais, como o *TP53*, *WT1*, *PTEN* [49] e *IGF2R*. O gene *WT1* liga os promotores da transcrição do IGF1R e IGF2, inibindo a sua ação. Na sua ausência há um aumento da atividade destes promotores. [58].

## 5.2 Progressão Tumoral

Para além do seu papel no crescimento tumoral o sistema IGF parece estar igualmente envolvido em mecanismos de progressão tumoral, nomeadamente na metastização tumoral. A angiogénese, migração e invasão tumoral e localizações secundárias (metastização) são outros alvos da ação dos IGFs [57,58,73].

### 5.2.1 Angiogénese e Linfangiogénese

A disponibilidade de nutrientes e oxigénio é um dos fatores limitantes do crescimento tumoral. Para superar esse obstáculo, os tumores em crescimento adquirem a possibilidade de estimular a produção de novos vasos a partir de vasos previamente existentes, isto é a capacidade de angiogénese. Para além de suprir o crescimento tumoral, os novos vasos servem de via de passagem para novas localizações tumorais, processo designado de metastização.

O sistema IGF é reconhecido como potente modelador da angiogénese tumoral. Destacam-se três mecanismos na angiogénese mediada por IGFs: a amplificação e desencadear do estímulo hipóxico, principal ativador de mecanismos de angiogénese; a migração e diferenciação de células endoteliais; e a interação com outras vias de sinalização.

Tanto a insulina quanto os IGFs são capazes de desencadear e amplificar o estímulo hipóxico, promovendo a produção do HIF1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible fator 1 $\alpha$* ). Este forma um complexo nuclear com o recetor *aryl hydrocarbon* responsável por regular a transcrição de genes de resposta à hipoxia, como por exemplo o gene *VEGFA* [41,59,66,76]. O IGF1 induz de forma direta a produção de HIF1 $\alpha$ , através das vias MAPK e PIP3K. Por seu turno, o HIF1 $\alpha$  é necessário à produção de IGF2, IGFBP2 e IGFBP3 [58].

Graças à sua capacidade de induzir a migração e diferenciação endotelial, os IGFs promovem o desenvolvimento de novos vasos. Os mecanismos associados a esta capacidade estão ainda por esclarecer; sabe-se apenas que o IGF1 atravessa o endotélio vascular por via transcelular, ligando-se à matriz extracelular, onde mantém a estabilidade e sobrevivência celular [58].

Estudos em ratinhos não expressando o recetor no endotélio vascular para a insulina e IGFs verificaram uma redução da neovascularização associada a hipóxia [58].

O sistema IGF pode ainda colaborar com outros recetores de tirosina cinase, como o recetor EGFR, na indução da angiogénese.

A formação de novos vasos linfáticos por ação do sistema IGF é mediada pelos fatores VEGFC e VEGFD. Tal como para a angiogénese os mecanismos subjacentes a esta capacidade estão ainda por esclarecer. Ambos os fatores ligam o recetor VEGFR3 responsável pela formação de novos vasos linfáticos. O VEGFC é ainda capaz de recrutar vasos linfáticos previamente existentes envolvendo-os na invasão tumoral e disseminação distal. Estudos recentes indicam que a ativação direta do IGF1R presente na superfície das células dos vasos linfáticos pode facilitar a linfangiogénese, por aumento da motilidade e proliferação dessas células [58].



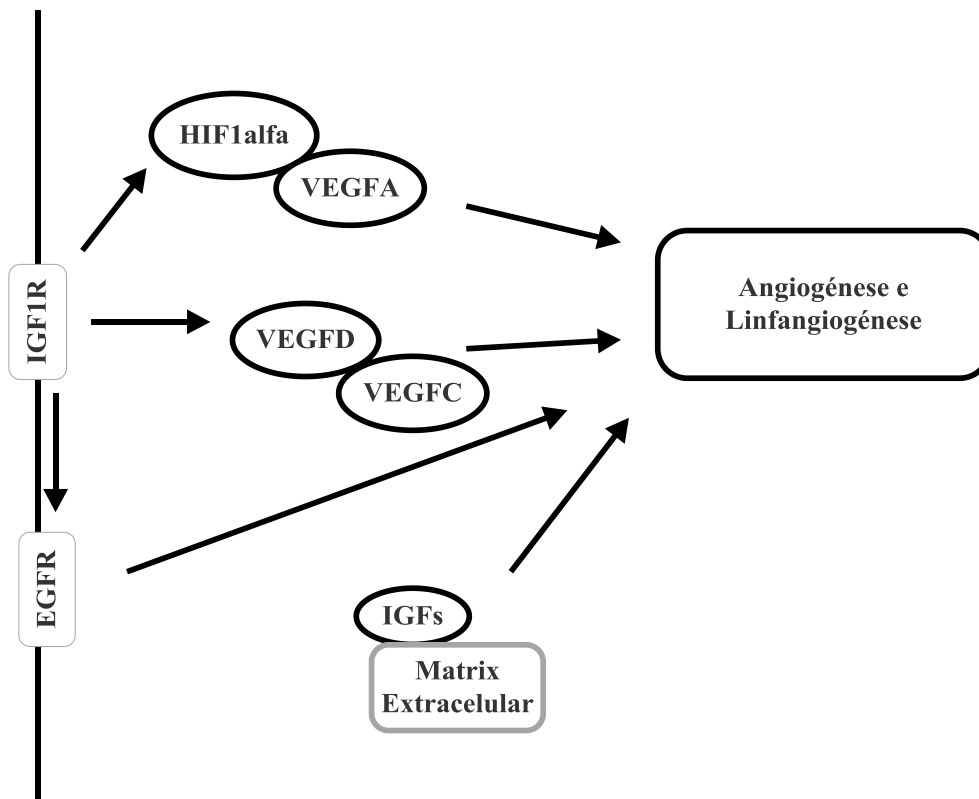


Fig. 4 Atividade do sistema IGF na angiogênese e linfangiogênese.

### 5.2.2 Invasão Tumoral

A invasão tumoral implica a destruição das ligações intercelulares e da matriz extracelular. O sistema IGF é capaz de regular a expressão e atividade das MMPs (*Matrix Metalloproteinases*) e do sistema uPAR/uPA (uPAR, *urokinase-type plasminogen activator recetor*; uPA, *urokinase-type plasminogen activator*) facilitando a invasão tumoral.

As MMPs são enzimas responsáveis pela remodelação da matriz extracelular e pela homeostasia dos tecidos. As MMP 2, 9 e 14 foram implicadas na degradação da matriz, invasão tumoral, e angiogênese tumoral. Em estudos envolvendo o sistema IGF, este foi identificado como promotor da síntese dessas três enzimas, através da ativação da via da PIP3K. Verificou-se ainda a existência de uma dependência entre os dois sistemas uma vez que a MMP2 aumenta a biodisponibilidade de IGF, degradando as IGFBP3 e 5. Recentemente

a MMP7, frequentemente elevada durante a progressão tumoral, foi implicada na degradação de todas as IGFbps e identificada como agente promotor da fosforilação e sinalização via IGF1R.

O sistema uPAR/uPA [constituído pelo ativador urokinase do plasminogénio (uPA) e pelo seu recetor (uPAR)] faz também parte integrante dos mecanismos de degradação da matriz extracelular e de invasão tumoral. O uPA liga-se ao seu recetor convertendo o plasminogénio em plasmina, protease responsável pela degradação da matriz. Em células tumorais, o uPA pode ainda atuar como agente promotor da angiogénese. As vias de sinalização do IGF1R estão envolvidas na transcrição de uPA de forma direta, levando a um aumento da sua produção nas células tumorais [58].

### 5.2.3 Metastização

À invasão tumoral e migração sanguínea ou linfática segue-se a incubação em locais distantes do tumor primário. A capacidade de colonização das células tumorais está dependente da complementaridade entre os fatores tumorais e o tecido hospedeiro. Diversos estudos demonstraram que o IGF1 e IGF1R estão envolvidos na promoção do crescimento de células tumorais metastáticas em órgãos como o fígado, o osso e a mama.

Testes em ratinhos com neoplasia do cólon mostraram que quando submetidos a elevadas concentrações de IGF1 há um aumento da proliferação do tumor primário e um maior desenvolvimento de metástases hepáticas, comparativamente aos casos controlo [58].

### 5.3 Papel na Resistência à Terapia Oncológica Convencional

Diversos estudos constataram que o tratamento de linhas celulares cancerígenas com IGF1 as torna menos suscetíveis à morte celular induzida por agentes citostáticos ou radioterapia. Este efeito foi também encontrado *in vivo* onde a utilização de modeladores do IGF1R parece aumentar a eficácia da terapia oncológica convencional. A análise de células tumorais tratadas com agentes citostáticos evidenciou uma expressão aumentada dos recetores IGF1R [2] e IRA [11] à sua superfície, confirmando as suspeitas de que o sistema IGF estaria implicado nessa resistência à terapia convencional.

Os mecanismos subjacentes a esta resistência são vários e alguns incompletamente esclarecidos. Em primeiro lugar encontramos o papel dos IGFs como fatores de crescimento capazes de promover a divisão celular e inibir a apoptose [32]. Sabe-se ainda que a sinalização pelo IGF1R está implicada na expressão do fenótipo multirresistente por indução de genes como o *MDR1* (*ATP-binding cassette, subfamily B, member 1; ABCB1*) e *SOD* (*superoxide dismutase*). A proteína ABCB1 é uma proteína responsável pelo transporte, para o exterior da célula, de agentes usados na quimioterapia, reduzindo a sua absorção e sua atividade a nível celular. A enzima MnSOD medeia a destoxificação de radicais livres de oxigénio cuja produção está na base do mecanismo de ação de diversos agentes citostáticos [40,58].

No que respeita a radioterapia, o IGF1R intervém na resposta tumoral, modelando a função do gene *ATM* (*ataxia telangectasia mutated*), interferindo com a função da p53 e estimulando a produção de clusterinas secretoras (*sCLU, secretory clusterins*). O gene *ATM* comporta-se como gene supressor tumoral, suspendendo a progressão do ciclo celular quando deteta lesões no *DNA*. A ataxia telangectasia é uma doença rara e hereditária que se caracteriza por uma hipersensibilidade à radiação. Estudos com células expressando a forma mutada do gene *ATM*

revelaram que estas apresentam baixos níveis de IGF1R, e que aumentando a sua expressão, é possível restabelecer a sua radiorresistência. Tais descobertas implicam o IGF1R na resposta celular ao insulto radioativo e na resistência à radioterapia [40,66].

As sCLU têm sido implicadas na sobrevivência e resistência à terapêutica hormonal, radioterapia e quimioterapia, em diversas linhas celulares tumorais. Estas chaperoninas citoprotectoras são ativadas em momentos de *stress* celular prevenindo a agregação proteica [78]. As sCLU interagem e inibem a proteína BAX, bloqueando a ativação da via intrínseca da apoptose. Estão ainda implicadas na ativação da via do NF-kB, via interveniente na resposta inflamatória, na sobrevivência e proliferação celular [83]. Diversos estudos constataram que as células tumorais irradiadas apresentam uma elevada expressão das proteínas sCLU e que esta se associa a um aumento da atividade do IGF1R. A administração de inibidores de tirosina cinase torna as células novamente radiosensíveis implicando o IGF1R na resistência à radioterapia mediada pelas sCLU [58].

A comunicação entre a via de sinalização do IGF1R e vias de sinalização de outros fatores de crescimento ou hormonas está igualmente implicada na resistência a diversos agentes terapêuticos. O facto da atividade do IGF1R se cruzar com a de outros recetores, constitui uma via de escape a tratamentos dirigidos aos mesmos. Tal ocorre, por exemplo em tratamentos com inibidores do EGFR e de recetores de hormonas esteroides [41]. Quando em associação com inibidores do IGF1R o tratamento recupera a sua eficácia [40,66].

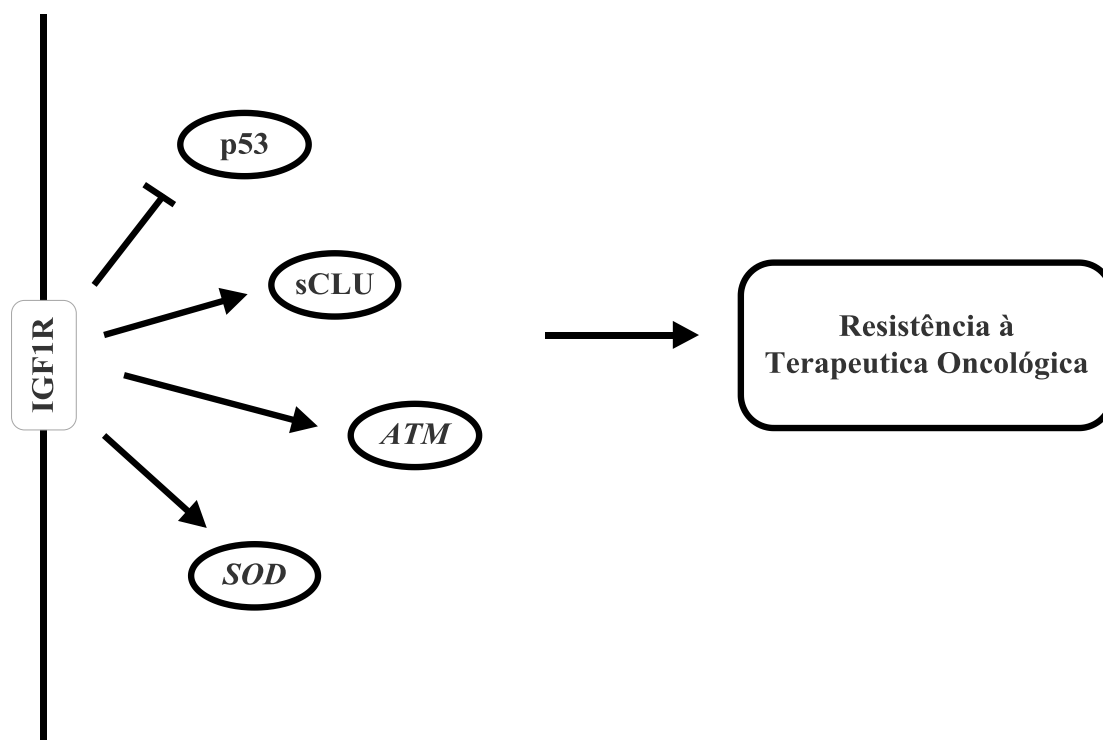


Fig. 5 – Papel do sistema IGF na resistência à terapia oncológica convencional.

## 6. Sistema IGF e o Carcinoma Adrenocortical

O sistema IGF tem sido objeto de diversos estudos envolvendo os mecanismos patogénicos e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos no ACC. A atenção dada a este grupo de fatores de crescimento decorre da constatação de que cerca de 90% dos ACC esporádicos apresentam uma hiper-expressão do gene *IGF2* [6,7]. Partindo desta desregulação na produção de IGF2 verificou-se que a carcinogénese cortical envolve outros elementos do sistema IGF. A hipersecreção de IGFBP2, o decréscimo da expressão do recetor IGF2R e o aumento da expressão do IGF1R são outras alterações encontradas nestes tumores [18,54,73]. No conjunto esta disfunção do sistema IGF estabelece um ciclo autócrino e parácrino favorável à progressão tumoral.

## 6.1 Hiper-expressão do gene *IGF2*

Os mecanismos subjacentes ao aumento da produção de IGF2 por estes tumores foram já explicados anteriormente. Verifica-se que estas alterações na produção de IGF2 são de cariz exclusivamente quantitativo, surgem tardiamente na evolução tumoral sendo possível estabelecer uma correlação positiva entre os níveis de IGF2 locais e a agressividade do tumor. Os ACCs com hiperexpressão do gene *IGF2* estão associados a um aumento em cinco vezes do risco de recorrência em tumores esporádicos. Contrariamente à IGFBP2, os níveis sanguíneos de IGF2 mantêm-se dentro do normal nestes doentes [9,22].

A hiper-expressão do gene *IGF2* isoladamente é insuficiente para a carcinogénese adrenocortical. Estudos em ratinhos transgênicos com uma elevada produção de IGF2 mostraram que estes não chegam a desenvolver tumores. Tal facto denuncia a necessidade de outros fatores promotores da transformação tumoral [18].

## 6.2 Hiper-secreção de IGFBP2

Desconhecem-se ainda os mecanismos subjacentes a esta secreção anormal de IGFBP2. Contudo, verifica-se que a taxa de *mRNA* desta proteína se mantém dentro de níveis normais nestas células, indiciando a ocorrência de alterações predominantemente postranscripcionais [18,54].

No ACC, a IGFBP2 facilita a proliferação tumoral por mecanismos IGF-dependentes e IGF-independentes. A IGFBP2 permite a obtenção de elevadas concentrações tumorais de IGF2, pela sua função de transporte e proteção do IGF. Graças à sua interação com a matriz extracelular e membrana celular, a IGFBP2 facilita a interação IGF2-IGF1R. A sua atividade proteolítica permite uma maior disponibilização de IGF2 pelas outras IGFbps [10]. A

IGFBP2 consegue ainda aceder ao interior das células estimulando a atividade da enzima catalase, destoxificadora de radicais de oxigénio, favorecendo a sobrevivência celular [18].

O seu papel na progressão tumoral ainda não está completamente esclarecido, no entanto, a presença de valores elevados de IGFBP2 no plasma associa-se a um pior prognóstico [9,10,22,60]. Cerca de 80% dos tumores metastásicos apresentam valores séricos muito elevados comparativamente a casos controlo. Diferenças estas, não encontradas entre casos controlo, os casos em remissão completa ou a doença localizada, razão pela qual a IGFBP2 não é utilizada como marcador tumoral no seguimento deste doentes [9,22,60].

### 6.3 Hiper-expressão do IGF1R e Hipo-expressão do IGF2R

O ACC acompanha-se de um aumento do número de recetores IGF1 sem que se verifiquem alterações qualitativas ou funcionais do mesmo. O facto de a sua expressão ser regulada por genes alvo da carcinogénese tumoral, como os genes *TP53*, *BRCA1*, *WT1* e *IGF2*, justifica em parte estas alterações [54]. *In vitro* este aumento na expressão de IGF1R favorece a proliferação tumoral dependente dos IGFs [18].

Verifica-se ainda que o recetor IGF2R se encontra hipo-expresso em cerca de 58% dos casos de ACC [18]. Esta alteração é favorável à proliferação tumoral por contribuir para uma maior disponibilidade tumoral de IGF2. Contudo, os mecanismos envolvidos nesta alteração estão ainda por esclarecer.

#### 6.4 Produção de IGF1

O gene *IGF1* é igualmente expresso no tecido tumoral. Contrariamente ao IGF2, após diversos estudos, não foram ainda detetadas alterações qualitativas ou quantitativas na sua produção [18].

#### 6.5 Papel na Resistência à Terapia Oncológica Convencional

O papel da radio e quimioterapia no tratamento do ACC está longe de consenso. Durante anos acreditou-se que o ACC era radorresistente limitando-se a utilização deste método terapêutico à palição da dor. Estudos recentes vêm contrariar esta crença, mostrando uma resposta positiva na diminuição do risco de recorrência local em tumores submetidos a radioterapia [56].

No que respeita a quimioterapia, o ACC é tido como um tumor resistente. A expressão do gene *ABCB1* está subjacente à ineficácia dos agentes citotóxicos pelo mecanismo anteriormente referido. A capacidade do mitotano interferir, inibindo, a proteína ABCB1, permite a acumulação de outros citotóxicos no interior da célula, estando na base da sua utilização nos esquemas de primeira linha [5,34]. Ainda assim, a resposta tumoral ao tratamento químico é pouco satisfatória, variando entre 36 e 49% [5,33].

Desconhece-se o papel do sistema IGF nesta resistência ao tratamento oncológico sendo uma área ainda por estudar. Não se pode, no entanto, rejeitar uma relação entre as alterações no sistema IGF encontradas no ACC e a sua resposta a estes métodos terapêuticos.



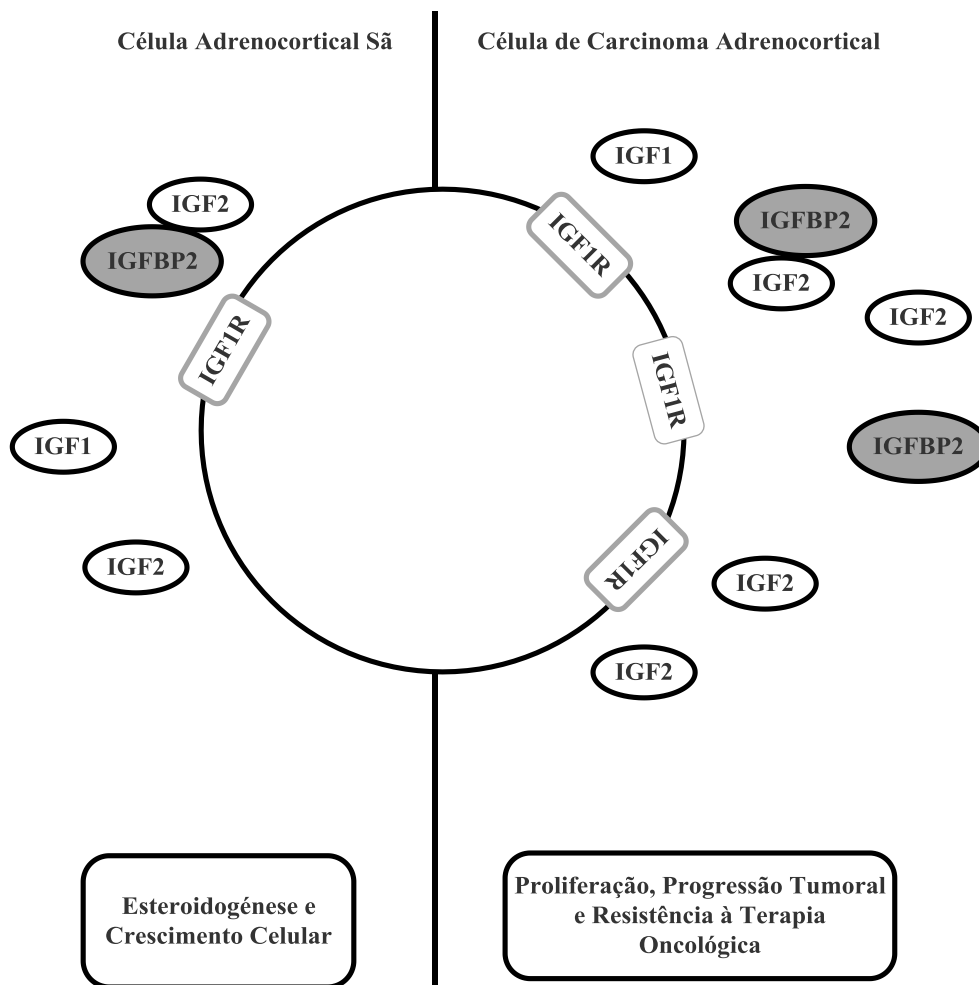


Fig. 5 – Revisão dos efeitos do sistema IGF nas células adrenocorticais normais e no ACC.

Adaptado a partir de Fotter et al (2004).

## 7. Terapia Dirigida ao Sistema IGF

### 7.1 Principais Mecanismos de Ação

O recetor IGF1R surge atualmente como um dos principais alvos terapêuticos em oncologia. Ensaio *in vitro* mostraram excelentes resultados na inibição do crescimento tumoral sendo os primeiros ensaios *in vivo* muito promissores.

A terapia dirigida contra o IGF1R tem como objetivo uma redução da atividade deste recetor. Tal é conseguido agindo sobre os seus ligandos, os IGFs, ou sobre o próprio recetor. Assim, alguns fármacos atuarão reduzindo a concentração de IGFs, como sejam os inibidores da hormona de crescimento; outros interferirão na sua interação com o recetor, como é o caso dos anticorpos anti-IGFs ou das IGFbps solúveis [2]. Agindo sobre o recetor será possível prevenir a sua ativação pelos IGFs - papel desempenhado pelos anticorpos anti-IGF1R; prevenir a sua atividade de tirosina cinase - inibidores de tirosina cinase -; ou interferir com as pequenas moléculas da cascata de sinalização intracelular [31,57].

Técnicas mais sofisticadas utilizando RNA *antisense*, oligonucleotídeos *antisense*, *small RNA interfering*, plasmídeos de expressão *antisense* [2,29,32,51,58,59,72,74], estão ainda em desenvolvimento aguardando-se novos estudos que comprovem a sua utilidade no tratamento de tumores.

Um dos problemas na utilização destes fármacos é a definição de biomarcadores capazes de determinar os casos que mais beneficiarão com cada um. Entre os principais candidatos destacam-se o rácio IGF1R/IR, o estado de fosforilação do recetor IGF1R, as alterações na expressão do IGF1R no tumor ou em células mononucleares sanguíneas e a expressão de vários componentes envolvidos na cascata de sinalização do IGF1R (Akt, IRS-1) [2].

Atualmente os anticorpos anti-IGF1R e os inibidores de tirosina cinase são os fármacos mais amplamente estudados. São já de utilização na terapia oncológica, sendo a maioria dos seus efeitos adversos conhecidos.

### 7.1.1 Anticorpos Anti-IGF1R

Os anticorpos anti-IGF1R impedem a interação ligando-recetor, favorecendo a internalização e degradação do recetor por endocitose. Apresentam ainda um outro mecanismo de ação

baseado na sua atividade ADCC (*antibody dependent celular toxicity*) [54]: ao fixar-se à superfície celular, sinaliza a célula para destruição mediada por linfócitos T, amplificando o seu efeito antitumoral.

O melhor exemplo de fármacos pertencentes a este grupo é o CP-751,871 (Figitumumab), atualmente em estudos de fase III. Este anticorpo monoclonal conta com excelentes resultados no tratamento do carcinoma pulmonar não pequenas células onde conseguiu uma resposta de cerca de 54% [2,74], quando associado a terapia oncológica convencional.

Outros fármacos estão ainda em estudo sendo que todos eles se caracterizam pela sua administração endovenosa e pela ausência de efeitos adversos graves, excetuando raros casos de alterações hematológicas severas (trombocitopenia) [74].

A principal desvantagem destes fármacos é a sua ineficácia contra recetores IRA. Estes recetores, ao serem ativados pelo IGF2, constituem um mecanismo de resistência ao tratamento com inibidores do IGF1R. Estudos recentes verificaram que as células tumorais quando tratadas com anticorpos anti-IGF1R sofrem uma redução da atividade deste recetor que se acompanha de um aumento de sinalização através do IRA [4,11,69].

Tais resultados são a favor da utilização complementar de fármacos que reduzam a atividade do IRA ou capazes de inibir ambos os recetores em simultâneo.

### 7.1.2 Inibidores de Tirosina Cinase

O mecanismo de ação destes fármacos baseia-se na inibição da atividade tirosina cinase do recetor IGF1R impedindo a propagação do sinal pelas vias intracelulares, e a síntese proteica mediada pelos ligandos.

O sucesso no tratamento da leucemia mieloide crónica com imatinib em 2001, marcou o fim da descrença nesta classe farmacológica. Desde então novos agentes desta classe têm sido

desenvolvidos e aplicados no controlo de diversas doenças para além do cancro, como sejam doença de Alzheimer, condições inflamatórias, etc [40,66].

Os inibidores de tirosina cinase têm a particularidade de serem menos específicos que os anticorpos anti-IGF1R, podendo atuar noutros recetores de tirosina cinase homólogos ao IGF1R, como sejam, os recetores da insulina [2,59,76]. Estes dois recetores apresentam uma homologia de 84% no seu domínio cinase, o que justifica a interação do fármaco com ambos. Assim, surgem como solução para a resistência mediada pelo IRA, uma vez que atuam sobre este inibindo a sua atividade. No entanto, esta característica poderá ser motivo de alterações metabólicas significativas, dada a possível inibição simultânea do recetor IRB.

Uma das grandes vantagens destes fármacos é a sua administração por via oral [59]. Tal como nos anticorpos anti-IGF1R a ocorrência de efeitos adversos graves é pontual.

## 7.2 Efeitos Adversos

De uma forma geral os inibidores do IGF1R são bem tolerados. Os efeitos secundários associados à sua utilização são facilmente controlados e raramente mortais.

A hiperglicemia é o efeito adverso mais frequentemente encontrado aquando da utilização de inibidores da atividade do recetor IGF1R. O mecanismo subjacente a esta alteração ainda não está completamente esclarecido, acreditando-se que esteja relacionado com alterações no eixo Hipófise-GH-IGF. Ao inibir a atividade dos recetores IGF1R deixa de existir o *feedback* negativo desse eixo hormonal com conseqüente hiperestimulação do mesmo. Esta resulta num aumento da concentração de hormona de crescimento instalando-se um estado de insulinoresistência com conseqüente hiperglicemia. No que respeita os inibidores de tirosina cinase, um outro mecanismo envolvendo a sua interação com os recetores IRB, poderá estar na origem das alterações metabólicas associadas à sua utilização. A administração de

metformina ou insulina poderá permitir o restabelecimento da glicemia a valores normais [2,4,51,59,74].

Fadiga, anorexia, perda de peso, alterações das enzimas hepáticas e, raramente, alterações hematológicas (anemia, leucopenia, trombocitopenia) cursam igualmente com a administração destes fármacos [2,31,59,74].

Estes fármacos associam-se ainda a um risco de neurotoxicidade e comprometimento da função cardíaca devido ao papel do IGF1R no desenvolvimento neuronal e manutenção da atividade cardíaca [31,51].

O atraso de crescimento subjacente à utilização de inibidores do IGF1R em crianças, contraindica-os nesta faixa etária. Nos adultos, uma deficiente atividade do recetor IGF1R resulta num aumento da massa adiposa, redução do tecido muscular e é fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose [50].

## **8. Inibidores do IGF1R no Tratamento do Carcinoma Adrenocortical**

A constatação de alterações no sistema IGF tornou-o um dos principais alvos da terapia farmacológica. Esta é uma área em desenvolvimento sendo que poucos estudos foram terminados encontrando-se muitos outros a decorrer.

Em 2008 Almeida et al demonstrou que o inibidor de tirosina cinase, NVP-AEW541, apresentava atividade anti-tumoral em linhas celulares de adrenocarcinoma. Este efeito era dose e tempo dependente e relacionava-se com aumento da atividade das caspases 3 e 7, confirmando o papel do IGF1R na inibição da via intrínseca da apoptose.

Seguiu-se o trabalho desenvolvido por Barlaskar et al (2009). Este, servindo-se do inibidor de tirosina cinase, o NVP-AEW541, e de um anticorpo monoclonal anti-IGF1R, AMC-A12, concluiu que ambos os fármacos reduzem eficazmente a proliferação tumoral em linhas

celulares e xenoinxertos de ACC. *In vitro*, o anticorpo AMC-A12 levou a uma redução da expressão do IGF1R (~80%) e da produção de P-Akt (~70%), enquanto o NVP-AEW541 levou a uma inibição total da atividade tirosina cinase do recetor. Ambos os fármacos conseguiram uma redução significativa da proliferação tumoral em linhas celulares de ACC, superior a 50% para o AMC-A12 e próximo de 100% para o NVP-AEW541. *In vivo*, esta terapia provou ter efeitos semelhantes, atrasando a progressão tumoral de xenoinxertos, com resultados próximos de valores estatisticamente significativos ( $p=0,086$ ). Este estudo provou ainda que os inibidores do IGF1R são mais eficazes no controlo da proliferação celular, que o mitotano em exclusivo; e que existe uma potenciação dos efeitos do mitotano quando em associação com os inibidores do IGF1R. *In vitro* verificou-se uma redução de 85% da viabilidade celular com o NVP-AEW541 e de 77% com o mitotano em exclusivo, verificando-se apenas 9% de viabilidade celular aquando da associação dos dois fármacos. *In vivo*, verificou-se uma redução de 51% no tamanho tumoral com o AMC-A12 versus 25% com o mitotano em exclusivo, e uma redução de 70% aquando da associação dos dois fármacos.

Recentemente, Haluska et al (2010) reforçou a segurança do tratamento com anticorpos anti-IGF1R no ACC. Concluiu que na generalidade dos casos o mesmo é bem tolerado sem a ocorrência de reações adversas graves. O efeito secundário mais frequentemente encontrado foi a hiperglicemia, facilmente controlada pela administração de metformina.

Em 2011, Doghman M, Axelson M e Lalli E, mostraram que o PPP (*picropodophyllin*) tem uma ação inibitória sobre o crescimento de linha celulares de ACC *in vitro*. O PPP é um membro da família dos ciclogicanos, que foi recentemente descrito como inibidor de tirosina cinase. De acordo com este estudo o PPP exerce um efeito inibitório sobre a proliferação celular em menores concentrações do que o NVP-AEW541. Ficou ainda claro que o PPP atua por outro mecanismo para além da referida inibição da atividade de tirosina cinase do recetor.

O PPP é um estereoisómero do PPT (*podophyllotoxin*), capaz de interferir com a preparação dos microtúbulos na mitose, levando a um bloqueio na progressão do ciclo celular. Aguardam-se novos estudos que melhor caracterizem o mecanismo de ação deste agente farmacológico e a sua utilidade no tratamento do ACC.

Outros fármacos foram recentemente objeto de estudo no tratamento do ACC. As tiazolidinedionas, agonistas do PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ), mostraram-se capazes de reduzir a proliferação celular e estimular a apoptose por mecanismos envolvendo não só a inibição da sinalização pelo IGF1R como também pela redução de outros fatores envolvidos na progressão tumoral (VEGF, MMP2, Ki67) [14]. Pelo contrário, a associação bevacizumab (anticorpo anti-VEGF) e capecitabina provou ser um fracasso no tratamento do ACC avançado, não apresentando qualquer atividade nestes tumores [80].

## **9. Conclusão:**

O carcinoma adrenocortical é uma doença rara e geralmente fatal. A cirurgia permanece o tratamento de primeira linha e a única possibilidade de cura. A esta associa-se frequentemente tratamento adjuvante, que consiste na administração de mitotano, radio ou quimioterapia. O diagnóstico tardio, as limitações da cirurgia e a ineficácia da terapia adjuvante atualmente disponível nestes tumores justificam a curta sobrevida destes doentes.

Estudos recentes têm vindo a esclarecer os mecanismos moleculares subjacentes à patogénese do AAC. A compreensão da patogenia destes tumores poderá permitir a identificação de novos alvos terapêuticos. É neste contexto que o sistema IGF surge como um dos principais objetos de investigação.

Este sistema está implicado no desenvolvimento de diversos tumores, promovendo o crescimento e progressão tumorais. No que respeita ao ACC, foram detetadas diversas

alterações no seu funcionamento: a hiper-expressão do gene *IGF2*, o aumento da expressão do recetor IGF1R e da proteína IGFBP2, e uma redução na expressão do recetor IGF2R, parecem favorecer a carcinogénese adrenocortical promovendo o crescimento e progressão tumorais.

Os primeiros estudos envolvendo a utilização de inibidores do IGF1R no tratamento do ACC são muito otimistas. Verifica-se uma redução da proliferação tumoral *in vitro e in vivo* e uma potenciação dos efeitos do mitotano quando em associação com estes fármacos. Novos estudos serão ainda necessários por forma a garantir a eficácia e segurança destes agentes farmacológicos no tratamento do ACC.

Como principais problemas colocam-se os distúrbios metabólicos, nomeadamente no que respeita à interação entre os inibidores de tirosina cinase e os IRB; a potencial resistência mediada pelos recetores IRA, aquando da utilização de anticorpos anti-IGF1R; e a comunicação cruzada entre o sistema IGF e outras vias de sinalização. A solução passará pelo desenvolvimento de fármacos seletivos para os recetores IGF1R e IRA, e pela associação de inibidores do recetor IGF1R e inibidores de outras vias de sinalização também alteradas no ACC, como sejam o VEGF, FGF, entre outras.

Seria ainda interessante avaliar a resposta à quimio e radioterapia após ou em associação com a utilização destes agentes, uma vez que o IGF1R está implicado na resistência à terapia oncológica convencional.



## 10. Bibliografia:

1. Aberts B (2002) Chapter 17: The cell cycle and programmed cell death. In *Molecular Biology of the Cell* (4<sup>th</sup> edition) pp983-1026. New York: Garland Science.
2. Atzori F et al (2009) Targeting insulin-like growth factor type 1 receptor in cancer therapy *Target Oncol* 4:255-266.
3. Barlaskar F et al (2009) Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma *J Clin Endocrinol Metab* 94:204-212.
4. Belfiore A et al (2009) Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease *Endocr Rev* 30:586-623.
5. Berruti A et al (2005) Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial *Endocr Relat Cancer* 12:657-66.
6. Bertherat J, Bertagna X (2009) Pathogenesis of adrenocortical cancer *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23:261-271.
7. Bielinska M et al (2009) Origin and molecular pathology of adrenocortical neoplasm *Vet Pathol* 46:194-210.
8. Blimoria KY et al (2008) Adrenocortical carcinoma in the United States *Cancer* 113:3130-6.
9. Boulle N et al (2001) Evaluation of plasma insulin-like growth factor binding protein-2 as a marker for adrenocortical tumours *Eur J of Endocrinol* 144:29-36.
10. Boulle N et al (1998) Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors *J Clin endocrinol Metab* 83:1713-1720.
11. Buck E et al 2010 Compensatory insulin receptor (IR) activation on inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R): rationale for cotargeting IGF-1R and IR in cancer *Mol Cancer Ther* 9:2652-64.
12. Bussey KJ, Demeure MJ (2011) Toward a pathway-centered approach for the treatment of adrenocortical carcinoma *Curr Opin Oncol* 23:34-44.
13. Cai H et al (2008) Relationship between the Gh-IGFs axis and the proliferation of the bile duct cancer cell line QBC939 in vitro *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 7:76-81.
14. Cantini G et al (2008) Rosiglitazone inhibits adrenocortical cancer cell proliferation by interfering with the IGF-1R intracellular signaling Doi: 10.1155/2008/904041.
15. Doghman M, Axelson M, Lalli E (2011) Brief communication: Potent inhibitory effect of the cyclolignan picropodophyllin (PPP) on human adrenocortical carcinoma cells proliferation *Am J Cancer Res* 1:356-361.
16. Fassnacht M et al (2011) Adrenocortical carcinoma: a clinician's update *Nat Rev Endocrinol* 7:323-335.

17. Fernandez-Ranvier GG et al (2008) Candidate diagnostic markers and tumor suppressor genes for adrenocortical carcinoma by expression profile of genes on chromosome 11q13 *World J Surg* 32:873-881.
18. Fottner Ch et al (2004) Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis *Horm Metab Res* 36:397-405.
19. Fottner C, Engelhardt D, Weber MM (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.
20. Gabhann FM et al (2010) Systems biology of pro-angiogenic therapies targeting the VEGF system *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2:694-707.
21. Gao Z et al (2002) Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 and IGF-II genes in adrenocortical tumors *J Clin Endocrinol Metab* 87:1170-1176.
22. Gicquel C et al (2001) Anomalies du système des IGFs dans les tumeurs cortico-surréaliennes *Ann Endocrinol (Paris)* 62,2:189-192.
23. Gicquel C et al (1997) Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumours *J Clin Endocrinol Metab* 82:2559-65.
24. Gicquel C, Le Bouc Y (1995) Insulin-like growth factor II (IGF-II) et tumorigenese corticosurréaliennne *Ann Endocrinol* 56:617-618.
25. Giordano TJ et al (2009) Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling *Clin Cancer Res* 15:668-676.
26. Guyton (2006) Chapter 77: Adrenocortical Hormones. *In Textbook of Medical Physiology* (11<sup>th</sup> edition), pp944-960. Elsevier Saunders.
27. Grubbs EG et al (2010) Recurrence of adrenocortical carcinoma following resection: surgery alone can achieve results equal to surgery plus mitotane *Ann Surg Oncol* 17:263-270.
28. Haluska P et al 2010 Safety, tolerability and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patientes with refractory adrenocortical carcinoma *Cancer Chemother Pharmacol* 65:765-773.
29. Hartog H et al (2007) The insulin-like growth factor 1 receptor in cancer: old focus, new future *Eur J Cancer* 43:1895-1904.
30. Hensel N et al (2012) Analysis of the fibroblast growth factor system reveals alterations in a mouse model of spinal muscular atrophy *PLoS ONE* 7(2): e31202.
31. Hewish M, Chau I, Cunningham D (2009) Insulin-like growth factor 1 receptor targeted therapeutics: novel compounds and novel treatment strategies for cancer medicine *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 4:54-72.

32. Jacobs CI (2008) A review of the role of insulin-like growth factor 2 in malignancy and its potential as a modifier of radiation sensitivity *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 20:345-352.
33. Khan TS et al (2000) Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of the adrenocortical cancer patients: long term survival in its adjuvant use *Ann Oncol* 11:1281-1287.
34. Kirschner LS (2006) Review: emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope *J Clin Endocrinol Metab* 91:14-21.
35. Kouyama R et al (2011) Clinicopathological features, biochemical and molecular markers in 5 patients with adrenocortical carcinoma *Endocr J* 58:527-534.
36. Lacroix A (2010) Approach to the patient with adrenocortical carcinoma *J Clin Endocrinol Metab* 95:4812-4822.
37. Laurell C et al (2009) Transcriptional profiling enables molecular classification of adrenocortical tumours *Eur J of Endocrinol* 161:141-152.
38. Lefrançois-Martinez A et al (2004) Decreased expression of the cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors *J Clin Endocrinol Metab* 89:3010-3019.
39. LeRoith D, Roberts Jr CT (2003) The insulin-like growth factor system and cancer *Cancer Lett* 195:127-137.
40. Li R, Pourpak A, Morris S (2009) Inhibition of the Insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) tyrosine kinase as a novel cancer therapy approach *J Med Chem* 52:4981-5004.
41. López-Calderero I, Chávez ES, Garcia-Carbonero R (2010) The insulin-like growth factor pathway as a target for cancer therapy *Clin Transl Oncol* 12:326-338.
42. Luconi M et al (2010) Rosiglitazone impairs proliferation of human adrenocortical cancer: preclinical study in a xenograft mouse model *Endocr Relat Cancer* 17:169-177.
43. Maluf DF, Oliveira BH, Lalli E (2011) Review article: Therapy of adrenocortical cancer: present and future *Am J Cancer Res* 1:222-232.
44. Mind DP et al (2011) Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol Cancer* 10:101.
45. Miller BS et al (2010) Proposal for modification of the ENSAT staging system for adrenocortical carcinoma using tumor grade *Langenbecks Arch Surg* 395:955-961.
46. Patalano A, Brancato V, Mantero F (2009) Adrenocortical cancer treatment *Horm Res* 71 Suppl 1:99-104.
47. Pierce AL et al (2010) Metabolic hormones regulate basal and growth hormone-dependent igf2 mRNA level in primary cultured coho salmon hepatocytes: effects of insulin, glucagon, dexamethasone, and triiodothyronine *J Endocrinol* 204: 331-9.
48. Polat B et al (2009) Radiotherapy in adrenocortical carcinoma *Cancer* 115:2816-23.

49. Pollak M (2008) Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia *Nat Rev Cancer* 8:915-28.
50. Pollak M (2008) Targeting insulin and insulin-like growth factor signalling in oncology *Curr Opin in Pharmacol* 8:384-392.
51. Pollak M, Schernhammer E, Hankinson SE (2004) Insulin-like growth factors and neoplasia *Nat Rev Cancer* 4:505-18.
52. Ragazzon B, Assié G, Bertherat J (2011) Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments *Endocr Relat Cancer* 18:R15-R27.
53. Regateiro FJ (2003) Capítulo XI: Divisão celular e Capítulo XVII: Genes de regulação da proliferação celular. In: Manual de Genética Médica (1ªedição), pp231-242 e pp351-376. Imprensa de Universidade de Coimbra.
54. Ribeiro TC, Latronico AC (2011) Insulin-like growth factor system on adrenocortical tumorigenesis Molecular and Cellular endocrinology *Mol Cell Endocrinol* DOI: 10-1016/j.mce2011.09.042
55. Rosenzweig SA, Atreya HS (2010) Defining the pathway to insulin-like growth factor system targeting in cancer *Biochem Pharmacol* 80:1115-1124.
56. Sabolch BA et al (2010) Adjuvant and definitive radiotherapy for adrenocortical carcinoma *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80:1477-84.
57. Sachdev D, Yee D (2007) Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy *Mol Cancer Ther* 6:1-12.
58. Samani AA et al (2007) The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights *Endocr Rev* 28:20-47.
59. Scartozzi M et al (2011) State of the art and future perspectives for the use of insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) targeted treatment strategies in solid tumors *Discov Med* 11:144-53.
60. Shi Z et al (2007) Primary pigmented nodular adrenocortical disease reveals insulin-like growth factor binding protein-2 regulation by protein kinase A *Growth Horm IGF Res* 17:113-121.
61. Soon PSH et al (2009) Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF-2 and Ki67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas *Endocr Relat Cancer* 16:573-583.
62. Soon PSH et al (2008) Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer *Oncologist* 13:548-561.
63. Sullivan LA, Brekken RA (2010) The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition *mAbs* 2:165-75.
64. Suzuki K, Matsubara H et al (2011) Recent advances in p53 research and cancer treatment *J Biomed Biotechnol* Doi:10.1155/2011/978312.

65. Stratakis CA (2009) New genes and/or molecular pathways associated with adrenal hyperplasias and related adrenocortical tumors *Mol Cell Endocrinol* 300:152-157.
66. Tao Y et al (2007) Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway – therapeutic perspectives in cancer *Nat Clin Pract Oncol* 4:591-602.
67. Terzolo M, Berruti A (2008) Adjunctive treatment of adrenocortical carcinoma *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15:221-226.
68. Tian X. Et al (2011) E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex and the epithelial barrier *J Biomed Biotechnol* Doi:10.1155/2011/567305.
69. Ulanet DB et al (2010) Insulin receptor functionally enhances multistage tumor progression and conveys intrinsic resistance to IGF-1R target therapy *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:10791-8.
70. Wangberg B et al (2010) The long term survival in adrenocortical carcinoma with active surgical management and use of mitotane *Endocr Relat Cancer* 17 265-272.
71. Werner H Buchim I (2010) Basic and clinical significance of IGF-1-induced signatures in cancer *BMC* 8:2
72. Werner H, Bruchim I (2009) The insulin-like growth factor-I receptor as an oncogene *Arch of Physiol and Biochem* 115:58-71.
73. Weber MM, Fottner C, Wolf E (2000) The role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical tumourogenesis *Eur J Clin Invest* 30 Suppl 3:69-75.
74. Weroha SJ, Haluska P (2008) IGF-1 receptor inhibitors in clinical trials – Early lessons *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13:471-483.
75. Wortmann S et al (2010) Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma *Eur J Endocrinol* 162:349-356.
76. Zhang H et al (2010) Inhibitor of cancer cell proliferation and metastasis by insulin receptor downregulation *Oncogene* 29:2517-27.
77. Zini L, Porpiglia F, Fassnacht M (2011) Contemporary management of adrenocortical carcinoma *Eur Urol* 60:1055-1065.
78. Zoubeidi A et al (2010) Clusterin facilitates COMMD1 and I- $\kappa$ B degradation to enhance NF- $\kappa$ B activity in prostate cancer cells *Mol Cancer Res* 8: 119-30;
79. Zsippai A et al 2011 Review article: mRNA and microRNA expression patterns in adrenocortical cancer *Am J Cancer Res* 1:618-628.