

**ELAINE SILVEIRA**

**Análise da viabilidade das células H295R,  
linhagem de carcinoma adrenocortical tumoral humano,  
tratadas com diferentes drogas antitumorais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Prof. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo  
2014

## RESUMO

SILVEIRA, E. **Análise da viabilidade das células H295R, linhagem de carcinoma adrenocortical tumoral humano, tratadas com diferentes drogas antitumorais.** 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O carcinoma adrenocortical (CAC) é um tumor maligno raro, com mau prognóstico. A cirurgia oferece a maior chance de cura e o adrenolítico mitotano é o quimioterápico utilizado há mais de 50 anos, mas ocorrem altas taxas de recidivas e metástases. Nesse trabalho tivemos como objetivo testar a ação antitumoral de diferentes tipos de drogas como o everolimus, ácido zoledrônico, sunitinib, nilotinib e imatinib, que têm como alvos moléculas hiperexpressas nos carcinomas adrenocorticais, em tratamentos isolados ou em combinação com o mitotano, utilizando a linhagem de células de carcinoma adrenocortical humano H295R, em cultura em monocamada (2D) e esferoides (3D). A caracterização morfológica e funcional dos esferoides foi realizada com marcações PAS, Oil Red O, picosirius vermelho e faloidina. As células foram tratadas e analisadas por ensaios de viabilidade e de morte celular, como o ensaio de MTS, ensaios multiparamétricos e microscopia confocal. Na monocamada, todas as drogas testadas tiveram maior efeito quando utilizadas em conjunto com o mitotano, sendo que os tratamentos que promoveram a IC50 na combinação com o mitotano 10  $\mu\text{M}$  foram o everolimus 10  $\mu\text{M}$  em 72 h ( $50\pm 0,02\%$   $p\leq 0.001$ ), o imatinib 10  $\mu\text{M}$  em 72 h ( $52\pm 0.01\%$   $p\leq 0.001$ ), o sunitinib 5  $\mu\text{M}$  ( $47\pm 0.02\%$   $p\leq 0.001$ ) em 24 h, e o nilotinib 5  $\mu\text{M}$  em 48 h ( $59\pm 0,03\%$   $p\leq 0.001$ ), com evidência predominante de apoptose em todas as drogas testadas. Os esferoides também responderam aos tratamentos com as duas drogas, no entanto, foi necessária a combinação do everolimus 10  $\mu\text{M}$  com o mitotano 30  $\mu\text{M}$  para se obter diminuição de  $32\pm 0.02\%$   $p\leq 0.001$  na viabilidade das células. Os esferoides tratados com nilotinib tiveram diminuição da viabilidade tanto com a droga isolada ( $41\pm 0.02\%$   $p\leq 0.001$ ), quanto em combinação com o mitotano ( $57\pm 0.03\%$   $p\leq 0.001$ ). Diferente da monocamada, os eventos de morte celular evidenciados nos esferoides foram de apoptose e necrose. Em resumo, as diferenças nas respostas das culturas 2D e 3D sugerem que os esferoides são mais resistentes aos tratamentos, como ocorre com tumores *in vivo*, e podem representar uma importante abordagem para estudos de CAC. O ensaio de MTS mostrou-se eficaz nos ensaios de citotoxicidade, e é um método simples e rápido para testes de drogas, mas ensaios multiparamétricos oferecem respostas mais abrangentes. A IC50 mostrou ser um parâmetro importante para o teste de drogas na cultura 2D. O nilotinib foi o inibidor tirosina quinase que tanto isoladamente quanto em combinação com o mitotano induziu as respostas mais próximas ou superiores a 50% de citotoxicidade, tanto no modelo de cultura 2D quanto 3D, resultados que se apresentam promissores para o tratamento dos carcinomas adrenocorticais, bem como de estudos dos mecanismos que envolvem sua ação.

**Palavras-chave:** Carcinoma adrenocortical. Esferoides. Mitotano. Everolimus. Nilotinib.

## ABSTRACT

SILVEIRA, E. **Antitumor effects of different cytotoxic drugs on the human adrenocortical tumor cells H295R**. 2014. 67 p. Masters thesis (Morphofunctional Sciences) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare malignant tumor with poor prognosis. The primary treatment is surgery and the adrenolytic mitotane is the most widely used chemotherapy, but occur high rates of local recurrence and metastasis. In this study we aimed to test the antitumor action of different drugs such as everolimus, zoledronic acid, sunitinib, nilotinib and imatinib, in single treatments or in combination with mitotane, using a human adrenocortical carcinoma H295R cells in monolayer (2D) or spheroids (3D). The spheroids were both morphological and functionally characterized by PAS, Oil Red O, Picrosirius Red and Falloidin staining. Cells were treated and analyzed for viability assays and cell death by using MTS assay, High Content Screening Analyzing Method and confocal microscopy. In monolayer, all drugs tested were more effective in decrease viability when used in combination with mitotane than alone. Treatments that promoted significant ( $p \leq 0.001$ ) IC50 effect in combination with 10  $\mu\text{M}$  mitotane were 10  $\mu\text{M}$  everolimus for 72 h ( $50 \pm 0.02\%$ ), 10  $\mu\text{M}$  imatinib for 72 h ( $52 \pm 0.01\%$ ), 5  $\mu\text{M}$  sunitinib ( $47 \pm 0.02\%$ ) for 24 h, and 5  $\mu\text{M}$  nilotinib for 48 h ( $59 \pm 0.03\%$ ). The spheroids cell cultures showed attenuated responses than in monolayer, and required higher drugs concentration. 10  $\mu\text{M}$  nilotinib decrease cell viability in  $41 \pm 0.02\%$  ( $p \leq 0.001$ ) after 72h, and in combination with 30  $\mu\text{M}$  mitotane the cell viability was reduced to  $57 \pm 0.03\%$  ( $p \leq 0.001$ ), with induction of apoptosis and necrosis. In summary, the spheroids are more resistant to treatment and may represent an important approach for studies of ACC. The MTS assay was an effective cytotoxicity assay, and is a simple and rapid method for drug testing, however, multiparameter assay provided more comprehensive responses. The IC50 showed be an important parameter for testing drugs in 2D culture system. Nilotinib was the tyrosine kinase inhibitor that, either alone or in combination with mitotane, induced higher cytotoxicity, in both 2D and 3D cell cultures, showing promising results for the treatment of adrenocortical carcinoma, as well as for the studies of its mechanism of action.

**Keywords:** Adrenocortical carcinoma. Spheroids. Mitotane. Everolimus. Nilotinib

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Tumores Adrenocorticais

Os tumores adrenocorticais (TAC) são neoplasias que podem ocorrer na forma benigna, como adenomas adrenocorticais (AAC), com uma incidência entre 3 a 7% em adultos acima de 50 anos. Muitos dos tumores adrenocorticais são encontrados de forma incidental durante a realização de exames de imagem e são denominados incidentalomas (KLOOS et al., 1995). Por outro lado, o carcinoma adrenocortical (CAC) é uma neoplasia rara e com mau prognóstico (BERTAGNA; ORTH, 1981; DIDOLKAR et al., 1981). Em pacientes com doença avançada a sobrevida é menor que 50% em 1 ano e menor do que 10% em 5 anos (ICARD et al., 1992; JENSEN et al., 1991; POMMIER; BRENNAN, 1992), sendo responsável por 0,2% das mortes relacionadas ao câncer (LUTON et al., 1990). Com o avanço no diagnóstico por imagem, e o aumento na realização de exames nos últimos anos, muitas lesões assintomáticas das suprarrenais têm sido diagnosticadas, o que aumentou o número de casos. Em exames de imagem por tomografia computadorizada ou ressonância magnética nota-se uma massa volumosa e heterogênea, com limites irregulares, focos de necrose e pequeno conteúdo de gordura (BERTAGNA, 2010; LIBE et al., 2007; JOHANSSSEN et al., 2010). No Brasil, nas regiões Sul e Sudeste, a incidência de tumores adrenocorticais é alta, 12 casos por milhão por ano, com prevalência para o tipo infantil. Embora as razões da elevada incidência no Brasil ainda não sejam totalmente conhecidas, a ocorrência de uma mutação germinativa no gene supressor de tumor TP53 é encontrada na maioria das crianças afetadas (ALMEIDA; LATRONICO, 2007; RIBEIRO et al., 2001). No entanto, podem ocorrer outras alterações genéticas (ALMEIDA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010; BRITO et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 2000; DOGHMAN et al., 2010) e influência de fatores ambientais (SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA et al., 1997).

## 1.2 Tratamentos

Há um consenso de que a ressecção cirúrgica da doença primária oferece a melhor chance de cura (ICARD et al., 1992; ICARD et al., 2001; SCHTEINGART et al., 2005). Estudos em 96 pacientes mostraram uma taxa de sobrevivência de 5 anos nos pacientes que obtiveram ressecção total da doença primária (49%), em contraste com 9% após a ressecção incompleta (HAAK et al., 1994). No entanto, mesmo após exérese tumoral completa, a maioria dos pacientes apresenta recidiva local ou metástase (ALLOLIO; FASSNACHT, 2006; WAJCHENBERG et al., 2000). Esses dados corroboram com estudos retrospectivos que utilizaram 58 pacientes, dos quais 80% apresentaram reincidência ou metástases (BERTAGNA; ORTH, 1981). Durante a progressão do carcinoma adrenocortical os pacientes apresentam metástases, principalmente no fígado, pulmão, linfonodos e ossos (FASSNACHT; ALLOLIO, 2009).

Por décadas, o tratamento mais convencional para o câncer tem sido a radioterapia e a quimioterapia, metodologias que não diferenciam células tumorais de células saudáveis, o que resulta em uma variedade de efeitos colaterais e adversos. Para o tratamento do carcinoma adrenocortical o quadro não é diferente, no entanto, a radioterapia não é efetiva, conforme mostrado em uma retrospectiva realizada com pacientes submetidos à cirurgia para retirada da doença primária no período de 1998 a 2011 (HABRA et al., 2013). Nesse pacientes, não houve diferença na progressão da doença entre aqueles que receberam radioterapia e o grupo que não recebeu. A radioterapia pode ser paliativa em metástases ósseas (SCHTEINGART et al., 2005), e diminuir o índice de reincidência, mas não alterou o tempo livre de doença e sobrevida global em um grupo de pacientes tratados no período de 1986-2004 (FASSNACHT et al., 2006).

O quimioterápico mitotano (1,1-dichloro-2 (o-chlorophenyl)-2-(p-chlorophenyl) ethane ou o,p'-diclorodifenildicloroetano; o,p'-DDD) é o mais utilizado há mais de 50 anos (BERGENSTAL et al., 1959) e, apesar de seu mecanismo de ação ainda não ter sido completamente elucidado, sabe-se que o medicamento está relacionado com a redução da produção hormonal e regressão de metástases (BOVEN et al., 1984; FASSNACHT et al., 2013). Em tumores inoperáveis, o mitotano, isoladamente ou em associação a outros agentes citotóxicos, permanece o tratamento de escolha (KIRSCHNER, 2006).

O mitotano (o,p'-DDD) exerce um efeito citotóxico direto sobre as mitocôndrias das células adrenocorticais, normais ou neoplásicas, produzindo degeneração das zonas fasciculada e reticulada do córtex adrenal, atrofia celular e insuficiência adrenal (BERGENSTAL et al., 1960; SCHTEINGART et al., 1993). O metabolismo do mitotano parece envolver duas reações que levam à produção de radicais livres, resultando em apoptose (CAI et al., 1995), e inibição da esteroidogênese por meio da CYP11A1, enzima mitocondrial que catalisa o colesterol em pregnonelona (CAI et al., 1997). A diminuição da secreção de aldosterona e cortisol também foi mostrada (ASP et al., 2010), provavelmente por inibição da atividade da enzima 5 $\alpha$ -redutase envolvida na esteroidogênese (CHORTIS et al., 2013). A dosagem de mitotano deve ser ajustada até que os níveis plasmáticos atinjam a janela terapêutica de 14 mg/l, dose mínima necessária para produzir efeito. As concentrações maiores que 20 mg/l estão relacionadas a efeitos neurológicos severos, sendo a citotoxicidade do mitotano a maior limitação que pode levar à descontinuidade do tratamento (HAAK et al., 1994; HERMSEN et al., 2011; VAN SLOOTEN et al., 1984), uma vez que os efeitos adversos apresentam uma relação dose-dependente (SCHTEINGART et al., 1982). Para produzir efeitos terapêuticos, o mitotano necessita ser metabolizado pelas células tumorais, motivo pelo qual os tumores adrenocorticais respondem de maneiras diferentes ao quimioterápico (REIF et al., 1975; REIF; SINSHEIMER, 1975). A hipótese mais aceita é que a morte celular induzida pelo fármaco no córtex adrenal ocorra após uma hidroxilação catalisada pela CYP e uma subsequente desidro-halogenação espontânea na cadeia  $\beta$ -carbônica lateral do o,p'-DDD. O metabólito resultante, haleto de acila, altamente reativo, liga-se covalentemente às proteínas mitocondriais reagindo com macromoléculas das células do córtex adrenal (CAI et al., 1995). Dados recentes e estudos nas linhagens H295R e SW13 sugerem que a regulação negativa da cadeia respiratória mitocondrial esteja envolvida, mas os mecanismos ainda não estão claros (HESCOT et al., 2013; POLI et al., 2013).

Embora a quimioterapia citotóxica com mitotano não seja satisfatória para os carcinomas adrenocorticais, com uma resposta em menos de 50% dos tumores e por tempo limitado, uma análise retrospectiva com pacientes tratados no período de 1985 a 2004 indicou que o uso do mitotano como terapia adjuvante tem potencial de prolongar a sobrevida, tempo de recidiva e metástase (TERZOLO et al., 2007). Diferente dos resultados apresentados por Terzolo, uma retrospectiva com 218

pacientes submetidos à cirurgia e acompanhados por 88 meses não mostrou diferença entre os que receberam mitotano como tratamento adjuvante e os que não receberam, sendo que os dois grupos apresentaram as mesmas taxas de recidivas e metástases (GRUBBS et al., 2010).

Portanto, existem trabalhos sobre tratamentos alternativos do carcinoma adrenocortical utilizando o mitotano associado a diferentes drogas antitumorais. Os regimes mais comuns combinados com mitotano são cisplatina/etoposídeo e cisplatina/etoposídeo/doxorubicina, com uma taxa de resposta de aproximadamente 50% com um tempo médio de sobrevivência de 2 anos (BERRUTI et al., 1998; BERRUTI et al., 2005; FASSNACHT et al., 2012). Alternativamente, um regime de estreptozotocina associado ao mitotano induziu a taxa de resposta de 35% com tempo médio de sobrevida de 16 meses (ZANCANELLA et al., 2006). O **FIRM-ACT** (First International Randomized Multicentre Trial in Adrenocortical Tumors) estabeleceu o protocolo italiano que associa o mitotano com cisplatina, etoposídeo e doxorubicina (EDP/M) como o tratamento de primeira linha para o tratamento dos carcinomas adrenocorticais em casos de doença avançada inoperável, seja local ou metástase (FASSNACHT et al., 2012).

### 1.3 Alterações moleculares

Apesar da maioria dos tumores adrenocorticais serem esporádicos, muitas vezes estão associados a doenças congênitas ou familiares (LIBE; BERTHERAT, 2005). Vários estudos têm possibilitado a caracterização de mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese adrenal e têm revelado alterações específicas de sinalização dos carcinomas adrenocorticais, bem como dos fenômenos envolvidos com resistência à quimioterapia e formação de metástases. Citaremos aqui as mais relevantes no contexto deste trabalho.

Desde o trabalho de Folkman (FOLKMAN et al., 1971), que mostrou a dependência dos tumores de adequado fornecimento sanguíneo, sugerindo que os fatores de crescimento endotelial vascular (*VEGFs*) podem ser um possível alvo para terapias antitumorais, estudos mostraram a relação da angiogênese com crescimento tumoral. No caso do carcinomas adrenocorticais, o fenótipo angiogênico também é caracterizado pela hiperexpressão de *VEGF* (BERNINI et al., 2002; MARINIELLO et al., 2012). Estudos realizados em 43 pacientes com tumores

adrenocorticais indicaram diferenças no fenótipo angiogênico dos adenomas e carcinomas que podem estar relacionadas com a progressão tumoral (DE FRAIPONT et al., 2000).

Foi descrito que os carcinomas adrenocorticais hiperexpressam o *IGF2* - fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 2 (ALMEIDA et al., 2008; BRITO et al., 2012; DE FRAIPONT et al., 2000; WEBER et al., 1997). Por outro lado, os tumores pediátricos apresentam alta expressão do *IGFR-1*, receptor do tipo tirosina quinase que modula os efeitos proliferativos de *IGF2* (GIORDANO et al., 2003). Portanto, o aumento da expressão destes fatores pode fazer parte do desenvolvimento destes tumores (LIBE; BERTHERAT, 2005), já que estão presentes em cerca de 90% dos tumores adrenocorticais. Quando *IGFR-1* está ativado desencadeia uma cascata de sinalização que envolve proliferação, migração e metástases (ROSENZWEIG; ATREYA, 2010), e, portanto, o caracteriza como um importante alvo para terapias dirigidas.

A proteína mTOR (mammalian target of rapamycin) é uma proteína quinase da via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K/AKT) e um regulador central do crescimento, metabolismo e sobrevivência celular em resposta a hormônios, fatores de crescimento, como o *IGF* e *VEGF*, nutrientes, sinais de energia e estresse (KONINGS et al., 2009). Alterações na via mTOR têm sido encontradas em vários tumores humanos, independente da desregulação da via *IGF* e, por isso, o bloqueio desse receptor tem sido considerado um alvo para terapias anti-neoplásicas e em tratamentos de carcinomas adrenocorticais (DE MARTINO et al., 2010; DE MARTINO et al., 2012; DOGHMAN et al., 2010). Trabalhos com os inibidores mTOR, como o sirolimus e temsirolimus, mostraram efeitos no ciclo celular, apoptose e secreção de cortisol em células adrenocorticais tumorais (MARINIELLO et al., 2012).

Alguns estudos mostraram que as células adrenocorticais são resistentes ao tratamento quimioterápico devido à hiperexpressão de MDR-1 (*mdr-1/Pgp*), proteína multirresistente às drogas, codificada pelo gene *ABCB1*, cujo produto é uma fosfoglicoproteína (*Pgp*) presente na membrana plasmática que aumenta o fluxo da droga para fora da célula (AHLMAN et al., 2001; BATES, 1991; FLYNN et al., 1992). Essa redução no acúmulo intracelular da droga é atribuída ao aumento na expressão das proteínas transportadoras *ABCB1*, que utilizam ATP para catalisar o efluxo das drogas (DEAN et al., 2001). O aumento destas proteínas pode ter relação com a resistência dos tumores adrenocorticais aos tratamentos (BATES, 1991).



Alterações cromossômicas como a amplificação do locus 9q34 com ganho de material genético podem envolver transcrições aberrantes do oncogene *ABL*. Alguns estudos sugerem sua participação na formação de tumores adrenocorticais (DOHNA et al., 2000; FIGUEIREDO et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 2000; ZHAO et al., 1999).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) pertencem à família TGF (Fator de Crescimento Transformador), e estão envolvidas em várias funções celulares, como osteogênese e diferenciação celular. TGF- $\beta$ 1 regula o desenvolvimento da adrenal e a diminuição na sua expressão, assim como das BMPs 2 e 5 nas linhagens H295R e SW13, e em amostras de tecidos tumorais, já foram relacionadas com inibição da proliferação, viabilidade celular e esteroidogênese em carcinoma adrenocortical (JOHNSEN et al., 2009; JOHNSEN; BEUSCHLEIN, 2010).

#### 1.4 Terapias moleculares dirigidas

Atualmente as terapias alvo, também conhecidas como terapia molecular dirigida, representam uma abordagem integrativa para o tratamento do câncer. Estes tratamentos inibem moléculas específicas através de inibidores de tirosina quinase que têm papel no crescimento do tumor, e cujos alvos frequentemente estão alterados em pacientes com câncer. Considerando as alterações moleculares mencionadas no item 1.3, foram selecionados inibidores tirosina quinase que tem como alvo vias que estão hiper expressas nos tumores adrenocorticais. As proteínas tirosina quinase funcionam como componentes de vias de transdução de sinal e têm papel fundamental em diversos processos biológicos, tais como controle do crescimento celular, metabolismo, diferenciação e apoptose.

O **Sunitinib** é um inibidor potente de oito proteínas quinases, entre eles o VEGFR 1, 2 e 3 (receptores do fator de crescimento endotelial vascular) e PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas). O sunitinib se liga reversivelmente ao site de ligação do ATP na quinase alvo, dessa forma inibindo a atividade catalítica da quinase (ROSKOSKI, 2007). Estudos mostraram que o sunitinib inibe ABCB-2/MDR, fator de multiresistência às drogas, o que fornece um racional ao seu uso em terapias combinadas (DAI et al., 2009). Trabalhos realizados em tumores adrenocorticais *in vitro* mostraram que o sunitinib inibe a proliferação celular e altera a esteroidogênese das linhagens H295R e SW13 (KROISS et al., 2011; KROISS et

al., 2012). Esse é um dos motivos pelos quais considera-se os inibidores tirosina quinase (TK) como potenciais medicamentos para o tratamento dos carcinomas adrenocorticais (XU et al., 2011), por ser uma enzima que participa do metabolismo celular e pode inibir a angiogênese.

O **Imatinib/STI571** é um inibidor seletivo de transdução de sinal que tem como alvo várias proteínas tirosinas quinases (TKs), interagindo competitivamente com o local de ligação do ATP destas TKs, entre elas o receptor de c-Kit. Sem ATP, a fonte de fósforo utilizado para a função da quinase, a molécula Kit não pode fosforilar o substrato, o que inibe a proliferação celular e induz a apoptose. Também é inibidor de receptor de Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (*PDGF-R  $\alpha$  e  $\beta$* ), o gene *ABL* e suas formas oncogênicas, a mais conhecida *BCR-ABL* presente em células leucêmicas cromossomo Philadelphia positivo (DRUKER et al., 1996; MOL et al., et al., 2004; MOL; FABBRO; HOSFIELD 2004). O **Nilotinib/AMN 107** é a segunda geração do imatinib (DEREMER et al., 2008), é considerado 30 vezes mais potente do que seu antecessor e inibe a CYP-3A4, PDGF-R, receptores c-kit e *ABL* (MELNICK et al., 2006; WEISBERG et al., 2006). Nilotinib também reverte MDR inibindo a atividade dos transportadores ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR (TIWARI et al., 2009).

O **Everolimus/Rad 001** representa a evolução de uma droga desenvolvida na década de 1970, chamada rapamicina (ou sirolimus), produto bacteriano que age inibindo a ação da enzima mTOR, um inibidor TK e da angiogênese. Estudos in vitro e em tumores adrenocorticais mostraram que o everolimus inibe a sinalização de mTOR, reduzindo o crescimento de células tumorais adrenocorticais (DE MARTINO et al., 2010; DOGHMAN et al., 2010; DE MARTINO et al., 2012; FRAENKEL et al., 2013). Estudos utilizando everolimus isoladamente ou em combinação com outras drogas, em ensaios em linhagens de carcinoma adrenocortical e em pacientes reforçam o racional que terapias envolvidas na regulação de mTOR podem representar um novo instrumento terapêutico (MARINIELLO et al., 2012).

O **Ácido Zoledronico (ZOL)** é um bifosfonato (BF) que, além de ser um inibidor de reabsorção óssea, tem demonstrado potencial ação antitumoral em tumores de mama (SENARATNE et al., 2000), câncer de próstata (OADES et al., 2003) e mieloma múltiplo (IGUCHI et al., 2003). Sua ação envolve indução de apoptose evidenciada por ativação de caspases, fragmentação de DNA, liberação de citocromo-c e perda de GTPases de membrana (FROMIGUE et al., 2000;

SENARATNE et al., 2002). O efeito anti-tumoral do ZOL contra metástases viscerais em paciente com carcinoma adrenocortical foi mostrada por Boudou-Rouquette e colaboradores (2009). Além disso, os efeitos de dois BFs clodronato (CLO) e Pamidronate (PAM) na linhagem H295R e em culturas primárias de células adrenocorticais de bovinos, foram de morte celular e diminuição da secreção hormonal, através da inibição da atividade da 21-hidroxilase - P450c21 (FASSNACHT et al., 2002). A P450c21 é uma enzima exclusiva do córtex adrenal envolvida na esteroidogênese (RODRIGUEZ et al., 1997). Estudos também demonstraram que o tratamento com ZOL resulta em aumento na expressão de BMP-2 (PAN et al., 2004), fator que se apresenta com baixa expressão nos carcinomas adrenocorticais.

### **1.5 Modelos de cultura de células: Monocamada (2D) e Esferoides (3D)**

A cultura de células constitui uma importante ferramenta para o estudo do comportamento dos tumores. Entre os sistemas in vitro que têm sido mais utilizados como modelos para o estudo de tumores adrenocorticais são a linhagem de tumor de camundongo Y-1 (YASUMURA et al., 1966), e as linhagens tumorais humanas SW-13, NCI-H295 e sua variação H295R (GAZDAR et al.; LEIBOVITZ et al., 1973; 1990; RAINEY et al., 1994; RAINEY et al., 2004). Além das culturas tradicionais em monocamada, a técnica de cultivo de esferoides, inicialmente apresentada por Moscona em 1965, tem se tornado um modelo muito utilizado para culturas em 3D em ensaios de testes radiológicos (SUTHERLAND AND DURAND, 1976), e em estudos de drogas antitumorais (FRIEDRICH et al., 2007; YUHAS et al., 1977; TWENTYMAN, 1980). Embora o cultivo 2D - monocamada - forneça elementos sobre proliferação e migração celular, a avaliação bidimensional apresenta limitações para o estudo das interações intercelulares e das células com a matriz extracelular. Os modelos tridimensionais apresentam condições fisiológicas e organização histológica mais comparável ao ambiente de um tumor avascular, como gradientes de oxigênio, pH, nutrientes e presença de necrose (BATES et al., 2000; DESOIZE, 2000). Neste aspecto, os agregados tridimensionais mostram-se uma ferramenta útil para avaliação de novas terapias antitumorais.

Em conjunto, as informações acima permitiram sugerir algumas hipóteses nesse trabalho: 1) que existem diferenças importantes na resposta aos tratamentos

em função do método de cultivo de células provenientes de tumores adrenocorticais, se em monocamada ou através da geração de esferoides; 2) que é possível analisar a ação citotóxica do mitotano e de inibidores tirosina quinase, isolados ou em terapias combinadas, por ensaio de MTS, tanto em monocamada como já está bem estabelecido, como em esferoides, para ser utilizado como indicativo de resposta no tratamento do paciente; 3) que metodologias avançadas de análises multiparamétricas pode ser uma importante ferramenta para screening de drogas; 4) que terapias multialvos, dirigidas a mecanismos moleculares específicos, utilizados em combinação com o mitotano, representam uma abordagem integrativa que podem ter resultados promissores no tratamento do carcinoma adrenocortical.

## CONCLUSÃO

- Nas células em monocamada todas as drogas utilizadas tiveram maior efeito com o mitotano, confirmando que tratamentos conjuntos aumentam a atividade citotóxica;
- Nos esferoides, o sunitinib, nilotinib e o everolimus apresentaram respostas citotóxicas mais significativas. No entanto, o sunitinib não apresentou diferença quando utilizado sozinho e em conjunto como mitotano. Além disso, os resultados mais próximos ou superiores à IC50 ocorreram com o nilotinib sozinho e em combinação com o mitotano;
- Os esferoides parecem mimetizar o efeito de difusão de nutrientes e oxigênio no microambiente tumoral, assim como fatores relacionados à resistência aos tratamentos;
- O ensaio de MTS é simples e rápido. No entanto, ensaios multiparamétricos (High Content Screening / High Content Analysing) oferecem respostas mais abrangentes, e podem ser uma importante ferramenta para screening de drogas;
- o evento predominante de morte celular em monocamada foi de apoptose, mas nos esferoides também foram evidenciadas marcações de necrose;
- Apenas as drogas que tiveram valores  $\geq$  IC50 na monocamada apresentaram efeito nos esferoides;
- os resultados sugerem que novas análises da ação do inibidor tirosina quinase nilotinib, sozinho e em conjunto com o mitotano são necessárias para uma maior compreensão dos seus mecanismos de ação nos carcinomas adrenocorticais;

## REFERÊNCIAS\*

- AHLMAN, H. et al. Cytotoxic treatment of adrenocortical carcinoma. **World J. Surg.**, v. 25, n. 7, p. 927-933, 2001.
- ALLOLIO, B.; FASSNACHT, M. Clinical review: adrenocortical carcinoma: clinical update. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 6, p. 2027-2037, 2006.
- ALMEIDA, M. Q. et al. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 93, n. 9, p. 3524-3531, 2008.
- ALMEIDA, M. Q.; LATRONICO, A. C. The molecular pathogenesis of childhood adrenocortical tumors. **Horm. Metab. Res.**, v. 39, n. 6, p. 461-466, 2007.
- ALMEIDA, M. Q. et al. Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, n. 3, p. 1458-1462, 2010.
- ASP, V. et al. Chiral effects in adrenocorticolytic action of o,p'-DDD (mitotane) in human adrenal cells. **Xenobiotica**, v. 40, n. 3, p. 177-183, 2010.
- BATES, R. C.; EDWARDS, N. S.; YATES, J. D. Spheroids and cell survival. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 36, n. 2-3, p. 61-74, 2000.
- BATES, S. E. Mitotane enhances cytotoxicity of chemotherapy in cell lines expressing a multidrug resistance gene MDR-1/pglycoprotein which is also expressed by adrenocortical carcinoma **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 73, n. 1, p. 18-29, 1991.
- BERGENSTAL, D. M. et al. Chemotherapy of adrenocortical cancer with o,p'ddd. **Annals of Internal Medicine**, v. 53, n. 4, p. 672-682, 1960.
- \_\_\_\_\_. Regression of adrenal cancer and suppression of adrenal function in man by o,p' ddd. **Transactions of the Association of American Physicians**, v. 72, p. 341-350, 1959.
- BERNINI, G. P. et al. Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 11, p. 4961-4965, 2002.
- BERRUTI, A. et al. Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. **Cancer**, v. 83, n. 10, p. 2194-2100, 1998.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

\_\_\_\_\_. Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. **Endocrine-Related Cancer**, v. 12, n. 3, p. 657-666, 2005.

BERTAGNA, C.; ORTH, D. N. Clinical and laboratory findings and results of therapy in 58 patients with adrenocortical tumors admitted to a single medical center (1951 to 1978). **Am. J. Med.**, v. 71, n. 5, p. 855-875, 1981.

BERTAGNA, X. Adrenal tumors. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 24, n. 6, p. vii, Dec 2010.

BOVEN, E. et al. Complete response of metastasized adrenal-cortical carcinoma with o,p'-ddd - case-report and literature-review. **Cancer**, v. 53, n. 1, p. 26-29, 1984.

BOUDOU-ROUQUETTE, P. et al. Antitumoral effect of the bisphosphonate zoledronic acid against visceral metastases in an adrenocortical cancer patient. **Ann. Oncol.**, 20, 1747. 2009.

BRITO, L. P. et al. The role of fibroblast growth factor receptor 4 overexpression and gene amplification as prognostic markers in pediatric and adult adrenocortical tumors. **Endocrine-Related Cancer**, v. 19, n. 3, p. L11-13, 2012.

CAI, W. et al. Metabolic activation and binding of mitotane in adrenal cortex homogenates. **J. Pharm. Sci.**, v. 84, n. 2, p. 134-138, 1995.

\_\_\_\_\_. Adrenal proteins bound by a reactive intermediate of mitotane. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 537-540, 1997.

CHORTIS, V. et al. Mitotane therapy in adrenocortical cancer induces CYP3A4 and inhibits 5 $\alpha$ -reductase, explaining the need for personalized glucocorticoid and androgen replacement. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 98, n. 1, p. 161-171, 2013.

CORY, A. H. et al. Use of an Aqueous Soluble Tetrazolium Formazan Assay for Cell-Growth Assays in Culture. **Cancer Communications**, v. 3, n. 7, p. 207-221, 1991.

DAI, C.-L. et al. Sensitization of ABCG2-overexpressing cells to conventional chemotherapeutic agent by sunitinib was associated with inhibiting the function of ABCG2. **Cancer Letters**, v. 279, n. 1, p. 74-83, 2009.

DE FRAIPONT, F. et al. Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, n. 12, p. 4734-474, 2000.

DE MARTINO, M. C. et al. The role of mTOR inhibitors in the inhibition of growth and cortisol secretion in human adrenocortical carcinoma cells. **Endocrine-Related Cancer**, v. 19, n. 3, p. 351-364, 2012.

\_\_\_\_\_. Role of the mTOR Pathway in Normal and Tumoral Adrenal Cells. **Neuroendocrinology**, v. 92, p. 28-34, 2010.

DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **J. Lipid. Res.**, v. 42, n. 7, p. 1007-1017, 2001.

DEREMER, D. L.; USTUN, C.; NATARAJAN, K. Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 11, p. 1956-1975, 2008.

DESOIZE, B. Contribution of three-dimensional culture to cancer research. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 36, n. 2-3, p. 59-60, 2000.

DIDOLKAR, M. S. et al. Natural history of adrenal cortical carcinoma: a clinicopathologic study of 42 patients. **Cancer**, v. 47, n. 9, p. 2153-2161, 1981.

DOGHMAN, M. et al. Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. **Cancer Res.**, v. 70, n. 11, p. 4666-4675, 2010.

DOHNA, M. et al. Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. **Genes Chromosomes & Cancer**, v. 28, n. 2, p. 145-152, 2000.

DRUKER, B. J. et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. **Nat. Med.**, v. 2, n. 5, p. 561-566, 1996.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FASSNACHT, M.; ALLOLIO, B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 23, n. 2, p. 273-289, 2009.

FASSNACHT, M. et al. Clodronate inhibits adrenocortical cell proliferation and P450c21 activity. **J. Endocrinol.**, v. 174, n. 3, p. 509-516, 2002.

\_\_\_\_\_. Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 11, p. 4501-4504, 2006.

FASSNACHT, M.; KROISS, M.; ALLOLIO, B. Update in Adrenocortical Carcinoma. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 12, p. 4551-4564, 2013.

FASSNACHT, M. et al. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 366, n. 23, p. 2189-2197, 2012.

FIGUEIREDO, B. C. et al. Amplification of 9q34 in childhood adrenocortical tumors: a specific feature unrelated to ethnic origin or living conditions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 10, p. 1217-1224, 2000.



\_\_\_\_\_. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, n. 3, p. 1116-1121, 1999.

FLYNN, S. D. et al. P-Glycoprotein expression and multidrug resistance in adrenocortical carcinoma. **Surgery**, v. 112, n. 6, p. 981-986, 1992.

FOLKMAN, J. et al. Tumor angiogenesis - therapeutic implications. **New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971.

FRAENKEL, M. et al. Everolimus therapy for progressive adrenocortical cancer. **Endocrine**, v. 44, n. 1, p. 187-192, 2013.

FRIEDRICH, J.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 83, n. 11-12, p. 849-871, 2007.

FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309-324, 2009.

FROMIGUE, O.; LAGNEAUX, L.; BODY, J. J. Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 11, p. 2211-2221. 2000.

GAZDAR, A. F. et al. Establishment And Characterization of a Human Adrenocortical Carcinoma Cell-Line that Expresses Multiple Pathways of Steroid-Biosynthesis. **Cancer Research**, v. 50, n. 17, p. 5488-5496, 1990.

GENTILIN, E. et al. Inhibitory effects of mitotane on viability and secretory activity in mouse gonadotroph cell lines. **Reprod. Toxicol.**, v. 45C, p. 71-76, 2014.

\_\_\_\_\_. Mitotane reduces human and mouse ACTH-secreting pituitary cell viability and function. **Journal of Endocrinology**, v. 218, n. 3, p. 275-285, 2013.

GIORDANO, T. J. et al. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. **American Journal of Pathology**, v. 162, n. 2, p. 521-531, 2003.

GROSS, D. J. et al. The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant endocrine tumors positive for c-kit or PDGF-R. **Endocr. Relat. Cancer.**, v. 13, n. 2, p. 535-540, 2006.

GRUBBS, E. G. et al. Recurrence of adrenal cortical carcinoma following resection: surgery alone can achieve results equal to surgery plus mitotane. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 17, n. 1, p. 263-270, 2010.

GUEORGUIEV, M.; BHATTACHARYA, S.; GROSSMAN, A. Adrenocortical Cancer: A Therapeutic Approach with Everolimus (RAD001). **Neuroendocrinology**, v. 92, n. 1, p. 33-33, 2010.

HAAK, H. R. et al. Optimal Treatment of Adrenocortical Carcinoma with Mitotane - Results in a Consecutive Series of 96 Patients. **British Journal of Cancer**, v. 69, n. 5, p. 947-951, 1994.

HABRA, M. A. et al. A retrospective cohort analysis of the efficacy of adjuvant radiotherapy after primary surgical resection in patients with adrenocortical carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 98, n. 1, p. 192-197, 2013.

HALL, P. F. The roles of calmodulin, actin, and vimentin in steroid synthesis by adrenal cells. **Steroids**, v. 62, n. 1, p. 185-189, 1997.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HERMSEN, I. G. et al. Plasma Concentrations of o,p ' DDD, o,p ' DDA, and o,p ' DDE as Predictors of Tumor Response to Mitotane in Adrenocortical Carcinoma: Results of a Retrospective ENS@T Multicenter Study. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 6, p. 1844-1851, 2011.

HESCOT, S. et al. Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 20, n. 3, p. 371-381, 2013.

ICARD, P. et al. Adrenocortical carcinoma in surgically treated patients: a retrospective study on 156 cases by the French Association of Endocrine Surgery. **Surgery**, v. 112, n. 6, p. 972-979; discussion 979-80, 1992.

\_\_\_\_\_. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. **World Journal of Surgery**, v. 25, n. 7, p. 891-897, 2001.

IGUCHI, T. et al. Nitrogen-containing bisphosphonates induce S-phase cell cycle arrest and apoptosis of myeloma cells by activating MAPK pathway and inhibiting mevalonate pathway. **Cell Signal**, v. 15, n. 7, p. 719-727, 2003.

IVASCU, A.; KUBBIES, M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 8, p. 922-932, 2006.

JACKS, T.; WEINBERG, R. A. Taking the study of cancer cell survival to a new dimension. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 923-925, 2002.

JENSEN, J. C. et al. Recurrent or metastatic disease in select patients with adrenocortical carcinoma. Aggressive resection vs chemotherapy. **Arch. Surg.**, v. 126, n. 4, p. 457-461, 1991.

JOHANSEN, S. et al. Deficits in the Management of Patients With Adrenocortical Carcinoma in Germany. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 107, n. 50, p. 885-U9, 2010.

JOHNSEN, I. K.; BEUSCHLEIN, F. Role of bone morphogenetic proteins in adrenal physiology and disease. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 44, n. 4, p. 203-211, 2010.

JOHNSEN, I. K. et al. Bone morphogenetic proteins 2 and 5 are down-regulated in adrenocortical carcinoma and modulate adrenal cell proliferation and steroidogenesis. **Cancer Res.**, v. 69, n. 14, p. 5784-5792, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 104-105.

KERKHOF, T. M. et al. Comparison of two mitotane starting dose regimens in patients with advanced adrenocortical carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 98, n. 12, p. 4759-4767, 2013.

KIRSCHNER, L. S. Review: Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: A new hope. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 1, p. 14-21, 2006.

\_\_\_\_\_. The next generation of therapies for adrenocortical cancers. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 7, p. 343-350, 2012.

KLOOS, R. T. et al. Incidentally discovered adrenal masses. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 4, p. 460-484, 1995.

KONINGS, I. R. H. M. et al. The applicability of mTOR inhibition in solid tumors. **Current Cancer Drug Targets**, v. 9, n. 3, p. 439-450, 2009.

KROISS, M. et al. Sunitinib Inhibits Cell Proliferation and Alters Steroidogenesis by Down-Regulation of HSD3B2 in Adrenocortical Carcinoma Cells. Received March 30, 2011; Accepted August 18, 2011.: **Front. Endocrinol.**, (Lausanne), v. 2, 2011.

KROISS, M. et al. Sunitinib in refractory adrenocortical carcinoma: a phase II, single-arm, open-label trial. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 97, n. 10, p. 3495-3503, 2012.

\_\_\_\_\_. Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, v. 75, n. 5, p. 585-591, 2011.

LACROIX, A. Approach to the patient with adrenocortical carcinoma. **J Clin Endocrinol. Metab.**, v. 95, n. 11, p. 4812-4822, 2010.

LEE, J. O. et al. Metastatic adrenocortical carcinoma treated with sunitinib: a case report. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v. 39, n. 3, p. 183-185, 2009.

LEHMANN, T. P.; WRZESINSKI, T.; JAGODZINSKI, P. P. The effect of mitotane on viability, steroidogenesis and gene expression in NCI-H295R adrenocortical cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 7, n. 3, p. 893-900, 2013.

LEIBOVITZ, A. et al. New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 51, n. 2, p. 691-697, 1973.

LIBE, R.; BERTHERAT, J. Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. **European Journal of Endocrinology**, v. 153, n. 4, p. 477-487, 2005.

LIBE, R.; FRATTICCI, A.; BERTHERAT, J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. **Endocrine-Related Cancer**, v. 14, n. 1, p. 13-28, 2007.

LUTON, J. P. et al. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, n. 17, p. 1195-1201, 1990.

MARINIELLO, B. et al. Combination of sorafenib and everolimus impacts therapeutically on adrenocortical tumor models. **Endocrine-Related Cancer**, v. 19, n. 4, p. 527-539, 2012.

MCMANUS, J. F. A. Histological Demonstration of Mucin after Periodic Acid. **Nature**, v. 158, n. 4006, p. 202-202, 1946

\_\_\_\_\_. Histological and Histochemical Uses of Periodic Acid. **Stain Technology**, v. 23, n. 3, p. 99-108, 1948.

MELNICK, J. S. et al. An efficient rapid system for profiling the cellular activities of molecular libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 9, p. 3153-3158, 2006.

MEMMOTT, R. M.; DENNIS, P. A. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 5, p. 656-664, 2009.

MOL, C. D. et al. Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 30, p. 31655-31663, 2004.

MOL, C. D.; FABBRO, D.; HOSFIELD, D. J. Structural insights into the conformational selectivity of STI-571 and related kinase inhibitors. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.**, v. 7, n. 5, p. 639-648, 2004.

NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 810-816, 2000.

OADES, G. M. et al. Nitrogen containing bisphosphonates induce apoptosis and inhibit the mevalonate pathway, impairing Ras membrane localization in prostate cancer cells. **Journal of Urology**, v. 170, n. 1, p. 246-252, 2003.

PAN, B. Q. et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro. **Bone**, v. 34, n. 1, p. 112-123, 2004.

POLI, G. et al. Morphofunctional effects of mitotane on mitochondria in human adrenocortical cancer cells. **Endocrine-Related Cancer**, v. 20, n. 4, p. 537-550, 2013.

POMMIER, R. F.; BRENNAN, M. F. An eleven-year experience with adrenocortical carcinoma. **Surgery**, v. 112, n. 6, p. 963-970; discussion 970-971, 1992.

RAINEY, W. E.; BIRD, I. M.; MASON, J. I. The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 100, n. 1-2, p. 45-50, 1994.

RAINEY, W. E.; SANER, K.; SCHIMMER, B. P. Adrenocortical cell lines. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 228, n. 1-2, p. 23-38, 2004.

RAMÍREZ-ZACARÍAS, J. L.; CASTRO-MUÑOZLEDO, F.; KURI-HARCUCH, W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. **Histochemistry**, v. 97, n. 6, p. 493-497, 1992.

REIF, V. D.; LITTLETON, B. C.; SINESHEIMER, J. E. In vitro biotransformations of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (o,p'-DD) and 1,1-bis(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (p,p'-DDD) by bovine adrenal. **J. Agric. Food Chem.**, v. 23, n. 5, p. 996-999, 1975.

REIF, V. D.; SINSHEIMER, J. E. Metabolism of 1-(0-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (o,p'-DDD) in rats. **Drug. Metab. Dispos.**, v. 3, n. 1, p. 15-25, 1975.

RIBEIRO, R. C. et al. A inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9330-9335, 2001.

RODRIGUEZ, H. et al. Transcription of the human genes for cytochrome P450<sub>scc</sub> and P450<sub>c17</sub> is regulated differently in human adrenal NCI-H295 cells than in mouse adrenal Y1 cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 2, p. 365-371, 1997.

ROSENZWEIG, S. A.; ATREYA, H. S. Defining the pathway to insulin-like growth factor system targeting in cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 8, p. 1115-1124, 2010.

ROSKOSKI, R., JR. Sunitinib: A VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n. 2, p. 323-328, 2007.

SANDRINI, R.; RIBEIRO, R. C.; DELACERDA, L. Childhood adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 7, p. 2027-2031, 1997.

SCHTEINGART, D. E. et al. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. **Endocrine-Related Cancer**, v. 12, n. 3, p. 667-680 2005.

\_\_\_\_\_. Treatment of adrenal carcinomas. **Arch. Surg.**, v. 117, n. 9, p. 1142-1146. 1982.

\_\_\_\_\_. Comparison of the adrenolytic activity of mitotane and a methylated homolog on normal adrenal cortex and adrenal cortical carcinoma. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 31, n. 6, p. 459-466, 1993.

SCHULICK, R. D.; BRENNAN, M. F. Long-term survival after complete resection and repeat resection in patients with adrenocortical carcinoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 6, n. 8, p. 719-726, 1999.

SENARATNE, S. G.; MANSI, J. L.; COLSTON, K. W. The bisphosphonate zoledronic acid impairs Ras membrane [correction of impairs membrane] localisation and induces cytochrome c release in breast cancer cells. **Br. J. Cancer**, v. 86, n. 9, p. 1479-1486, 2002.

SENARATNE, S. G. et al. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. **Br. J. Cancer**, v. 82, n. 8, p. 1459-1468, 2000.

SHIMIZU, S. et al. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. **Cancer Res.**, v. 56, n. 9, p. 2161-2166, 1996.

SIERRA, J. R.; CEPERO, V.; GIORDANO, S. Molecular mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase targeted therapy. **Molecular Cancer**, v. 9, p. 75, 2010.

SUTHERLAND, R. M.; DURAND, R. E. Radiation response of multicell spheroids--an in vitro tumour model. **Curr. Top. Radiat. Res. Q.**, v. 11, n. 1, p. 87-139, 1976.

TAKESHITA, A. et al. Mitotane induces CYP3A4 expression via activation of the steroid and xenobiotic receptor. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 3, p. 297-305, 2013.

TAMM, I.; SCHRIEVER, F.; DÖRKEN, B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. **Lancet. Oncol.**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2001.

TERZOLO, M. et al. Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 23, p. 2372-2380, 2007.

\_\_\_\_\_. Low-dose monitored mitotane treatment achieves the therapeutic range with manageable side effects in patients with adrenocortical cancer. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 6, p. 2234-2238, 2000.

TIWARI, A. K. et al. Nilotinib (AMN107, Tassigna (R)) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 2, p. 153-161, Jul 15 2009.

TREDAN, O. et al. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 19, p. 1441-1454, 2007.

TWENTYMAN, P. R. Response to chemotherapy of EMT6 spheroids as measured by growth delay and cell survival. **Br. J. Cancer**, v. 42, n. 2, p. 297-304, 1980.

VAN ERP, N. P. et al. Mitotane has a strong and a durable inducing effect on CYP3A4 activity. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 164, n. 4, p. 621-626, 2011.

VAN SLOOTEN, H. et al. The treatment of adrenocortical carcinoma with o,p'-DDD: prognostic implications of serum level monitoring. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v. 20, n. 1, p. 47-53, 1984.

VENKATASUBRAMANIAN, R.; HENSON, M. A.; FORBES, N. S. Incorporating energy metabolism into a growth model of multicellular tumor spheroids. **J. Theor. Biol.**, v. 242, n. 2, p. 440-453, 2006.

WAJCHENBERG, B. L. et al. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. **Cancer**, v. 88, n. 4, p. 711-736, 2000.

WEBER, M. M. et al. Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 136, n. 3, p. 296-303, 1997.

WEISBERG, E. et al. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 12, p. 1765-1769, 2006.

XU, Y. Z. et al. Significance of heparanase-1 and vascular endothelial growth factor in adrenocortical carcinoma angiogenesis: potential for therapy. **Endocrine**, v. 40, n. 3, p. 445-451, 2011.

YASUMURA, Y.; BUONASSISI, V.; SATO, G. Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. **Cancer Res.**, v. 26, n. 3, p. 529-535, 1966.

YUHAS, J. M. et al. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. **Cancer Res.**, v. 37, n. 10, p. 3639-3643, 1977.

ZANCANELLA, P. et al. Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 28, n. 8, p. 513-524, 2006.

ZHAO, J. M. et al. Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions - Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis. **American Journal of Pathology**, v. 155, n. 4, p. 1039-1045, 1999.