**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Médica**

Helen Alves de Oliveira

**BKM-120 reduz a viabilidade celular e secreção de hormônio
adrenocorticotrófico em linhagem celular de tumores
corticotróficos de camundongo AtT-20/D16v-F2**

**Ribeirão Preto
2019**

Helen Alves de Oliveria

**BKM-120 reduz a viabilidade celular e secreção de hormônio
adrenocorticotrófico em linhagem celular de tumores
corticotróficos de camundongo AtT-20/D16v-F2**

Dissertação de mestrado apresentada a
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de mestre em Clínica Médica, opção
Investigação Biomédica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Clarissa Silva Martins

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Margaret de Castro

Ribeirão Preto - SP

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto / USP

Oliveira, Helen Alves

BKM-120 reduz a viabilidade celular e secreção de hormônio adrenocorticotrófico em linhagem celular de tumores corticotróficos de camundongo AtT-20/D16v-F2. Ribeirão Preto, 2019.

123 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof^a. Dr^a. Clarissa Silva Martins

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Margaret de Castro

1. Corticotrofinomas 2. Expressão Gênica 3. Ciclo celular 4. PI3K

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Helen Alves de Oliveira

Título: BKM-120 reduz a viabilidade celular e secreção de hormônio adrenocorticotrófico em linhagem celular de tumores corticotróficos de camundongo AtT-20/D16v-F2.

Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em Clínica Médica, opção Investigação Biomédica.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Apoio financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

***Aos meus pais e irmãos, pelo apoio incondicional a
quem dedico todas as minhas vitórias.***

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Clarissa Silva Martins, pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria, que soube ser tão humilde ao repassar todo o seu conhecimento. Por sua ajuda infinita, desempenhando funções muito além de orientadora.

A Profa. Margaret de Castro, o meu reconhecimento, minha admiração pelo exemplo de dedicação e profissionalismo. Obrigada por ter me recebido como aluna, pelo apoio durante todo o período de pós-graduação e pelos constantes ensinamentos.

Agradeço a todos os professores que tive nesta longa jornada de estudos. Por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

A Dra. Ana Carolina Bueno, companheira de trabalho, por ser a responsável por me ensinar toda metodologia, sem você este trabalho não seria possível.

Aos amigos do laboratório de Endocrinologia, Metabologia, Triagem Neonatal e Biologia Molecular pelo companheirismo e que além de colaborarem na realização deste trabalho, fizeram do ambiente de trabalho um ambiente agradável e prazeroso de estar.

Ao meu noivo Rodrigo, pessoa que amo e partilho a vida. Obrigado pelo carinho, paciência e por sua capacidade de me trazer paz.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao, José Roberto Silva, Rogério Zuliani, Maria Fernanda Orsolini Ticotoste Brondi, Renata Sicchieri Pugliesi e Rui Milton Patrício da Silva Junior pelo suporte técnico.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho.

Finalmente, dedico esse trabalho a Deus que sempre direcionou a minha vida e quem tem feito maravilhas por mim.

RESUMO

OLIVEIRA, H A. **BKM-120 reduz a viabilidade celular e secreção de hormônio adrenocorticotrófico em linhagem celular de tumores corticotróficos de camundongo AtT-20/D16v-F2**. 2019 118f. Tese (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: Doença de Cushing (DC) é resultante da hipersecreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) secundário à presença de um adenoma corticotrófico hipofisários, levando ao hipercortisolismo. Diferentes estratégias terapêuticas são disponíveis, entretanto, uma significativa parcela dos pacientes não atinge a remissão da doença. Faltam, principalmente, terapias medicamentosas direcionadas para a hipófise. A via PI3K / AKT desempenha papel essencial em diferentes processos celulares, incluindo sobrevivência celular, proliferação, diferenciação, organização do citoesqueleto e transporte de glicose. Essa via está frequentemente ativada em neoplasias, em humanos, incluindo os tumores hipofisários, o que proporciona oportunidades de intervenção terapêutica. O fármaco BKM120, inibidor seletivo de PI3K, exerce efeitos antiproliferativos e citotóxicos em tumores sólidos, via inibição seletiva de AKT. Neste estudo, examinamos os efeitos de BKM120, em linhagem celular AtT-20/D16v-F2, proveniente de tumor corticotrófico de camundongos. **Métodos:** Os efeitos do BKM120 na linhagem celular foram avaliados através da quantificação de hormônio adrenocorticotrófico por quimioluminescência, da quantificação da expressão dos genes *Cdkn1b*, *Ccne1*, *Ccnd1*, *Cdk4*, *Cdk2*, *Rb1*, *Myc* por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, da quantificação da expressão protéica de AKT, CDKN1B, p70 S6 cinase e p85 S6 cinase por Western Blot, da análise da viabilidade celular por ensaio de proliferação celular não radioativo, da análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo e análise de apoptose por ensaio de anexina em citômêtro de fluxo. **Resultados:** O tratamento das células AtT-20/D16v-F2 com BKM120 diminuiu os níveis de ACTH no sobrenadante das células AtT-20 / D16v-F2. BKM120 também diminuiu a proliferação celular em células AtT-20/D16v-F2 de forma dose-dependente. Além disso, o tratamento com BKM120 causou aumento transitório na expressão de *Cdkn1b* e indução de parada no ciclo celular em G0-G1 **Conclusão:** Os estudos *in vitro* com BKM120 demonstram supressão da síntese e secreção de ACTH e da proliferação celular de células AtT-20/D16v-F2, provenientes de tumor corticotrófico de camundongos, sugerindo estudos *in vivo* com o fármaco BKM120 devam ser testados, por apresentar potencial para o tratamento medicamentoso de tumores corticotróficos humanos.

Palavras-chave: Corticotrofinomas; Expressão Gênica; Ciclo celular; PI3K.

ABSTRACT

OLIVEIRA, H A. **Inhibitory effects of BKM120 on adrenocorticotrophic hormone production and corticotroph tumor cell proliferation.** 2019 118f. Thesis (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto – Universidade de Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2019.

Introduction: Cushing disease is caused by adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary adenomas. Effective pituitary targeted pharmacotherapy for Cushing disease is still lacking. The PI3K/AKT pathway plays essential regulatory role in different cellular processes including cell survival, proliferation, differentiation, cytoskeletal organization, and glucose transport. PI3K/AKT pathway is often constitutively activated in human cancers, providing opportunities for therapeutic intervention. The BKM120, a selective pan class I PI3K inhibitor, has been reported to exert anti-proliferative and cytotoxic effects on solid tumor via selective AKT inhibition. We examined the effects of BKM120 on the murine corticotrophic tumour cell line AtT-20/D16v-F2. Methods: The effects of BKM120 on tumoral cell line were evaluated by adrenocorticotrophic hormone measurement by chemiluminescence, cell viability by non-radioactive cell proliferation assay, gene expression of *Cdkn1b*, *Ccne1*, *Ccnd1*, *Cdk4*, *Cdk2*, *Rb1*, *Myc* by real-time polymerase chain reaction, AKT, CDKN1B, p70 S6 Kinase and p85 S6 Kinase protein expression by Western Blot, cell cycle by flow cytometry and apoptosis analysis by annexin flow cytometer assay. Results: BKM120 decreased ACTH levels and also decreased cell proliferation, in a dose-dependent manner, in AtT-20/D16v-F2 cultured cells. Furthermore, BKM120 treatment increased the expression of *Cdkn1b* and G0–G1 arrest. Conclusion: Our *in vitro* studies on AtT-20/D16v-F2 cells from mouse corticotrophic tumor with BKM120 show suppression of ACTH synthesis and secretion and inhibition of cell proliferation, suggesting that BKM120 *in vivo* studies should be tested because its potential for the medical treatment of human corticotrophic tumors.

Keywords: Corticotrophinoma; Gene expression; Cell cycle; PI3K.

SÍMBOLOS

μg: micrograma

μL: microlitro

μM: micromolar

°C: graus Celsius

cm: centímetros

cm²: centímetros quadrados

h: hora

l: litro

mg: miligrama

min: minuto

ng: nanograma

nm: nanometro

nM: nanomolar

pg: picogramas

α: alfa

β: beta

Δ: delta

SIGLAS E ABREVIATURAS

11 β HSD:	enzima 11 β hidroxio-esteroide-desidrogenase
5'-UTR:	região 5' não traduzida
ACTH:	Hormônio adrenocorticotrófico
AKT:	proteína cinase B codificada pelo gene AKT (<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>)
AtT20:	linhagem celular de tumor corticotrófico de camundongo
AtT-20/D16v-F2:	subclone da linhagem celular de tumor corticotrófico de camundongo AtT20
BKM120:	buparlisibe
BMAL1:	do inglês, brain and muscle ARNT-like 1, onde ARNT= aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
<i>Bmal1</i> :	gene murino codificador da proteína BMAL1
BRG1:	subunidade do complexo de remodelamento do nucleossomo SWI/SNF (<i>SWItch/Sucrose NonFermentable</i>), também conhecida por SMARCA4 (<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4</i>)
<i>CCNE1</i> :	gene humano codificador da ciclina E1
<i>Ccne1</i> :	gene murino codificador da ciclina E1
CDK:	cinase dependente de ciclina humana
Cdk:	cinase dependente de ciclina, referente aos murinos ou estudos com mamíferos
<i>CDKN1B</i> :	gene codificador da proteína CDKN1B (inibidor 1B de cinases dependentes de ciclina), também conhecido como P27KIP1
<i>Cdkn1b</i> :	gene murino codificador da proteína CDKN1B (inibidor 1B de cinases dependentes de ciclina)
cDNA:	DNA complementar
COEBA:	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPE:	Carpoxipeptiase E
CRH:	hormônio liberador de corticotrofina

Crml:	proteína murina exportina, homóloga à crml (<i>required for chromosome region maintenance</i>) de levedura
CRY:	Proteína criptocromo
Ct:	ciclo de amplificação no qual a amostra atinge o limiar de detecção (<i>cycle threshold</i>)
CV:	coeficiente de variação
DEPC:	dietilpirocarbonato
<i>DKC1</i> :	gene humano codificador da proteína discerina
DMEM:	meio Eagle modificado por Dulbeco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO:	dimetil sulfóxido
DNA:	ácido Desoxirribonucléico
DNAC:	ácido Desoxirribonucléico Circular
dNTP:	desoxirribonucleotídeo
DO:	densidade óptica
DP:	desvio padrão
E2F:	família de fatores de transcrição E2F
FOXO:	fatores de transcrição <i>forkhead box group O</i>
GAPDH:	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GCs:	Glicocorticoides
GH:	Hormônio de crescimento
GR:	Receptor de glicocorticoide
HDAC2:	histona deacetilase 2
IRES:	sítio interno de entrada ribossomal (<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>)
KIP/CIP:	família de inibidores de cinases dependentes de ciclina humana
Kpc1:	complexo protéico murino 1 promotor de ubiquitinação de Kip1 (<i>Kip 1 Ubiquitination-Promoting Complex 1</i>)

Kpc2:	proteína murina 1 contenedora de domínio de associação à ubiquitina, conhecida também como Ubac1, homóloga a Kpc2 de coelho
<i>Men1</i> :	gene murino codificador da proteína MENIN, relacionado à Neoplasia endócrina múltipla
mRNA:	RNA mensageiro
mTOR:	serina/treonina cinase alvo de rapamicina (mechanistic target of rapamycin)
MTS:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio tetrazolium
MYC:	Oncogene viral homólogo de mielocitomatosis (<i>myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>)
p:	valor p
<i>P27</i> :	gene humano codificador da proteína P27
<i>p27</i> :	gene murino codificador da proteína inibidora de cinase dependente de ciclina 1B, também conhecido por <i>p27kip1</i> ou <i>Cdkn1b</i>
P27:	proteína inibidora de cinases dependentes de ciclina tipo 1B, também conhecida como CDKN1B ou KIP1
PBS:	tampão fosfato salino
PERS:	proteína do período circadiano
PI3K:	fosfatidil inositol-4,5-bifosfato 3-cinase
PIP2:	fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato
PIP3:	fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato
<i>Pomc</i> :	gene da proopiomelanocortina, referente a murinos e ao homólogo em peixe-zebra
<i>POMC</i> :	gene humano da proopiomelanocortina
<i>PTTG</i> :	gene de transformação do crescimento tumoral da hipófise (<i>Pituitary tumor transforming growth</i>)
<i>Pttg</i> :	gene transformador de tumor hipofisário (<i>pituitary transforming-tumor gene</i>), referente a murinos e ao homólogo em peixe-zebra
PTX1:	fator de transcrição pituitary homeobox 1 quimioterápico mitotano (o,p'-DDD)

qPCR:	reação em cadeia da polimerase quantitativa
<i>Rb</i> :	gene murino do retinoblastoma
RB:	proteína supressora tumoral do retinoblastoma
<i>RB1</i> :	gene humano do retinoblastoma
Rev-erba:	receptor nuclear
RNA:	ácido ribonucléico
RNAhTR:	pequena subunidade de RNA nuclear da telomerase
rpm:	rotações por minuto
RORα:	receptor órfão relacionado ao ácido retinóico
<i>RPS13</i> :	gene codificador da proteína ribossomal S13
RTKs:	receptores tirosino quinases
SBF:	soro bovino fetal
SC:	Síndrome de Cushing
SgIII:	Secretogranina III
Ser10:	serina posição 10
SOM230:	pasireotide
Spk2:	proteína murina cinase 2 associada à fase S
SSTR 1-5:	subtipos de receptores de somatostatina
<i>Sstr2</i> :	gene murino do receptor 2 da somatostatina
<i>SSTR5</i> :	gene humano do receptor 5 da somatostatina
<i>Sstr5</i> :	gene murino do receptor 5 da somatostatina
Thr187:	resíduo treonina 187
UFC:	cortisol livre urinário
<i>USP8</i> :	gene humano codificador da protease 8 da ubiquitina
UTR:	região não transcrita

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Controle do ciclo celular.....	25
Figura 2 - Representação esquemática da via PI3K/AKT e sua associação com funções celulares.	28
Figura 3 - Atuais abordagens para terapia medicamentosa em Doença de Cushing.	30
Figura 4 - Morfologia das células de cultura celular da linhagem AtT- AtT-20/D16v-F2.	38
Figura 5 - Curva representativa da detecção de fluorescência durante amplificação pela reação de qPCR das amostras.....	43
Figura 6 - Viabilidade das células AtT-20/D16v-F2 após tratamento com diferentes concentrações de SOM230.	49
Figura 7 - Viabilidade das células AtT-20/D16v-F2 após tratamento com diferentes concentrações de BKM120.....	51
Figura 8 - Concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadantes de células AtT-20/D16v-F2 após tratamento com SOM 230.	53
Figura 9 - Concentração de ACTH em % relativo ao controle no sobrenadantes de células AtT-20/D16v-F2 após tratamento com BKM120.....	54
Figura 10 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) do gene <i>Cdkn1b</i> na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 24h e 48 h. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 μ M e 0,5 μ M.	56
Figura 11 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes <i>Ccnd1</i> , <i>Ccne1</i> , <i>Cdk4</i> , <i>Cdk2</i> , <i>Rb1</i> e <i>Myc</i> , na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 24h de incubação. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 μ M e 0,5 μ M.....	57
Figura 12 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes <i>Ccnd1</i> , <i>Ccne1</i> , <i>Cdk4</i> , <i>Cdk2</i> , <i>Rb1</i> e <i>Myc</i> , na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 48h de incubação. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 μ M e 0,5 μ M.....	58
Figura 13 - Expressão da AKT e CDKN1B na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 24h e 48h de tratamento com BKM120. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 μ M e 0,5 μ M.	59

Figura 14 - Expressão da p85 S6 cinase e p70 S6 cinase na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 24h e 48h de tratamento com BKM120. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 μ M e 0,5 μ M.60

Figura 15 - Progressão do ciclo celular, na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 48h de incubação. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 μ M e 0,5 μ M.....61

Figura 16 - Classificação de células apoptótica por citometria de fluxo (Anexia V – FITC), na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 48h de incubação. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 e 0,5 μ M.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito de diferentes concentrações de SOM230 na viabilidade celular (%) de células AtT-20/D16v-F2.	48
Tabela 2 - Efeito de diferentes concentrações de BKM120 na viabilidade celular (%) de células AtT-20/D16v-F2.	50
Tabela 3 - Efeito da administração de SOM230 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células AtT-20/D16v-F2.....	52
Tabela 4 - Efeito da administração de BKM 120 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células AtT-20/D16v-F2.....	54
Tabela 5 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes estudados na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 24h de tratamento com diferentes concentrações de BKM120.	55
Tabela 6 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes estudados na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 48h de tratamento com diferentes concentrações de BKM120.	55
Tabela 7 - Efeito de diferentes concentrações de SOM 230 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 24horas.	90
Tabela 8 - Efeito de diferentes concentrações de SOM230 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 48horas.	91
Tabela 9 - Efeito de diferentes concentrações de SOM 230 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 72horas.	91
Tabela 10 - Efeito de diferentes concentrações de SOM 230 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 96 horas.	92
Tabela 11 - Efeito de diferentes concentrações de BKM 120 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 24horas.	93
Tabela 12 - Efeito de diferentes concentrações de BKM 120 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 48 horas.	94
Tabela 13 - Efeito de diferentes concentrações de BKM 120 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 72 horas.	95
Tabela 14 - Efeito de diferentes concentrações de BKM 120 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 96 horas.	96

Tabela 15 - Efeito da administração de SOM 230 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células ATt20 por 2 horas.....	97
Tabela 16 - Efeito da administração de SOM 230 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células ATt20 por 6 horas.....	97
Tabela 17 - Efeito da administração de SOM 230 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células ATt20 por 24 horas.....	98
Tabela 18 - Efeito da administração de BKM 120 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células ATt20 por 2 horas.....	99
Tabela 19 - Efeito da administração de BKM 120 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células ATt20 por 6 horas.....	99
Tabela 20 - Efeito da administração de BKM 120 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células ATt20 por 24 horas.....	99

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Regulação normal do eixo corticotrófico e a perda do feedback na síndrome de cushing	21
1.2 Bases moleculares dos adenomas hipofisários secretores de ACTH	23
1.3 Tratamento e abordagem medicamentosa na doença de cushing.....	29
1.4 Hipóteses e justificativa	34
2 OBJETIVO	35
2.1 Geral.....	36
2.2 Específicos	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Aspectos éticos	38
3.2 Cultura celular de tumores corticotróficos de camundongo.....	38
3.3 Tratamento com agonista dos receptores de somatostatina	39
3.4 Tratamento com pan-inibidor da via PI3K	39
3.5 Análise da viabilidade celular	40
3.6 Dosagem de ACTH	40
3.7 Extração de RNA.....	41
3.8 Síntese de CDNA por transcriptase reversa.....	41
3.9 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (QPCR)	42
3.10 <i>Western blot</i>	43
3.11 Avaliação do ciclo celular	44
3.12 Apoptose	44
3.13 Análise estatística	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 Viabilidade celular	47
4.1.1 Após tratamento com agonista dos receptores de somatostatina	47
4.1.2 Após tratamento com pan-inibidor da via PI3K	49
4.2 Dosagem de ACTH	52
4.2.1 Após tratamento com agonista dos receptores de somatostatina	52
4.2.2 Após tratamento com com pan-inibidor da via PI3K.....	53

4.3 Expressão gênica.....	55
4.4 Expressão proteica.....	59
4.5 Ciclo celular.....	60
4.6 Apoptose	61
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÕES	72
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	74
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
9 ANEXOS	87
Anexo 1 - Certificado da comissão de Ética em Experimentação Animal	88
Anexo 2 - Certificado de análise da célula AtT-20/D16v-F2.....	89
Anexo 3 - Efeito de diferentes concentrações de SOM 230 na viabilidade celular (%) de células ATt20.	90
Anexo 4 - Efeito de diferentes concentrações de SOM 230 na viabilidade celular (%) de células ATt20	93
Anexo 5 - Efeito da administração de SOM 230 na concentração de ACTH no sobrenadante das células ATt20.....	97
Anexo 6 - Efeito da administração de SOM 230 na concentração de ACTH no sobrenadante das células ATt20.	99
Anexo 7 - Artigo.....	100

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Cushing (SC) é um estado clínico induzido por uma exposição crônica e excessiva aos glicocorticoides. Doença de Cushing (DC) é a causa mais comum da Síndrome de Cushing endógena, resultante de hipersecreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), por adenomas corticotróficos hipofisários. Mais de 90% dos indivíduos com hipersecreção hipofisária de ACTH apresentam microadenoma, cujo diâmetro médio é de 6 mm (Boscaro, Barzon et al. 2000; Bertagna, Guignat et al. 2009; Justin Seltzer, Charles E. Ashton et al. 2015; Grossman 2017).

Apesar de rara, a DC está associada à significativa morbidade, como intolerância à glicose e resistência à insulina levando ao diabetes mellitus. Distúrbios psicológicos como depressão, alteração do sono, alucinações, perda da memória são comuns. Devido à perda óssea, pacientes apresentam osteoporose, podendo ocorrer fraturas principalmente em costelas, vértebras e pelve. Muitos pacientes apresentam hipertensão acarretando complicações cardiovasculares, que são as maiores ameaças da doença e que contribuem grandemente para as taxas de mortalidade (Bertagna, Guignat et al. 2009; Lambert, Goldberg et al. 2013).

O melhor entendimento sobre a patogênese molecular dos corticotrofinomas pode auxiliar nas estratégias terapêuticas dirigidas a sua patofisiologia, com novos alvos para o desenvolvimento de fármacos antitumorais.

1.1 Regulação normal do eixo corticotrófico e a perda do feedback na síndrome de cushing

O metabolismo diário é controlado por um relógio biológico que determina períodos de maior e menor energia. Os ritmos circadianos em mamíferos são regulados pelo hipotálamo, o qual recebe informação fótica dos olhos, e então sincroniza o sistema de cronometragem circadiana com o tempo ambiental. Os núcleos supraquiasmáticos no hipotálamo recebem informação sobre a luminosidade proveniente do trato retinohipotalâmico e enviam eferências para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). O núcleo paraventricular hipotálamo (PVN) produz hormônio liberador de corticotropina (CRH) e vasopressina (AVP). Na hipófise anterior esses fatores se ligam a seus receptores e, assim, estimulam a síntese de proopiomelanocortina (POMC) e a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). ACTH, agindo via receptor de melanocortina 2 (MC2R)

na adrenal, estimula a síntese de enzimas esteroidogênicas. Devido às informações obtidas do ciclo claro-escuro, a síntese de glicocorticoide possui, dessa forma, um estabelecido ritmo circadiano (Moreira, Antonini et al. 2018).

A natureza autônoma e autossustentável do ritmo circadiano depende principalmente da presença de um mecanismo genético denominado relógio molecular. Os genes do relógio e seus produtos gênicos promovem cooperativamente a expressão gênica rítmica por meio de duas alças retroalimentação transcricional e traducional interligadas. O heterodímero CLOCK/BMAL1 mediado por E-box induz a transcrição de *Periods* (PERs) e *Cryptochromes* (CRYs). O acúmulo destas proteínas reprimem a transcrição mediada por E-box até que seus níveis tenham diminuído o suficiente ao ponto em que se tornam insuficientes para reprimir a atividade de CLOCK/BMAL1, reiniciando um novo ciclo. Além disso, o CLOCK e o BMAL1 também controlam transcrição dos receptores nucleares ROR α e Rev-erb α , que modulam os níveis de mRNA de *Bmal1* por meio de ações competitivas entre si pela ligação aos elementos responsivos presente no promotor *Bmal1*. Além da regulação central ao nível da transcrição /tradução, as proteínas do relógio circadiano também são sujeitas a modificações pós-traducionais que parecem controlar estabilidade proteica, localização nuclear e atividade funcional através de interações com elementos positivos ou diretamente com o DNA, diminuindo a expressão dos próprios genes do relógio (Chung, Son et al. 2011; Jolley, Ukai-Tadenuma et al. 2014).

Além do ritmo circadiano, outra característica bem estabelecida do eixo hipotálamo hipófise adrenal é a existência de alças de retroalimentação, de forma que na presença de níveis elevados de glicocorticóides, os mesmos atuam através de seus receptores (GR) presentes em células hipofisárias e hipotalâmicas, reduzindo a síntese e secreção de ACTH. Os corticotrofinomas são parcialmente resistentes ao feedback negativo do eixo hipotálamo-hipofise-adrenal, resultando no aumento da concentração de ACTH, consequentemente aumento dos níveis de cortisol. O hipercortisolismo reduz a concentrações de CRH e alterações no ritmo de cortisol causam alterações metabólicas e características clínicas da doença de Cushing (Moreira, Antonini et al. 2018).

1.2 Bases moleculares dos adenomas hipofisários secretores de ACTH

Diversos estudos têm aprofundado o conhecimento sobre os aspectos moleculares relacionados à tumorigênese corticotrófica, incluindo identificação de fatores de crescimento, genes e proteínas relacionados à progressão do ciclo celular. Os adenomas secretores de ACTH são caracterizados bioquimicamente pela resistência ao feedback dos glicocorticoides (GC).

A regulação do feedback negativo do gene POMC pelo receptor de glicocorticoide (GR) é necessária para reprimir a sua transcrição e inibir a liberação de ACTH. Entretanto mutações no gene do receptor de glicocorticoides (GR) são raras e improváveis de contribuir para resistência aos glicocorticoides (Antonini, Latronico et al. 2002). Alterações na expressão das isoformas do GR (Dahia, Honegger et al. 1997) e mutações na região promotora do gene da proopiomelanocortina (*POMC*) (Mönig, Ali et al. 1993) também não foram observadas, assim como mutações no gene do receptor 3 da vasopressina (*V3R*) (Dahia, Ahmed-Shuaib et al. 1996). Outros fatores que poderiam desempenhar um papel na resistência ao feedback do eixo pituitário-adrenal visto em pacientes com doença de Cushing são a hipoexpressão do receptor de ACTH (ACTH-R) (Morris, Kola et al. 2003) e uma maior expressão da enzima 11 β hidroxiesteroide desidrogenase (11 β HSD) tipo 2, enzima responsável por converter o cortisol em excesso em cortisona (Korbonits, Bujalska et al. 2001).

A resistência ou a perda do feedback aos GCs poderia estar associada à hipoexpressão da subunidade do complexo de remodelamento do nucleossomo (BRG1) ou histona desacetilase 2 (HDAC2), proteínas necessárias para a repressão da transcrição do gene POMC pelo GR (Bilodeau, Vallette-Kasic et al. 2006). Ainda nos adenomas secretores de ACTH, encontra-se expresso o fator transcricional NeuroD1, que contribuiria para a transcrição de *POMC* através de interação com o fator transcricional Pituitary homeobox 1 (PTX1) (Oyama, Sanno et al. 2001).

Recentemente, trabalhos utilizando análise genômica em larga escala identificaram que mutações somáticas ativadoras no gene que codifica a protease 8 da ubiquitina (*USP8*) como causa de Doença de Cushing, com uma maior prevalência em adultos e do sexo feminino. O gene *USP8* mutado causa a Doença de Cushing por impedir a interação entre a proteína USP8 e a proteína 14-3-3, resultando na clivagem catalítica de USP8, levando a deubiquitinação de receptor do

fator de crescimento epidérmico (EGFR) com impedimento da sua degradação. Por conseguinte, adenomas hipofisários com *USP8* mutado exibem aumento da expressão de EGFR e de sua via de sinalização (Reincke, Sbiera et al. 2014; Ma, Song et al. 2015)(Perez-Rivas, Theodoropoulou et al. 2015). Em um estudo recente, onde foi avaliando o DNA de tecido tumoral de 47 corticotropinomas, Wanichi *et al*, demonstraram que a frequência de alelos com mutação *USP8* foi de aproximadamente 30%, com maior prevalência em pacientes do sexo feminino (Wanichi, Mariani et al. 2019).

Foram identificadas recorrentes mutações nos genes *USP48* e *BRAF* em adenomas corticotróficos com *USP8* selvagem, o que promoveria a ativação e transcrição do gene *POMC*, fornecendo um mecanismo para excesso de produção de ACTH. Neste mesmo estudo não foram encontradas mutações, quando analisados outros tipos de adenomas hipofisários. Assim sendo, mutações *USP8*, *BRAF* e *USP48* parecem ser assinaturas genéticas únicas de adenomas corticotróficos(Ma, Song et al. 2015).

Estudos experimentais observaram que o gene *Cables1* é um regulador negativo da progressão do ciclo celular e é ativado em resposta ao glicocorticoides. *Knockdown* para *Cables1* estimula a proliferação em culturas celulares de tumores corticotróficos AtT20. Neste mesmo estudo, a perda da expressão de *CABLES1* foi observada em aproximadamente ~55% das amostras de pacientes com Doença de Cushing (Roussel-Gervais, Couture et al. 2016). Ainda, pacientes com doença de Cushing apresentam mutações em *CABLES1* em 2,2% sendo identificadas quatro variantes missense, duas em adultos (c.532G> A, p.E178K e c.718C> T, p.L240F) e duas em crianças (c.935G> A, p.G312D e c.1388A> G e p.D463G). As mutações no gene *CABLES1* mostraram uma capacidade reduzida de bloquear a proliferação de células corticotróficas em resposta à estimulação com dexametasona, demonstrando assim, o papel deste gene como um regulador do crescimento das células corticotróficas (Hernández-Ramírez, Gam et al. 2017).

Diversos trabalhos também avaliaram vias de progressão do ciclo celular nesses tumores. A progressão do ciclo celular é controlada por ciclinas, cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e inibidores das CDKs, conforme apresentação esquemática das fases do ciclo celular encontra-se na Figura 1.

al. 2012). Além disso, camundongos *knock-out* para o *p27* apresentam hiperplasia e tumores no lobo intermediário da hipófise (Fero, Rivkin et al. ; Nakayama, Ishida et al. ; Yoshino, Katayama et al. 2007). A hipoexpressão de P27 foi observada em todos os tipos de adenomas hipofisários esporádicos, notadamente nos adenomas secretores de ACTH (Jin, Qian et al. 1997; Lloyd, Jin et al. 1997; Bamberger, Fehn et al. 1999; Lidhar, Korbonits et al. 1999; Martins, Camargo et al. 2016).

A expressão de *P27* pode ser regulada em diferentes níveis: transcricional, traducional e pós – traducional (le Sage, Nagel et al. 2007; Marinoni and Pellegata 2010). A regulação da transcrição do gene *CDKN1B*, codificador da proteína P27, pode ocorrer através de mecanismos epigenéticos, como metilação na região promotora e remodelamento da cromatina, induzido por modificações em histonas. Nos adenomas hipofisários humanos esporádicos, não foram observadas mutações no gene codificador da proteína P27 (*CDKN1B*) (Ikeda, Yoshimoto et al. 1997; Tanaka, Yoshimoto et al. 1997; Dahia, Aguiar et al. 1998; Takeuchi, Koeffler et al. 1998) assim como alterações do padrão de metilação na região promotora do *P27* (Yoshino, Katayama et al. 2007).

A expressão de P27 também poderia ser regulada por mecanismos de controle da tradução. A região 5'-UTR de mRNA *CDKN1B* possui um sítio interno de entrada ribossomal (IRES) que pode facilitar sua interação com ribossomo e aumentar expressão do *CDKN1B* sob condições de estresse. Mutações no gene *DKC1* podem alterar a transcrição de genes com IRES (Coleman and Miskimins 2009; Zheng and Miskimins 2011). Adicionalmente, microRNAs, pequenas moléculas de RNA não codificantes, modulam negativamente a expressão gênica por meio da ligação ao mRNA alvo e subsequente inibição da tradução da proteína. Os microRNAs miR-221/222 são reguladores endógenos de P27, capazes de reprimir a tradução de *CDKN1B* (le Sage, Nagel et al. 2007; Zhang, Kang et al. 2009).

Recentemente, em nosso laboratório, para elucidar a regulação da tradução de P27 em tumores hipofisários, avaliou-se a expressão de *CDKN1B*, seus alvos (*CCNE1*, *CDK2*) e reguladores traducionais (*DKC1*, *RPS13*, *miR221*, *miR222*) em adenomas hipofisários comparados a hipófises normais (HN). Como resultado, em adenomas hipofisários, a hipoexpressão de *CDKN1B* não parece ser causada por alteração de expressão de seus reguladores traducionais - *DKC1*, *RPS13*, *miR221* ou *miR222* (Martins, Camargo et al. 2016).

Como principais mecanismos pós-traducionais na regulação do P27 têm sido implicadas duas vias proteolíticas. A primeira ocorre após a dissociação de p27 do complexo ciclina E/Cdk2, p27 é fosforilado em Ser10. Esta fosforilação aumenta a afinidade de ligação do p27 com exportina 1 (Crm1), que exporta p27 para o citoplasma. Uma vez no citoplasma, p27 interage com o complexo Kpc1/Kpc2 que promove sua ubiquitinação e degradação pelo proteassoma. A segunda via de degradação de p27 requer a fosforilação no resíduo treonina (Thr) 187 por ciclina E/Cdk2, e ocorre no núcleo no final de G1, após estimulação mitogênica. O p27 torna-se um substrato do complexo ciclina E/Cdk2 que fosforila a proteína no resíduo Thr187. Fosforilação em Thr187 permite a interação com Skp2, que é uma proteína F - box de um complexo SCF (Skp1/Cul1/F - box proteína) ubiquitina ligase (E3), resultando em uma poliubiquitinação do p27 e subsequente degradação pelo proteassoma (Musat, Korbonsits et al. 2002; Querada and Malumbres 2009; Marinoni and Pellegata 2010; He, Wang et al. 2012). A degradação de P27 pode ainda ser induzida por JAB1 (Proteína que se liga ao domínio de ativação das proteínas Jun-1), que é capaz de translocar a fosforilação de p27 para o citoplasma para a degradação por proteassoma (Querada and Malumbres 2009). Entretanto, estudos em corticotrofinomas humanos demonstraram que uma maior expressão de JAB1 é improvável de contribuir para baixa expressão do P27 (Korbonsits, Chahal et al. 2002). Em nosso laboratório, hipotetizamos que mutações do gene *USP8* poderiam levar à hiperexpressão de EGFR e, conseqüentemente, à hipoexpressão de P27 nos corticotrofinomas, entretanto, não observamos diferenças na expressão gênica ou protéica de P27 entre corticotrofinomas esporádicos com ou sem mutação do gene *USP8* (Martins, 2018, dados não publicados).

Outra via que tem sido implicada na regulação da expressão de P27 é a via PI3K/AKT (Figura 2). Existem três isoformas de Akt (Akt1, Akt2, Akt3) que são, em geral, amplamente expressas. O papel de Akt no apoio tumorigênese é devido à fosforilação e realocização de moléculas regulatórias chave envolvida na apoptose, proliferação e o crescimento celular.

Figura 2 - Representação esquemática da via PI3K/AKT e sua associação com funções celulares.

A cascata de sinalização PI3K/AKT é ativada por receptores tirosino quinases (RTKs). Quando PI3K - fosfatidil inositol 3 quinase, é ativada, é gerado o segundo mensageiro fosfatidilinositol (3,4,5) - trisfosfato (PIP3) a partir do fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PIP2). PIP3 recruta na membrana celular AKT - proteína quinase B. Após sua ativação, AKT transloca-se do citoplasma para o núcleo e fosforila vários substratos envolvidos na apoptose, proliferação e crescimento celular.

A via PI3K/AKT/mTOR (fosfatidil inositol 3 quinase/ proteína quinase B/ alvo da rapamicina em mamíferos) tem sido apontada com a segunda via mais alterada em processos neoplásicos (Agarwal, Carey et al. 2010). A ativação da via PI3K/AKT/mTOR leva ao crescimento celular e a progressão do ciclo celular da fase G1 através da ativação de via de sinalização ativada por mitógenos, na qual participam as proteínas p70 S6 cinase e p85 S6 cinase, produtos resultantes de splicing alternativo do mesmo gene. A p70 S6 cinase é uma serina/treonina cinase

capaz de fosforilar a proteína S6 da subunidade ribossômica 40S, atuando, portanto, no controle de tradução de mRNAs (Tavares, Pavan et al. 2015).

Estudos mostram que Akt está envolvida na prevenção da degradação da ciclina D1, e, mais recentemente, tem sido demonstrado que influencia negativamente na expressão e localização de inibidores ciclo celular tais como p21 e p27 (Musat, Korbonits et al. 2005). A via PI3K-AKT regula negativamente a transcrição de p27, PI3K estimula a ativação AKT que por sua vez fosforila fatores de transcrição FOXO (*forkhead box group O*) que são exportados ao citoplasma, impedindo que ativem a transcrição de p27 (Fujita, Sato et al. 2002; He, Wang et al. 2012). A cinase AKT também é capaz de fosforilar diretamente p27, induzindo a ligação p27 com 14-3-3 mediante a fosforilação no resíduo Thr 198 permitindo sua translocação para o citoplasma e degradação (Fujita, Sato et al. 2002). A via PI3K/AKT está ativa nos adenomas hipofisários (Musat, Korbonits et al. 2005; Dworakowska, Wlodek et al. 2009; Sajjad, Zieliński et al. 2013; Trovato, Torre et al. 2013).

1.3 Tratamento e abordagem medicamentosa na doença de cushing

O tratamento de escolha para a maioria dos pacientes com adenomas hipofisários secretores de ACTH é a cirurgia transesfenoidal, com uma taxa de remissão entre 65 a 90 % para macroadenoma e taxas <65 % para microadenomas. No entanto, apesar de remissão inicial após a cirurgia, muitos pacientes apresentam recorrência da doença em até 10 anos requerendo uma segunda linha de tratamento (Fleseriu and Petersenn 2012; Stratakis 2012). Doença recorrente ou persistente requer uma segunda linha de tratamento, que envolve repetidas cirurgias, radioterapia, adrenalectomia bilateral e/ou terapia medicamentosa (Colao, Petersenn et al. 2012). Radioterapia e adrenalectomia bilateral juntamente com terapia medicamentosa podem ser utilizadas como terceira linha de tratamento. A radioterapia hipofisária é utilizada para suprimir a hipersecreção de ACTH, mas a resposta a esse tratamento é lenta levando anos. Além disso, há altas chances de os pacientes desenvolverem hipopituitarismo.

A abordagem de tratamento de escolha deve ser analisada individualmente de acordo com cada paciente e com as características da doença (Bertagna, Guignat et al. 2009; Pivonello, De Leo et al. 2015). Uma série analisando

seguimento em longo prazo de 346 pacientes que utilizaram múltiplas estratégias para tratamento dos tumores secretores de ACTH mostra taxa de recorrência de 21,1% (Lambert, Goldberg et al. 2013). Dessa forma, justifica-se a busca por fármacos capazes de auxiliar na redução da secreção hormonal e controle da tumorigênese hipofisária. Dentre os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da Doença de Cushing encontramos os inibidores de esteroidogênese, os antagonistas do receptor do glicocorticoide e drogas com ação nos corticotróficos, como demonstrado na Figura 3 (Fleseriu 2014; Justin Seltzer, Charles E. Ashton et al. 2015).

Figura 3 - Atuais abordagens para terapia medicamentosa em Doença de Cushing.

(Adaptado de Fleseriu e Petersenn, 2012)

Inibidores de esteroidogênese como cetoconazol, metirapona, mitotane e etomidato bloqueiam múltiplas enzimas envolvidas na esteroidogênese com consequente redução nos níveis de cortisol pela glândula adrenal e consequente melhoria do quadro clínico, entretanto estes fármacos não são efetivos na regulação do eixo hipotálamo-hipófise -adrenal e não tratam o tumor hipofisário.(Fleseriu and Petersenn 2012; Justin Seltzer, Charles E. Ashton et al. 2015; Cuevas-Ramos, Lim et al. 2016). Cetoconazol é um fármaco antifúngico derivado do imidazol, que apresenta efeito inibitório na esteroidogênese adrenal e gonadal mostrando-se

efetivo no tratamento de 64% dos pacientes com Doença de Cushing, entretanto devido a danos hepáticos os pacientes devem ser monitorados principalmente nos primeiros meses de tratamento. Embora efetivo para um número significativo de pacientes, o cetoconazol está associado com escape de tratamento e hepatotoxicidade (Pivonello, De Leo et al. 2015).

Outro inibidor da síntese de cortisol é a metirapona, fármaco derivado da pirimidina que induz a normalização do cortisol em 71% dos pacientes, porém tratamento a longo prazo é limitado devido a efeitos adversos relacionados ao hiperandrogenismo. Etomidato é um derivado imidazólico utilizado como anestésico, devido a suas propriedades de inibição de esteroidogênese, é também utilizado no tratamento de pacientes com DC. É capaz de controlar rapidamente o hipercortisolismo, sendo recomendado para pacientes em estado grave com hipercortisolismo agudo. Durante o tratamento é recomendável o monitoramento dos níveis de cortisol e equilíbrio eletrolítico para detectar insuficiência adrenal (Pivonello, De Leo et al. 2015). O quimioterápico mitotano (o,p'-DDD) é derivado de difenilmetano utilizado em pacientes com DC devido suas propriedades adrenostáticas e adrenolíticas. Embora efetivo em 87% dos pacientes, seu uso é limitado devido aos efeitos adversos, como toxicidade neurológica, além de demora na eficácia sendo necessário um rigoroso monitoramento nos níveis da droga (Fleseriu 2014; Pivonello, De Leo et al. 2015).

O uso de bloqueador do receptor de glicocorticoide representa outra abordagem para tratamento da DC. Mifepristona é, atualmente, o único antagonista do receptor de glicocorticoides disponível, o qual atua bloqueando efetivamente a atividade do cortisol ao nível do receptor resultando em controle rápido dos efeitos sistêmicos do excesso de cortisol em pacientes com Síndrome de Cushing. É responsável em 75% dos pacientes por melhora nas manifestações clínicas, 60% dos pacientes apresentam melhora na tolerância a glicose e em quase 40% na pressão arterial. Entretanto, a hipercortisolemia persiste, uma vez que, este fármaco atua na ação do cortisol a nível central e periférico, afetando o feedback negativo por inibir CRH e secreção de ACTH. Além disto, este fármaco apresenta afinidade por receptores de progesterona e andrógenos levando a efeitos adversos na reprodução e/ou função sexual. (Fleseriu and Petersenn 2012; Fleseriu 2014; Justin Seltzer, Charles E. Ashton et al. 2015; Pivonello, De Leo et al. 2015; Cuevas-Ramos, Lim et al. 2016).

O tratamento medicamentoso direcionado à hipófise atua reduzindo a secreção de ACTH. Atualmente existem duas classes, os agonistas do receptor de dopamina tipo 2 e os agonistas de receptores de somatostatina. Carbegolina e bromocriptina são drogas agonistas do receptor de dopamina tipo 2. Estudos mostraram eficácia variável e efeitos adversos da bromocriptina em curto e em longo prazo, limitando sua utilização (Cuevas-Ramos, Lim et al. 2016). Apesar de alguns estudos mostrarem a eficácia da cabergolina na redução do cortisol em até 40% pacientes com DC os dados relativos à eficácia ainda são limitados. (Bertagna, Guignat et al. 2009; Fleseriu and Petersenn 2012; Fleseriu 2014; Cuevas-Ramos, Lim et al. 2016).

A somatostatina desempenha importante papel em várias condições patológicas como inibição da secreção hormonal e de fatores de crescimento, além de atuar como modulador da proliferação celular. Estas ações são mediadas através de ligação com diferentes subtipos de receptores de somatostatina (SSTR 1-5). (Kumar, Grigorakis et al. 2005). Somatostatina inibe a síntese e secreção de ACTH, e, desta maneira, vários estudos tem investigado a expressão dos cinco subtipos do receptor de somatostatina em corticotrofinomas. (Fleseriu and Petersenn 2012; Cuevas-Ramos, Lim et al. 2016). Nos adenomas corticotróficos humanos, o mRNA *SSTR5* é expresso em níveis muito mais elevados do que outros subtipos (Hofland, van der Hoek et al. 2005). Enquanto que, nas membranas celulares de células AtT-20 são predominantemente expressos *Sstr2* e *Sstr5* (Cervia, Nunn et al. 2003; Hoek, Waaijers et al. 2005). Com a geração de camundongos que hiperexpressam o *SSTR5* (Tg HP5), Yamamoto *et al*, demonstrou que o *SSTR5* além de diminuir a secreção de ACTH é capaz, via supressão de miR-449c diminuir a expressão do receptor do tipo 1 de CRH (CRH1R), reduzindo os níveis de CRH1R e a resposta de corticotróficos ao CRH, elucidando assim, um potencial mecanismo pelo qual o *SSTR5* controla a ação de CRH e causa a insuficiência adrenal secundária (Yamamoto, Ben-Shlomo et al. 2018).

Octreotide é um análogo da somatostatina com afinidade de ligação preferencial pelo *SSTR2*, entretanto em vários estudos de pacientes com hipercortisolismo esta droga não tem nenhum efeito nos níveis de ACTH. (Fleseriu and Petersenn 2012). SOM230 (pasireotide), análogo da somatostatina com alta afinidade de ligação para os *SSTR1*, *SSTR2*, *SSTR3* e *SSTR5*, é mais potente em suprimir a secreção de ACTH em cultura de tumores corticotróficos humanos do que

octreotide (Hofland, van der Hoek et al. 2005). SOM230 também reduz a liberação de ACTH em cultura celular de tumores corticotróficos de camundongo. (Murasawa, Kageyama et al. 2014). A inibição do eixo hipotálamo–hipófise–adrenal por pasireotide foi confirmada em modelo animal (Fleseriu and Petersenn 2012). Em um estudo duplo cego com 182 pacientes tratados com pasireotide, redução do cortisol livre urinário foi observada em 50% após 2 meses de tratamento e manteve-se estável. (Colao, Petersenn et al. 2012). Entretanto, esta droga apresenta efeitos adversos que incluem hiperglicemia, diabetes mellitus e efeitos gastrointestinais (Justin Seltzer, Charles E. Ashton et al. 2015; Cuevas-Ramos, Lim et al. 2016).

Estudos experimentais em cultura celular de tumor corticotrófico humano e de camundongos também tem demonstrado o efeito inibitório do cetoconazol na liberação de ACTH (Jimenez Reina, Leal Cerro et al. 1989; Feelders, Hofland et al. 2010), entretanto diversos estudos avaliando níveis de secreção de ACTH em pacientes tratados com cetoconazol não encontraram diferença quando comparado a linha de base (BOSCARO, SONINO et al. 1987).

Dois estudos foram desenvolvidos com o objetivo de analisar se a inibição da atividade do USP8 poderia ser uma estratégia de tratamento para pacientes com DC, uma vez que, adenomas hipofisários secretores de ACTH com USP8 mutado apresentam maior incidência da expressão de EGFR, elevados níveis da proteína EGFR e aumento da expressão de mRNA POMC, com consequente aumento da produção de ACTH. O tratamento com inibidor de USP8 em células AtT20 suprimiu a secreção de ACTH, diminui a viabilidade e levou as células a apoptose (Ma, Song et al. 2015; Jian, Li et al. 2016).

Devido às altas taxas de morbidade e mortalidade e à dificuldade de controle eficaz da doença em pacientes com DC, faz-se necessária uma abordagem terapêutica mais eficaz, apesar das diferentes drogas disponíveis. A utilização dos inibidores da via PI3K nos corticotrofinomas ainda não foi testada.

1.4 Hipóteses e justificativa

A inibição da via PI3K em câncer tem sido uma abordagem terapêutica promissora e foco de esforços significativos em pesquisa para o desenvolvimento clínico de novos agentes (Wen, Lee et al. 2012). Estudos pré-clínicos de inibidores de PI3K têm demonstrado atividade antiproliferativa em células de câncer e inibição do crescimento de xenoenxerto do tumor. BKM120 (Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) é um pan-inibidor oral da via PI3K, derivado de pirimidina. Conhecido como buparlisib, é um potente inibidor de todas as isoformas da PI3K classe I, capaz de penetrar a barreira hematoencefálica (Wen, Lee et al. 2012; Zhao, Hall et al. 2017). Estudos mostram que BKM120 possui um grande efeito antiproliferativo e pró-apoptótico em linhagens celulares e modelos animais de tumor sólido através da inibição específica da função biológica da AKT (Bendell, Rodon et al. 2012).

O P27 é um regulador endógeno do ciclo celular e está hipoexpresso nos cânceres humanos, inclusive nos adenomas hipofisários. Como a via PI3K está ativa nos adenomas hipofisários e pode estar relacionada à hipoexpressão de P27, a hipótese do presente estudo foi que o bloqueio farmacológico *in vitro* da PI3K poderia diminuir a secreção hormonal de ACTH e teria efeitos antitumorais em linhagem tumoral corticotrófica de camundongos. Dentre esses efeitos estariam a redução da proliferação celular, aumento da apoptose e regulação da expressão do P27.

Dessa forma, avaliamos os efeitos do inibidor de PI3K, o BKM120, em linhagem tumoral de células corticotróficas de camundongo. Comparamos os efeitos do BKM120 com o análogo de somatostatina SOM230, visto que estudos prévios com o SOM230 foram efetivos em demonstrar efeitos nos corticotróficos tumorais de camundongos e o SOM230 já vem sendo usado como tratamento alternativo para controle da DC.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar os efeitos *in vitro* do composto BKM120 (burpalisib), um pan-inibidor da via PI3K e do composto SOM230 (pasireotide), um análogo de somatostatina em linhagem celular de tumores corticotróficos de camundongo (AtT-20/D16v-F2).

2.2 Específicos

Em linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2, após tratamentos com BKM120 e SOM230:

- Avaliar a viabilidade celular,
- Quantificar a concentração de ACTH,
- Avaliar se existem alteração na expressão dos genes *Cdkn1b*, *Ccne1*, *Ccnd1*, *Cdk4*, *Cdk2*, *Rb1*, *Myc* e *POMC* após o tratamento com BKM120,
- Avaliar expressão proteica de AKT, CDKN1B, p70 S6 cinase e p85 S6 cinase após tratamento com BKM120,
- Avaliar o ciclo celular e apoptose após tratamento com BKM120.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este estudo, que envolve a utilização de linhagens celulares imortalizadas de origem animal, foi aprovado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COEBA) nos Processo nº 180/2011 e 186/2011. (Anexo 1).

3.2 Cultura celular de tumores corticotróficos de camundongo

A linhagem tumoral AtT20 é originária de tecido hipofisário de camundongos *Mus musculus* (Figura 4). É uma linha celular secretora de ACTH que foi clonada em 1966 por G. Sato, *et al.* (Buonassisi, Sato et al. 1962). O tumor da hipófise do rato foi originalmente estabelecido em camundongos LAF1 por J. Furth, *et al.* após radiação ionizante (Bahn, Furth et al. 1957).

Neste estudo utilizamos o subclone F2 de AtT20 (AtT-20/D16v-F2) desenvolvido por B. Gumbiner. AtT-20/D16v-F2 foi adquirida na *American Type Culture Collection* e o certificado de análise encontra-se no anexo 2.

Figura 4 - Morfologia das células de cultura celular da linhagem AtT- AtT-20/D16v-F2.

Para cultivo e descongelamento, utilizamos meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) acrescido de 10% Soro Bovino Fetal (SBF) 1% de Antibióticos (Penicilina e Streptomicina).

O descongelamento das células foi realizado por descongelamento rápido e o volume congelado no criotubo ressuspensionado em cinco vezes o volume do meio de cultivo contido no criotubo. Esta suspensão celular foi centrifugada a 1500 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, ao pellet de células foram acrescentados 5 ml de meio de cultivo e esta suspensão celular foi colocada em frascos de cultura de 25 cm². Estas células foram mantidas a uma temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e o meio de cultivo substituído a cada 3 dias. Quando a linhagem atingia 80-90% de confluência, fazia-se o repique destas células. Após sucessivas passagens, as células foram submetidas aos protocolos experimentais ou foram congeladas em 90% SBF e 10% DMSO e armazenadas em nitrogênio líquido para estoque.

3.3 Tratamento com agonista dos receptores de somatostatina

Pasireotide (SOM230) é um análogo da somatostatina de ação prolongada com atividade agonista melhorada em receptores de somatostatina SSTR 1,2, 3 e 5, que foi gentilmente fornecida pela Novartis Pharma AG (Basel Switzerland). Esta substância foi ressuspensa em água para concentração estoque de 2,59mM e armazenada de 2 a 4°C. Foram selecionadas as concentrações de 1 a 200nM pois estudos prévios demonstraram efeito antiproliferativo de SOM230 em concentrações de 10 e 100nM.

3.4 Tratamento com pan-inibidor da via PI3K

Buparlisib (BKM120) é um pan-inibidor oral da via PI3K, derivado de pirimidina que também foi fornecida pela Novartis Pharma AG (Basel Switzerland). Esta substância foi ressuspensa em DMSO para concentração estoque de 1,88mM e armazenada de 2 a 4°C.

As concentrações de 0,1 a 1,0μM foram selecionadas pois estudos prévios demonstraram efeito antiproliferativo de BKM120 em concentrações de 0,16 ±0,09 μM/L, e o IC 50 0,6 μM/L foi capaz de inibir a fosforilação de AKT. Concentrações

acima de 2 $\mu\text{M/L}$, levaram à alteração de citoesqueleto (Brachmann, Kleylein-Sohn et al. 2012).

3.5 Análise da viabilidade celular

O ensaio de proliferação celular não radioativo Cell Titer 96 Aqueous One Solution (Promega, Madison, WI, USA) foi utilizado para determinar a viabilidade das células tratadas com diferentes concentrações de SOM230 e BKM120. Neste ensaio, o composto MTS tetrazolium, na presença de NADPH e NADH produzidos por enzimas desidrogenases em células metabolicamente ativas, sofre biorredução resultando na formação de Formazan e ocorre mudança de cor amarela para marrom, quanto mais elevado for o número de células viáveis. Foram semeadas em placas de 96 poços 2×10^4 mil células AtT-20/D16v-F2. Depois de 48h o meio foi repostado e as células foram tratadas em triplicatas com controle e 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 e 200nM de SOM230 e com veículo e 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 μM de BKM120. As células controle para SOM230 foram tratadas com meio de cultivo e para BKM120 foram tratadas com veículo com concentrações de DMSO (0,5%) e meio. Após 24-96h de tratamento foram adicionados 20 μL Cell Titer 96 Aqueous One Solution a cada poço e incubado durante 2h a 37 °C. A absorvância a 490 nm foi obtida a partir de um leitor de microplacas (Biotek EL 808). Foram realizados, pelo menos três experimentos independentes.

3.6 Dosagem de ACTH

A determinação das concentrações de ACTH no sobrenadante da cultura celular AtT-20/D16v-F2 foi realizada por quimioluminescência utilizando o Siemens IMMULITE 2000XPi Immunoassay System (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA). Foram semeadas 100 mil células por poço, as células foram tratadas em triplicatas com controle e 1, 10 e 100nM de SOM230 e com veículo e 0,25, 0,5 μM de BKM120 e incubadas por 2h, 6h e 24h. As células controle para SOM230 foram tratadas com meio de cultivo e para BKM120 foram tratadas com veículo com concentrações de DMSO (0,5%) e meio. Foram realizados, no mínimo, três experimentos independentes. O coeficiente de variação (CV) intra-ensaios foi de

1,42% a 25,8 pg/ml e 3,96% a 394,0 pg/ml. O coeficiente de variação (CV) inter-ensaios foi de 4,46% a 27,5 pg/ml e 2,51% a 430,0 pg/ml.

3.7 Extração de RNA

Foram plaqueadas 10×10^4 células por poço e cultivadas em meio de crescimento em placa de 24 poços para posterior extração de RNA e proteína. Após 48h o meio de cultivo foi repostado e as células foram tratadas em triplicatas com veículo e 0,25 e 0,5 μ M de BKM120 por 24 e 48h. As células controle foram tratadas apenas com meio de cultivo e veículo com concentração de DMSO 0,5%. O RNA total de linhagem corticotrófica tumoral foi extraído pelo método do TRIzol® Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), segundo o protocolo do fabricante.

A quantificação do RNA nas amostras foi realizada através da equação de Beer-Lambert modificada utilizando absorbância em comprimento de onda 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000c (Fisher Scientific, Wilmington, Delaware USA) em comprimento de onda de 260 nm. O cálculo da razão entre a DO em 260 e 280 nm serviu para estimar o grau de pureza do RNA total sendo consideradas puras amostras de RNA com razão próxima a 2,0.

3.8 Síntese de cDNA por transcriptase reversa

A transcrição reversa foi realizada pela enzima *MultiScribe*™ e kit *High Capacity*™ *cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O volume final da reação foi de 25 μ L contendo 5 μ L de RNA a 100ng/ μ L, 2,5 μ L de primer randômico, 1,0 μ L de dNTP 100mM, 1,5 μ L de *MultiScribe*™, 2,5 μ L tampão 10X e 12,5 μ L de água DEPC.

As reações foram incubadas em um termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 – Applied Biosystems) a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 segundos, segundo protocolos fornecidos pelo fabricante.

3.9 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (QPCR)

Após a síntese de cDNA e diluição (1:5) a expressão relativa dos genes e controles endógenos foi avaliada por qPCR Taqman® da Applied Biosystems, Foster City, CA.

Os ensaios Taqman® (Gene Expression Assay) utilizados para os genes estudados foram: *Cdkn1b* (Mm00438168_m1), *Ccne1* (Mm00432367_m1), *Rb1* (Mm00485586_m1), *Ccnd1* (Mm00432359_m1), *Cdk4* (Mm00726334_s1), *Cdk2* (Mm00443947_m1), *Myc* (Mm00487804_m1). Para controles endógenos foram utilizados os ensaios: *Actb* (código 4352933E) e *Gapdh* (código 4352932E).

As reações foram realizadas em duplicatas, utilizando placas de 96 poços, incubadas à temperatura inicial de 50°C, por 2 min, seguidas de desnaturação a 95°C por 10 min e 40 ciclos sucessivos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. A fluorescência foi detectada a cada ciclo, obtendo-se gráfico de variação da fluorescência pelo número de ciclos (*Cycle Number*) (Figura 5). As curvas de amplificação foram visualizadas pelo software *ABI Prism® 7500*, a linha de base estabelecida (*Baseline*) e o limiar de detecção (*Threshold*) foram ajustados na fase exponencial do gráfico. O *Threshold* deve estar acima do ruído (*Background*) e abaixo da fase de platô das curvas de amplificação indicando o ponto de referência onde todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente, teoricamente correspondente à mesma quantidade de produto de PCR. A identificação do *Threshold* determina o estabelecimento do *cycle threshold* (Ct), ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar, servindo como base para comparação entre amostras.

A normalização dos resultados de cada amostra foi realizada pela subtração do Ct para o gene alvo pelo Ct do controle endógeno. Realizou-se uma média aritmética do Ct de cada controle endógeno para obtenção de um número correspondente a um Ct médio a fim de realizar a normalização das amostras de genes candidatos. A normalização e calibração dos resultados foram realizadas pelo cálculo do ΔCt e $\Delta\Delta Ct$, respectivamente. A expressão do gene nas amostras foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001). A mediana do valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras correspondentes às células tratadas com concentrações de BKM120 foi comparada a mediana dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras controle.

Figura 5 - Curva epresentativa da detecção de fluorescência durante amplificação pela reação de qPCR das amostras.

3.10 Western blot

Em placas de 6 poços foram semeadas 1×10^6 células por poço e tratadas em triplicatas com veículo e 0,25 e 0,5 μM de BKM120 por 24 e 48h. As células controle foram tratadas com veículo com concentrações de DMSO (0,5%) e meio. Após tratamento as células foram lizadas com 125 μL of CellLytic M (Sigma-Aldrich) e 1,25 μL de inibidor de protease (Sigma-Aldrich). Quarenta microgramas de proteína foram aplicadas em gel SDS-PAGE, transferidas para membranas de nitrocellulose, bloqueadas com 5% leite desnatado em tampão TBST-T e incubadas com anti-CDKN1B (diluição: 1:1000; #SAB4300420; Sigma-Aldrich), anti-p70 S6 cinase (diluição: 1:1000; #9202S; Cell Signaling), anti-p85 S6 cinase (diluição: 1:1000; #9202S; Cell Signaling), anti-phospo AKT (S437) (diluição: 1:1000; #9271S; Cell Signaling), anti-AKT (pan) (11E7)(diluição: 1:1000; #4585S; Cell Signaling). Anti- β -Actina (13E5) (diluição: 1:1000; #4970S; Cell Signaling) foi utilizado como controle endógeno. As membranas então foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho IgG-HRP (diluição: 1:3000; #Sc-2004; Santa Cruz Biotechnology) e reveladas

por quimioluminescência (ImageQuant Las400; GE Healthcare). As bandas obtidas foram analisadas utilizando o software ImageJ (Schneider, Rasband et al. 2012).

3.11 Avaliação do ciclo celular

Em placas de 24 poços foram semeadas 10×10^4 células por poço e cultivadas em meio de crescimento para posterior análise do ciclo celular. Após 48h o meio de cultivo foi repostado e as células foram tratadas em triplicatas com veículo e 0,25 e 0,5 μM de BKM120 por 48h. As células controle foram tratadas com veículo com concentrações de DMSO (0,5%) e meio.

As células foram ressuspensas em 500 μL de tripsina a 37°C e a tripsina foi bloqueada com a adição de meio de cultivo. Em seguida as células foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 RPM, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 500 μL de PBS 1 % em seguida foi centrifugado por 5 minutos a 10000 RPM. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado, agitando lentamente foi adicionado gota a gota 1000 μL de etanol gelado, e em seguida o material foi incubado overnight a -20°C. Após este período, o material foi centrifugado a 1250 RPM por 5 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 200 μL de solução de iodeto de Propídeo. O DNA contido nas células foi medido através de citometria de fluxo de acordo com manual do fabricante Guava Personal Cell Analysis system (Guava Technologies, Hayward, CA, USA). A porcentagem das células em G0/G1, S, ou G 2 /M foram realizados usando o *software* Guava CytoSoft 4.2.1. Foram realizados, no mínimo, três experimentos independentes.

3.12 Apoptose

Foram plaqueadas 100.000 células por poço em placas de 6 poços em triplicata e, após 48h, as células foram tratadas com veículo (0.5% DMSO) e com 0,5 μM de BKM120. Após 48h, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS 0.01 M, em seguida foram ressuspensas em tampão de ligação (Sigma Aldrich) a uma concentração 10^6 cells/mL. As células então foram ensaiadas de acordo com o protocolo do fabricante (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Sigma Aldrich) por citômetro de fluxo.

As células foram analisadas por citometria de fluxo. O procedimento consiste em ligação da Anexina V - FITC à fosfatidil serina na membrana celular de células em processo de apoptose recente, e a ligação ao iodeto de propídeo ao DNA das células que a membrana celular está totalmente comprometida. A anexina V - FITC é detectado como fluorescência verde e o iodeto de propídeo é detectado como fluorescência vermelha. Os resultados foram analisados com o software BD CellQuest Pro, considerando 10.000 eventos. Foram realizados, no mínimo, três experimentos independentes.

3.13 Análise estatística

O teste de ANOVA com pós-teste de Dunnett foi utilizado para todas as análises de comparação de viabilidade celular das células tratadas com veículo e com concentrações crescentes dos compostos SOM230 e BKM120.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por pós-teste de Dunn, foi utilizado para análise de expressão gênica e análises de comparação das concentrações de ACTH nas células tratadas com veículo e com concentrações crescentes do composto BKM120.

Para análise do ciclo celular foi utilizado o teste two-way ANOVA, seguido por pós-teste de Sidak e two-way ANOVA foi utilizado para análise de apoptose.

As análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade celular

4.1.1 Após tratamento com agonista dos receptores de somatostatina

A tabela 1 e a figura 6 mostram o efeito da administração do análogo do receptor de somatostatina -SOM230- na viabilidade celular de linhagem tumoral AtT-20/D16v-F2 em diferentes concentrações por 24h a 96 h, expressos em média $\pm$ desvio-padrão. Os dados individuais referentes à viabilidade celular em cada experimento encontram-se detalhados no Anexo 3.

Tabela 1 - Efeito de diferentes concentrações de SOM230 na viabilidade celular (%) de células AtT-20/D16v-F2.

Tempo incubação	Concentração de SOM230 (nM)								
	Controle	1	5	10	25	50	100	150	200
24h	101,9±4,9	99,2±10,9	97,1±15,6	98,2±13,8	95,0±9,7	98,7±20,2	102,0±14,2	102,1±11,5	99,5±12,0
48h	101,4±2,6	92,2±12,2	92,4±15,9	86,4±12,6	105,3±12,8	94,7±32,3	114,0±31,4	107,0±17,7	102,3±16,7
72h	104,0±7,1	95,4±19,8	96,1±27,8	102,6±22,0	96,0±24,5	105,7±50,6	120,6±24,7	126,0±37,2	107,2±18,1
96h	103,7±8,0	93,0±31,2	108,7±17,6	97,2±18,6	126,2±45,0	122,1±71,7	134,2±63,1	114,5±26,4	132,1±44,0

Dados expressos em média ± desvio-padrão de três a cinco diferentes experimentos.

O tratamento com as diferentes concentrações de SOM230 não foi capaz de diminuir a viabilidade celular da linhagem A AtT-20/D16v-F2 comparado com controle (Figura 6)

Figura 6 - Viabilidade das células AtT-20/D16v-F2 após tratamento com diferentes concentrações de SOM230.

Viabilidade celular foi calculada pela absorbância relativa normalizada pelo controle (C). Valores em média $\pm$ DP de pelo menos três experimentos independentes. Análise estatística: ANOVA. 24h $p=0,9833$; 48h $p=0,0002$; 72h $p=0,5884$; 96h $p=0,6418$.

4.1.2 Após tratamento com pan-inibidor da via PI3K

A tabela 2 e a figura 7 mostram o efeito da administração do pan-inibidor da via PI3K (BKM120) em diferentes concentrações na viabilidade celular de linhagem tumoral AtT-20/D16v-F2 após incubação por 24h às 96h, expresso em média $\pm$ desvio-padrão. Os dados individuais referentes à viabilidade celular em cada experimento encontram-se detalhados no Anexo 4.

Tabela 2 - Efeito de diferentes concentrações de BKM120 na viabilidade celular (%) de células AtT-20/D16v-F2.

Tempo de incubação	Dose BKM120 (uM)						
	Controle	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0
24h	100,1±0,2	97,8±16,4	95,1±16,7	79,4±13,3	64,8±19,6	64,9±18,8	67,2±18,9
48h	100,0±0,0	98,3±8,2	87,3±13,7	65,5±14,7	45,9±15,0	41,4±8,6	40,0±7,6
72h	101,1±2,6	104,9±16,6	96,4±29,0	70,5±33,2	45,2±17,8	43,3±19,6	42,3±16,3
96h	99,8±0,6	108,0±12,2	95,0±21,6	71,9±41,1	49,1±26,8	43,4±22,9	39,7±17,6

Dados expressos em média ± desvio-padrão de sete diferentes experimentos.

O tratamento das células AtT-20/D16v-F2 com 0,5, 0,75 e 1,0 μM do BKM120 após 24h de incubação resultou em diminuição na viabilidade celular em 35,3%, 35,2% e 32,9%, respectivamente ($p = <0,001$; Figura 7). Após 48h de tratamento, as concentrações de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 μM de BKM120 foram capazes de diminuir de forma dose-dependente a viabilidade das células AtT-20/D16v-F2 em 34,5%, 54,1%, 58,6% e 60,0%, respectivamente ($p = <0,001$; Figura 7) quando comparadas com o controle. Com 72h de incubação, observamos diminuição da viabilidade celular em 55,9%, 57,8% e 58,8% com concentrações de 0,5, 0,75 e 1,0 μM do BKM120, respectivamente ($p = <0,001$; Figura 7). O mesmo foi observado após 96h de tratamento, onde concentrações de 0,5, 0,75 e 1,0 μM da droga foram capazes de diminuir a viabilidade celular em 50,7%, 56,4% e 60,1%, respectivamente ($p = <0,001$; Figura 7).

Figura 7 - Viabilidade das células AtT-20/D16v-F2 após tratamento com diferentes concentrações de BKM120.

Viabilidade celular foi calculada pela absorbância relativa normalizada pelo controle (C). Valores em média $\pm$ DP de pelo menos 3 experimentos independentes. Análise estatística: ANOVA. 24h a 96h $p = <0,0001$.

4.2 Dosagem de ACTH

4.2.1 Após tratamento com agonista dos receptores de somatostatina

O efeito da administração de SOM230 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células AtT-20/D16v-F2 está demonstrado na tabela 3. Os dados individuais referentes à dosagem de ACTH em cada experimento encontram-se detalhados no Anexo 5. As células foram tratadas com meio e com concentrações de 1nM, 10nM e 100nM de SOM230 por 2h, 6h e 24 horas.

Não houve alteração na concentração de ACTH nas células AtT-20/D16v-F2 comparando com o controle após os tratamentos com 1 a 100nM de SOM230 por 2h e 24h de incubação. Após 6 horas de incubação com 100nM de SOM230 houve redução na concentração de ACTH em 29,8%; $p=0,009$). (Figura 8).

Tabela 3 - Efeito da administração de SOM230 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células AtT-20/D16v-F2.

Tempo de incubação	Dose SOM230 (nM)				<i>p</i>
	Controle	1	10	100	
2h	100,0±0,0	95,4±14,5	77,7±25,6	86,7±29,6	0,1317
6h	100,0±0,0	81,1±19,8	77,4±32,7	70,2±34,0	0,0831
24h	100,0±0,0	92,5±32,3	89,4±16,7	143,5±69,0	0,2016

Dados expressos em média ± desvio-padrão.

Figura 8 - Concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadantes de células AtT-20/D16v-F2 após tratamento com SOM 230.

Células foram tratadas com meio (C) e com diferentes doses 1nM, 10 nM e 100nM de SOM230 e incubadas por 2h, 6h e 24h. * $p=0,0831$.

4.2.2 Após tratamento com com pan-inibidor da via PI3K

O efeito da administração de BKM120 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células AtT-20/D16v-F2 está demonstrado na tabela 4. Os dados individuais referentes à dosagem de ACTH em cada experimento encontram-se detalhados no Anexo 5. As células foram tratadas com meio e veículo- (Controle) e com diferentes concentrações de 0,25 μ M e 0,5 μ M de BKM120 por 2h, 6h e 24 horas.

Não houve alteração na concentração de ACTH nas células AtT-20/D16v-F2 comparando com o controle após os tratamentos BKM120 por 2h de incubação. No entanto, após 6 horas de incubação com 0,25 μ M e 0,5 μ M de BKM120 houve redução na concentração de ACTH em 25,9% e 27,2%, respectivamente; $p=0,0002$). Após 24h, houve redução em 27,2 e 29,5% com 0,25 μ M e 0,5 μ M de BKM120 respectivamente; $p=0,0018$). (Figura 9).

Tabela 4 - Efeito da administração de BKM 120 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células AtT-20/D16v-F2.

Tempo de incubação	Dose BKM120 (uM)			p
	Controle	0,25	0,5	
2h	100,0±0,0	93,6±7,7	128,1±59,3	0,3638
6h	100,0±0,0	74,1±5,9	72,8±7,6	0,0002
24h	100,0±0,0	72,8±16,7	70,5±12,7	0,0018

Dados expressos em média ± desvio-padrão.

Figura 9 - Concentração de ACTH em % relativo ao controle no sobrenadantes de células AtT-20/D16v-F2 após tratamento com BKM120.

Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com diferentes doses de 0,25 μ M e 0,5 μ M de BKM120 e incubadas por 2h, 6h e 24h. *** p=0,0002; ** p=0,0018.

4.3 Expressão gênica

A expressão relativa de cada gene estudado em linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 24h e 48h de tratamento com BKM120 está demonstrada nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes estudados na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 24h de tratamento com diferentes concentrações de BKM120.

Gene	Controle	BKM 120 0,25 μ M	BKM 120 0,5 μ M	<i>p</i>
<i>Cdkn1b</i>	0,97 $\pm$ 0,06	1,68 $\pm$ 0,93	1,55 $\pm$ 0,83	0,009
<i>Ccnd1</i>	1,08 $\pm$ 0,13	1,65 $\pm$ 0,56	1,48 $\pm$ 0,60	0,18
<i>Ccne1</i>	1,00 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,30	0,75 $\pm$ 0,29	0,27
<i>Cdk4</i>	1,16 $\pm$ 0,21	1,12 $\pm$ 0,22	1,33 $\pm$ 0,49	0,36
<i>Cdk2</i>	1,18 $\pm$ 0,35	1,63 $\pm$ 1,08	1,28 $\pm$ 0,75	0,78
<i>Rb1</i>	1,01 $\pm$ 0,09	1,17 $\pm$ 0,06	1,05 $\pm$ 0,09	0,26
<i>Myc</i>	1,06 $\pm$ 0,04	1,49 $\pm$ 0,53	1,02 $\pm$ 0,59	0,25

Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão de três diferentes experimentos.

Tabela 6 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes estudados na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 48h de tratamento com diferentes concentrações de BKM120.

Gene	Controle	BKM 120 0,25 μ M	BKM 120 0,5 μ M	<i>p</i>
<i>Cdkn1b</i>	1,07 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,38	1,18 $\pm$ 0,35	0,61
<i>Ccnd1</i>	1,00 $\pm$ 0,04	1,51 $\pm$ 0,80	1,52 $\pm$ 0,78	0,34
<i>Ccne1</i>	1,09 $\pm$ 0,14	0,99 $\pm$ 0,16	1,28 $\pm$ 0,69	0,89
<i>Cdk4</i>	0,99 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,49	1,44 $\pm$ 0,27	0,06
<i>Cdk2</i>	1,09 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,29	1,11 $\pm$ 0,46	0,95
<i>Rb1</i>	1,00 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,40	1,26 $\pm$ 0,25	0,40
<i>Myc</i>	1,04 $\pm$ 0,05	1,22 $\pm$ 0,30	0,88 $\pm$ 0,16	0,10

Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão em três diferentes experimentos.

Observamos apenas o aumento da expressão do gene *Cdkn1b* após 24 de incubação comparada com o controle ($p=0,009$), com a concentração de $0,25\mu\text{M}$ (Figura 10). Não houve alteração na expressão dos genes *Ccnd1*, *Ccne1*, *Cdk4*, *Cdk2*, *Rb1*, *Myc* após 24h de incubação (Figura 11). Após 48h de incubação, não houve diferença na expressão do *Cdkn1b* (Figura 10) e nem dos outros genes estudados (Figura 12).

Figura 10 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) do gene *Cdkn1b* na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 24h e 48 h. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de $0,25\mu\text{M}$ e $0,5\mu\text{M}$.

Análise estatística: ANOVA. ** $p=0,009$

Figura 11 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos genes *Ccnd1*, *Ccne1*, *Cdk4*, *Cdk2*, *Rb1* e *Myc*, na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 24h de incubação. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 μ M e 0,5 μ M

Figura 12 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos genes *Ccnd1*, *Ccne1*, *Cdk4*, *Cdk2*, *Rb1* e *Myc*, na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 48h de incubação. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 μ M e 0,5 μ M.

4.4 Expressão proteica

A expressão de cada proteína estudada na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 24h e 48h de tratamento com BKM120 está demonstrada nas figuras 13 e 14.

Figura 13 - Expressão da AKT e CDKN1B na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 24h e 48h de tratamento com BKM120. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 μ M e 0,5 μ M.

Observamos redução da fosforilação de AKT de forma dose-dependente e tempo-dependente após o tratamento com BKM120(0,25 μ M e 0,5 μ M) $p=0,0029$ e $p=0,0003$ em 24h e $p=0,0056$ e $p=0,0005$ em 48h, respectivamente. Por outro lado, houve aumento da expressão proteica de CDKN1B após 24h de tratamento com BKM120(0,25 μ M e 0,5 μ M) $p<0,0001$ e $p=0,0001$, respectivamente. Este aumento também foi observado em 48h de tratamento com BKM120(0,25 μ M e 0,5 μ M) $p=0,0452$ e $p=0,369$. (Figura 13).

Figura 14 - Expressão da p85 S6 cinase e p70 S6 cinase na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 24h e 48h de tratamento com BKM120. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 μ M e 0,5 μ M.

Observamos aumento expressão de P70 S6 cinase de forma dose-dependente e tempo-dependente após o tratamento com BKM120(0,25 μ M e 0,5 μ M) $p < 0.0001$ e $p = 0,0002$ em 24h e $p = 0,0015$ e $p = 0,0002$ em 48h, respectivamente. Não houve diferença na expressão de p85 S6 cinase após 24 e 48h de tratamento com BKM120. (Figura 14).

4.5 Ciclo celular

A figura 15 mostra o efeito da administração do BKM120 nas concentrações de 0,25 μ M e 0,5 μ M na progressão do ciclo celular de linhagem tumoral AtT-20/D16v-F2 após 48h de incubação. Em ambas as concentrações observamos um aumento da porcentagem de células em G0/G1 em comparação com as células controles e consequentemente uma diminuição da porcentagem das células na fase S ($p < 0,0001$). Não houve diferença significativa na fase G2/M do ciclo celular.

Figura 15 - Progressão do ciclo celular, na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 48h de incubação. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 μ M e 0,5 μ M.

4.6 Apoptose

O efeito da administração de BKM120 na apoptose das células AtT-20/D16v-F2 está demonstrado na figura 16. Não houve diferença significativa na porcentagem de células apoptóticas após tratamento com BKM120 por 48h.

Figura 16 - Classificação de células apoptóticas por citometria de fluxo (Anexia V – FITC), na linhagem tumoral corticotrófica AtT-20/D16v-F2 após 48h de incubação. Células foram tratadas com meio e veículo (C) e com concentrações de BKM120 de 0,25 e 0,5 μ M.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos que o pan-inibidor de PI3K classe I-BKM120- foi capaz de reduzir a viabilidade celular e a secreção de ACTH em linhagem celular de tumor corticotrófico de camundongo AtT-20/D16v-F2, de forma superior ao SOM230. Adicionalmente, foi capaz ainda de levar à parada da progressão do ciclo celular, diminuir a fosforilação de AKT e levar ao aumento da expressão gênica e proteica de p27.

As células AtT20 são originadas de tumores corticotróficos de camundongos e servem como modelo de linhagem celular ideal para avaliar os mecanismos de secreção ACTH e POMC por secretarem altos níveis de ambos (Cawley, Rathod et al. 2016). Neste estudo, observamos que o SOM230 foi capaz de reduzir a secreção de ACTH em células AtT-20/D16v-F2 após 6h de tratamento a 100nM, entretanto não foi capaz de reduzir a viabilidade celular nesta linhagem mesmo em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação. Em acordo com nossos achados, Hofland *et al.* demonstraram redução da secreção de ACTH em 20% após tratamento com SOM230 10nM por 72horas (Hofland, van der Hoek et al. 2005). Murasawa *et al.* também demonstraram que o tratamento com SOM230 100nM por 24h foi capaz de reduzir discretamente a secreção de ACTH nas células AtT20. Entretanto, Murasawa *et al.* observaram que o SOM230 10nM e 100nM por 48h reduziu também a viabilidade das células AtT20 em 15% e 25%, respectivamente (Murasawa, Kageyama et al. 2014). No mesmo estudo, camundongos xenoexertados com células AtT20 apresentaram redução do peso do tumor após o tratamento com SOM230 por 14 dias (Murasawa, Kageyama et al. 2014).

Estudos com SOM230 em corticotrofos humanos também possuem resultados conflitantes. Em cultura de adenomas corticotróficos humanos, Hofland *et al.* observaram supressão da secreção de ACTH em 30-40% após tratamento com SOM230 100nM por 72horas (Hofland, van der Hoek et al. 2005). Entretanto, Ibanéz-Costa *et al.* não observaram redução de secreção de ACTH ou de viabilidade celular em culturas primárias de corticotrofinomas humanos (Ibáñez-Costa, Rivero-Cortés et al. 2016). Pasireotide foi capaz de diminuir os níveis de cortisol livre urinário (UFC) em 76% dos pacientes com doença de Cushing e 17% deles apresentaram normalização após o período de tratamento de 15 dias com doses subcutâneas de 600 microgramas duas vezes ao dia em um estudo clínico multicêntrico de fase 2 (Boscaro, Ludlam et al. 2009). Ainda, em um estudo de fase três, 162 pacientes com DC recorrente, persistente ou inelegíveis a cirurgia foram

randomizados a receber doses subcutâneas de 600µg ou 900µg por dose meses. A mediana do nível de cortisol livre na urina diminuiu cerca de 50% no segundo mês e permaneceu estável em ambos os grupos. Os níveis séricos e salivares de cortisol e ACTH plasmático diminuíram. Apesar da diminuição dos sinais e sintomas clínicos da doença de Cushing, o pasireotida foi associado a eventos adversos relacionados à hiperglicemia em 118 dos 162 pacientes (Colao, Petersenn et al. 2012). Esses dados confirmam o potencial uso de pasireotida como tratamento direcionado para adenomas hipofisários secretores de ACTH.

Apesar da maioria dos estudos, utilizar a expressão de POMC como sinônimo da secreção de ACTH, podem haver exceções. A proopiomelanocortina (POMC) é um pro-hormônio que codifica vários hormônios peptídicos menores, como ACTH. Após sua síntese no retículo endoplasmático rugoso, POMC é transportado para golgi trans onde ocorre sua maturação e é armazenado até ser liberado de um modo dependente de estímulos para os grânulos de secreção regulada. Este processo de seleção de POMC nos grânulos é complexo e tem sido alvo de estudos por muitos pesquisadores (Cawley, Li et al. 2016; Cawley, Rathod et al. 2016). Estudos demonstraram que POMC é capaz de interagir com carboxipeptidase E (CPE), facilitando seu tráfico para dentro dos grânulos secretórios. Knockdown para CPE mostram resultados conflitantes em células AtT20 em relação a secreção de ACTH (Cawley, Li et al. 2016; Cawley, Rathod et al. 2016). Cawley, *et al.* demonstraram aumento da secreção de ACTH (Cawley, Rathod et al. 2016), já em um estudo de outro grupo, a secreção de ACTH foi normal (Kemppainen and Behrend 2010). Interessantemente, em ambos estudos a secreção de POMC foi significativamente elevada. Secretogranina III (SgIII) é uma proteína que desempenha um papel chave no tráfico de cromogranina A para os grânulos de secreção e pode interagir com POMC. Cawley, *et al.* também demonstraram aumento significativo de secreção de POMC e redução na secreção de ACTH na via de secreção regulada em knockdown para SgIII. Estes resultados sugerem que fármacos que modulam a secreção de ACTH podem atuar em diferentes etapas e que as células endócrinas têm mecanismos que podem parcial ou completamente compensar uns aos outros os quais envolvem várias proteínas de membranas, como CPE e SgIII, com o objetivo de manter entrega precisa e específica de peptídeos bioativos a circulação.

Em nosso estudo, as doses utilizadas de BKM120 foram suficientes para inibir a via AKT, como demonstrado pela redução da fosforilação de AKT. Através da

inibição da via AKT, o BKM120 diminuiu significativamente a concentração de ACTH no sobrenadante das células AtT-20/D16v-F2 após 6h e 24h de tratamento. O BKM120 também diminuiu a viabilidade celular nesta linhagem em todos os tempos avaliados. Este é o primeiro estudo avaliando os efeitos do BKM120 em células corticotróficas. Chanal *et al.* avaliaram os efeitos de BKM120 em células hipofisárias secretoras de prolactina e GH. Nos ensaios *in vitro* com as células GH3 e SMtTW3 derivadas de tumores mamossomatotróficos de rato, o BKM120 não reduziu significativamente a viabilidade, provocou efeitos limitados no ciclo celular e não aumentou a apoptose, mas foi capaz de reduzir a expressão de ciclina E, quando comparado ao inibidor dual PI3K/mTOR BEZ235. Entretanto, nos ensaios *in vivo* com enxerto das células SMtTW3 em ratos, o BKM120 foi capaz de reduzir o peso tumoral, os níveis de prolactina, o índice mitótico tumoral, aumentar a apoptose das células tumorais de forma mais eficiente que o BEZ235. Ainda, em culturas primárias de prolactinomas humanos, BKM120 foi capaz de reduzir a secreção de prolactina, mas não reduziu viabilidade celular (Chanal, Chevallier et al. 2016).

Em linhagens celulares de gliomas e glioblastomas humanos com diferentes características genótípicas o BKM120 foi capaz de reduzir a viabilidade celular após 72h de tratamento (Koul, Fu et al. 2012; Jane, Premkumar et al. 2014). Em outro estudo, utilizando doze linhagens celulares de meduloblastoma foi observado que todas eram sensíveis ao BKM120, com os valores IC₅₀ que variaram de 0,279 a 4,38 μ M após 48h de incubação (Zhao, Hall et al. 2017). De fato, estudos pré-clínicos demonstram que o BKM120 tem efeito anti-proliferativo e pró-apoptótico em uma variedade de linhas de células tumorais, xenoenxertos e em pacientes com câncer associado a mutações ativadoras de PI3K. Recentemente, em estudo clínico de fase I avaliando os efeitos do BKM120 em 35 pacientes com tumores sólidos foi demonstrado que doses de 100mg/dia, o que corresponde a uma concentração em torno de 1 μ g/mL (2,2 μ M) da droga no plasma após 1 dia de tratamento, é uma dose segura e tolerável para o tratamento. Os efeitos colaterais frequentes relacionados ao tratamento incluíram erupção cutânea, hiperglicemia, diarreia, anorexia e alteração do humor (37% cada), náusea (31%), fadiga (26%), prurido (23%) e mucosite (23%) (Bendell, Rodon et al. 2012). Dessa forma, o composto BKM120 é uma droga com interessantes propriedades farmacológicas, altamente seletivo para PI3K de classe I e capaz de atravessar a barreira hematoencefálica

(Wen, Lee et al. 2012; Zhao, Hall et al. 2017), fornecendo assim uma possível abordagem terapêutica adicional para pacientes com Doença de Cushing.

Como a diminuição da viabilidade celular pode ser decorrente de uma parada do ciclo celular, também avaliamos o efeito do BKM120 na progressão do ciclo celular. Em nosso estudo observamos que o BKM120 induz a parada do ciclo na fase G0/G1, sugerindo uma alteração nos mecanismos que regulam a progressão do ciclo celular. Nossos resultados estão em acordo com estudo prévio em cultura primária humana de células T, o qual mostrou que a redução da proliferação causada pelo BKM120 estava relacionada a parada do ciclo celular na fase G1 (Blanco, Herrero-Sánchez et al. 2015). Estudos recentes em linhagem celular de câncer de pulmão não pequenas células sugerem que BKM120 induz parada na fase G1 do ciclo celular em concentrações baixas ($<2,0 \mu\text{M}$) e altas concentrações ($>2,0 \mu\text{M}$) levam a parada do ciclo celular em G2. (Jiang, Huang et al. 2016).

Entretanto, é sabido que em altas concentrações, o BKM120 tem efeitos na organização do citoesqueleto. Speranza *et al*, demonstraram que, além de possuir efeitos citotóxico e citostático, o BKM120 pode ter propriedades anti-invasivas em glioblastoma, devido à redução de adesão focal e velocidade de *treadmilling* dos microtúbulos. No mesmo estudo, em linhagem celulares e cultura primária de glioblastoma os efeitos anti-migratórios foram claramente distinguíveis dos efeitos citostáticos e citotóxicos. Adicionalmente, testes *in vivo* mostraram que o tratamento com BKM120 retarda a propagação do tumor em xenoenxerto intracraniano. No mesmo estudo BKM120 reduziu os números de adesão focal e velocidade de *treadmilling* dos microtúbulos em comparação com um inibidor seletivo de PI3K, GDC-0941. Apesar da droga ter demonstrado atividade anti-invasivas, faz-se necessária a investigação destas propriedades em estudos clínicos com pacientes com glioblastomas e em pacientes com outros tipos de tumores invasivos (Speranza, Nowicki et al. 2016).

Adicionalmente, avaliamos a expressão de possíveis reguladores do ciclo celular após administração com o BKM120. Em nosso estudo, observamos o aumento da expressão do gene *Cdkn1b*, após 24h de incubação na concentração de $0,25 \mu\text{M}$. Também observamos que BKM120 é capaz de causar aumento da expressão proteica de *CDKN1B* de forma dose-dependente e tempo-dependente. Estes dados sugerem que o BKM120 poderia aumentar a expressão de *CDKN1B* regulando assim a progressão do ciclo celular. O gene *CDKN1B* codificador da

proteína p27 é um inibidor de CDKs o qual impede a formação de complexo Ciclina D/Cdk4, Ciclina E/Cdk2, Ciclina A/Cdk2. É reconhecido como supressor tumoral por atrasar ou parar a progressão do ciclo celular. Diversos estudos tem demonstrado a hipoexpressão do p27 em adenomas hipofisários (Bamberger, Fehn et al. 1999; Martins, Camargo et al. 2016).

Outro gene que permite a progressão do ciclo celular é o gene *CCNE1* codificador da proteína E, complexo Ciclina E / CDK2 se torna ativo no final de G1 participando da transição da fase G1 para S. Animais adultos Tg:Pomc-Pttg desenvolveram neoplasias corticotróficas com hiperexpressão de ciclina E em um estudo avaliando peixe-zebra transgênicos com hiperexpressão de *Pttg* sob controle da região promotora de *Pomc* (Liu, Jiang et al. 2011). Em adenomas hipofisários, a expressão de *CCND1* e ciclinas D1 estão elevadas em relação a hipófises normais (Hewedi, Osman et al. 2011; Min Soo Kim, Kyu Hong Kim et al. 2014). O gene *RB1* é gene supressor tumoral e em tumores hipofisários invasivos foi demonstrada a perda da heterozigose do gene *RB1* (Pei, Melmed et al. 1995). Em 2007, Yoshino et al., em um estudo com tecidos de adenomas hipofisários confirmaram que o promotor de hipermetilação *RB1* estava presente em 35% dos casos. Em nosso estudo, não foi observada alteração na expressão de *Ccne1*, *Ccnd1*, *Cdk2*, *Cdk4* e *Rb1* após o tratamento com BKM120.

Estudos anteriores em diferentes tipos de tumores mostraram que o BKM120 pode inibir a proliferação celular e a progressão do ciclo celular e promover apoptose através da inibição seletiva da via PI3K/AKT/mTORC (Hennessy, Smith et al. 2005; Anderson, Park et al. 2015; Hu, Guo et al. 2015; Lu, Wang et al. 2017). Ativação do mTOR mediada por AKT estimula a proliferação celular. Ainda, mTOR regula a tradução em resposta a fatores de crescimento por fosforilação de componentes de síntese proteica, incluindo as proteínas quinases S6 ribossômicas (p70S6K) (Hennessy, Smith et al. 2005). Uma vez que BKM120 é um inibidor pan de PI3K e em nosso estudo apresentou efeitos antitumorais em células AtT-20/D16v-F2, nós também avaliamos se este composto poderia inibir efetivamente a via PI3K/Akt/mTOR. Para isto, examinamos a fosforilação de várias proteínas-chave envolvidas nesta via, incluindo AKT, p70 S6 cinase e p85 S6 cinase. Em nosso estudo, observamos que BKM120 em concentrações de 0,25 e 0,5µM reduziu a fosforilação de AKT, e aumentou a expressão proteica de p70 S6 cinase. Anderson e cols. descreveram redução da atividade de AKT em diferentes linhagens celulares

de sarcoma após o tratamento com buparlisib, levando a redução a proliferação celular e indução de apoptose. Neste estudo prévio, enquanto o tratamento inicial com BKM120 reduziu a atividade de AKT e moléculas de sinalização a jusante do mTORC1, experimentos ao longo do tempo revelaram a reativação do AKT em 24 horas, sugerindo uma possível remoção da inibição do feedback negativo. Ainda, experimentos de associações de drogas com BKM120 revelaram uma ação mais potente em comparação com o tratamento isolado com buparlisibe (Anderson, Park et al. 2015).

Outro fator que poderia estar relacionado às ações do BKM120 na viabilidade celular seria a indução da apoptose. A apoptose é um tipo de morte celular que ocorre durante várias situações fisiológicas e patológicas. É um fenômeno caracterizado por encolhimento celular, formação de membrana plasmática e condensação de cromatina nuclear e fragmentação de DNA (Fu, Begley et al. 1999). Estudos mostram que a desregulação da apoptose é um componente crítico na tumorigênese e que oncogenes e genes supressores tumorais podem regular a susceptibilidade das células que sofrem apoptose (Wang, Johnston et al. 1996). O fator de transcrição nuclear NF- κ B aumenta a sobrevivência das células tumorais via estimulação da proliferação celular e inativação da apoptose através da regulação da expressão de uma grande coorte de genes alvo, tais como c-Myc e hTERT (subunidade catalítica da telomerase) (Endoh, Tsuji et al. 2005; Luo, Kamata et al. 2005). Oncogenes como *MYC* estão relacionados com tumores endócrinos e *MYC* está frequentemente hiperexpresso em todos os tipos de tumores hipofisários (Quereda and Malumbres 2009). Em nosso estudo não observamos alterações na expressão de *Myc* após o tratamento com BKM120.

A Telomerase por sua vez é um complexo composto por uma subunidade catalítica (hTERT) e a pequena subunidade de RNA nuclear (RNA_hTR) que desempenha um papel fundamental no alongamento e manutenção dos telômeros nas extremidades dos cromossomos (Fu, Begley et al. 1999; Faragher 2000). A inativação de telomerase induz uma resposta supressora tumoral, como rápida senescência ou apoptose. Em estudo avaliando a administração de BKM120 em linhagens celulares malignas hematológicas, o crescimento cinético e a atividade metabólicas das células foram efetivamente inibidos. Este efeito citotóxico foi mais sensível em célula derivada de leucemia promielocítica aguda, NB4, através da ativação de caspase-3 e clivagem de poli(ADP)ribose polimerase (PARP).

Adicionalmente, no mesmo estudo, os autores avaliaram os efeitos da inibição de PI3k na progressão do ciclo celular e observaram um aumento da porcentagem das células na fase G1. Ainda, descobriram que BKM120 significativamente diminuiu o nível de expressão de mRNA de hTERT inibindo, portanto, a atividade de telomerase (Bashash, Delshad et al. 2017).

Ainda, em linhagem celular de câncer de pulmão de células não pequenas com mutações *EGFR* o BKM120 diminuiu a fosforilação de AKT, inibiu crescimento celular, foi capaz de causar parada no ciclo celular e induzir apoptose (Jiang, Huang et al. 2016). Nos corticotrofinomas, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é altamente expresso (Theodoropoulou, Reincke et al. 2015) e as mutações ativadoras do *USP8*, presentes em 35 a 50% desses tumores, levam à hiperexpressão do EGFR. Dessa forma, o efetivo bloqueio da via PI3K, que é *downstream* de EGFR, pode desempenhar um papel importante na regulação da proliferação e sobrevivência celular nesse tipo tumoral.

Outro fator que poderia estar relacionado aos efeitos anti-tumorais do BKM120 seria a possibilidade de interação com o escape das células tumorais à resposta imune. O desenvolvimento e a progressão do câncer provocam uma forte resposta imune antitumoral, através da qual o sistema imunológico pode eliminar as células cancerígenas. No entanto, o sistema imunológico pode facilitar o crescimento do tumor, selecionando as células com maior probabilidade de sobreviver e condicionando o microambiente do tumor para a sobrevivência e crescimento tumoral. A proteína de morte programada 1 (PD-1) é uma proteína transmembrana expressa em células T ativas. A interação de PD-1 com seu ligante (PDL1) leva a inibição da ativação e resposta das células T (Zerdes, Matikas et al. 2018). Em modelos animais de câncer de mama foi encontrado que o inibidor anti-PD1 associado com BKM120 é capaz de inibir a via PI3K, diminuir o crescimento tumoral e metástase, ao mesmo tempo esta associação foi capaz de aumentar a migração de células mieloides no tumor, o que poderia amplificar a resposta imune às células tumorais (Sai, Owens et al. 2017). Em decorrência do modelo estudado no presente estudo (culturas de células corticotróficas tumorais), não foi possível avaliar esse tipo de interação. Outros estudos, avaliando modelos mais complexos, como o efeito *in vivo* do BKM120 em tumores corticotróficos poderão trazer esclarecimentos adicionais.

O uso do BKM120 também tem sido proposto como terapia combinada com outras drogas para superar os efeitos da ativação da via. Em 2012, Ren et al., avaliaram em um painel de células humanas de câncer de pulmão não pequenas células (NSCLC) e em camundongos xenoenxertados o efeito da associação da droga BKM120 com everolimus (RAD001), inibidor alosterico de mTOR. A combinação de baixas concentrações de ambas as drogas exerceu um maior efeito do que o tratamento individual na supressão do crescimento das células NSCLC e em xenoenxertos. Ainda neste estudo, a associação das drogas levou à parada das células cancerígenas na fase G1 do ciclo celular e aumento da expressão de p21 (Ren, Chen et al. 2012). Em 2012, Juvekar et al., demonstraram o sinergismo da combinação de BKM120 com olaparibe, inibidor de PARP em um estudo pré-clínico em camundongos murinos, o que levou à investigação de um estudo clínico de fase 1, de escalonamento de dose sobre uso combinado destes dois compostos, em 69 pacientes com câncer recorrentes de mama ou ovariano. Dose máxima tolerada de BKM120 foi de 50mg e olaparibe 300mg. No geral a combinação foi bem tolerada sem interações medicamentosas, entretanto efeitos colaterais como depressão, hiperglicemia e aumento de transaminases foram observados. Além disso, esta combinação apresentou atividades antitumorais. Estas observações levantam a possibilidade de que o inibidor de PI3K e PARP combinação pode melhorar os resultados sobre o olaparibe isolado para pacientes com câncer de mama (Juvekar, Burga et al. 2012; Ando, Inada-Inoue et al. 2014).

Nosso estudo com BKM120, *in vitro*, demonstra supressão da secreção de ACTH e da proliferação de células AtT-20/D16v-F2, provenientes de tumor corticotrófico de camundongos, de forma superior ao SOM230, sugerindo a necessidade de se testar *in vivo* o fármaco BKM120, por apresentar potencial para o tratamento medicamentoso de tumores corticotróficos humanos. Além disso, em nosso estudo, observamos que BKM120 reduziu a fosforilação de AKT e aumentou a expressão proteica de p70 S6 cinase. Esses dados embasados por estudos da literatura justificam a possibilidade futura do uso de BKM120, como adjuvante para o tratamento da DC, em sinergismo com outras drogas visando a possibilidade de diminuir os efeitos da ativação da via PI3K/AKT, uma vez que nesse trabalho demonstramos que o BKM120 inibiu ativamente esta via. Além disso, o uso de BKM120 parece induzir parada da progressão do ciclo celular em G0/G1 e aumento de expressão genica e proteica de P27. A partir desses efeitos observados por nós

em células AtT-20/D16v-F2, estudos adicionais serão necessários para definir o papel do BKM120 na abordagem terapêutica para pacientes com corticotrofinomas.

6 CONCLUSÕES

O tratamento das células AtT-20/D16v-F2 com BKM120 diminuiu a concentração de ACTH no sobrenadante das células AtT-20 / D16v-F2, reduziu a fosforilação de AKT, aumentou a expressão proteica de p70 S6 cinase, causou aumento expressão gênica e proteica de CDKN1B e induziu parada no ciclo celular em G0-G1. Desta maneira, o bloqueio da via PI3K/AKT por BKM120 pode tornar-se terapia adjuvante promissora para pacientes com Doença de Cushing.

_____ 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Nosso estudo com BKM120, *in vitro*, demonstra redução da concentração de ACTH no sobrenadante das células AtT-20/D16v-F2, provenientes de tumor corticotrófico de camundongos, de forma superior ao SOM230, sugerindo a necessidade de se testar *in vivo* o fármaco BKM120, por apresentar potencial para o tratamento medicamentoso de tumores corticotróficos humanos.

Dessa forma, acreditamos que trabalhos futuros deverão avaliar os efeitos do BKM120 em modelo *in vivo* de tumor corticotrófico. Dentre os possíveis modelos, encontram-se o uso de animais xenoenxertados com células provenientes de linhagens tumorais.

Da mesma forma, também acreditamos que esses efeitos precisam ser estudados em células tumorais corticotróficas humanas. Para esta finalidade, o uso de cultura primária obtida a partir de tumores corticotróficos humanos seria interessante.

Adicionalmente, outros fármacos atuando na inibição da via PI3K/AKT também poderiam ser testados nos mesmos modelos experimentais. Ainda, a interação das mutações *USP8* e da via PI3K/AKT precisa ser melhor elucidada, tornando instigante o estudo desses fármacos em células carreadoras ou não dessas mutações.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, R., M. Carey, et al. (2010). "PI3K pathway-directed therapeutic strategies in cancer." Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000) 11(6): 615-628.

Anderson, J. L., A. Park, et al. (2015). "Evaluation of In Vitro Activity of the Class I PI3K Inhibitor Buparlisib (BKM120) in Pediatric Bone and Soft Tissue Sarcomas." PLoS ONE 10(9).

Ando, Y., M. Inada-Inoue, et al. (2014). "Phase I dose-escalation study of buparlisib (BKM120), an oral pan-class I PI3K inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors." Cancer science 105(3): 347-353.

Antonini, S. R. R., A. C. Latronico, et al. (2002). "Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in ACTH-secreting pituitary tumours." Clinical Endocrinology 57(5): 657-662.

Bahn, R., J. Furth, et al. (1957). "Morphologic and Functional Changes Associated With Transplantable ACTH-Producing Pituitary Tumors of Mice." The American Journal of Pathology 33(6): 1075-1097.

Bamberger, C., M. Fehn, et al. (1999). "Reduced expression levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in human pituitary adenomas." European Journal of Endocrinology 140(3): 250-255.

Bamberger, C. M., M. Fehn, et al. (1999). "Reduced expression levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in human pituitary adenomas." Eur J Endocrinol 140(3): 250-255.

Bashash, D., M. Delshad, et al. (2017). "Novel pan PI3K inhibitor-induced apoptosis in APL cells correlates with suppression of telomerase: An emerging mechanism of action of BKM120." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 91: 1-8.

Bendell, J. C., J. Rodon, et al. (2012). "Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors." J Clin Oncol 30(3): 282-290.

Bertagna, X., L. Guignat, et al. (2009). "Cushing's disease." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 23(5): 607-623.

Bilodeau, S., S. Vallette-Kasic, et al. (2006). "Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease." Genes & Development 20(20): 2871-2886.

Blanco, B., C. Herrero-Sánchez, et al. (2015). "Comparative effect of two pan-class I PI3K inhibitors used as anticancer drugs on human T cell function." International Immunopharmacology 28(1): 675-685.

Boscaro, M., L. Barzon, et al. (2000). "The diagnosis of cushing's syndrome: Atypical presentations and laboratory shortcomings." Archives of Internal Medicine 160(20): 3045-3053.

Boscaro, M., W. H. Ludlam, et al. (2009). "Treatment of Pituitary-Dependent Cushing's Disease with the Multireceptor Ligand Somatostatin Analog Pasireotide (SOM230): A Multicenter, Phase II Trial." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 94(1): 115-122.

Boscaro, M., N. Sonino, et al. (1987). "Response of pituitary-adrenal axis to corticotrophin releasing hormone in patients with cushing's disease before and after ketoconazole treatment." Clinical Endocrinology 27(4): 461-467.

Brachmann, S. M., J. Kleylein-Sohn, et al. (2012). "Characterization of the Mechanism of Action of the Pan Class I PI3K Inhibitor NVP-BKM120 across a Broad Range of Concentrations." Molecular Cancer Therapeutics 11(8): 1747-1757.

Buonassisi, V., G. Sato, et al. (1962). "HORMONE-PRODUCING CULTURES OF ADRENAL AND PITUITARY TUMOR ORIGIN." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 48(7): 1184-1190.

Cawley, N. X., Z. Li, et al. (2016). "60 YEARS OF POMC: Biosynthesis, trafficking, and secretion of pro-opiomelanocortin-derived peptides." Journal of molecular endocrinology 56(4): T77-T97.

Cawley, N. X., T. Rathod, et al. (2016). "Carboxypeptidase E and Secretogranin III Coordinately Facilitate Efficient Sorting of Proopiomelanocortin to the Regulated Secretory Pathway in AtT20 Cells." Molecular endocrinology (Baltimore, Md.) 30(1): 37-47.

Cervia, D., C. Nunn, et al. (2003). "Pharmacological characterisation of native somatostatin receptors in AtT-20 mouse tumour corticotrophs." British Journal of Pharmacology 139(1): 109-121.

Chanal, M., P. Chevallier, et al. (2016). "Differential Effects of PI3K and Dual PI3K/mTOR Inhibition in Rat Prolactin-Secreting Pituitary Tumors." Molecular Cancer Therapeutics 15(6): 1261-1270.

Chung, S., G. H. Son, et al. (2011). "Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1812(5): 581-591.

Colao , A., S. Petersenn , et al. (2012). "A 12-Month Phase 3 Study of Pasireotide in Cushing's Disease." New England Journal of Medicine 366(10): 914-924.

Coleman, J. and K. Miskimins (2009). Structure and activity of the internal ribosome entry site within the human p27Kip1 5'-untranslated region.

Cuevas-Ramos, D., D. S. T. Lim, et al. (2016). "Update on medical treatment for Cushing's disease." Clinical Diabetes and Endocrinology 2(1): 16.

Dahia, P. L., R. C. Aguiar, et al. (1998). "Mutation and expression analysis of the p27/kip1 gene in corticotrophin-secreting tumours." Oncogene 16(1): 69-76.

Dahia, P. L., A. Ahmed-Shuaib, et al. (1996). "Vasopressin receptor expression and mutation analysis in corticotropin-secreting tumors." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 81(5): 1768-1771.

Dahia, P. L. M., J. r. Honegger, et al. (1997). "Expression of Glucocorticoid Receptor Gene Isoforms in Corticotropin-Secreting Tumors*." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 82(4): 1088-1093.

Dworakowska, D., E. Wlodek, et al. (2009). "Activation of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in pituitary adenomas and their effects on downstream effectors." Endocrine-Related Cancer 16(4): 1329-1338.

Endoh, T., N. Tsuji, et al. (2005). "Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1- and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription." Experimental Cell Research 305(2): 300-311.

Faragher, R. G. A. (2000). "Cell senescence and human aging: where's the link?" Biochemical Society Transactions 28(2): 221-226.

Feelders, R. A., L. J. Hofland, et al. (2010). "Medical Treatment of Cushing's Syndrome: Adrenal-Blocking Drugs and Ketoconazole." Neuroendocrinology 92(suppl 1)(Suppl. 1): 111-115.

Fero, M. L., M. Rivkin, et al. "A Syndrome of Multiorgan Hyperplasia with Features of Gigantism, Tumorigenesis, and Female Sterility in p27^{Kip1}-Deficient Mice." Cell 85(5): 733-744.

Fleseriu, M. (2014). "Recent advances in the medical treatment of Cushing's disease." F1000Prime Reports 6: 18.

Fleseriu, M. and S. Petersenn (2012). "Medical management of Cushing's disease: what is the future?" Pituitary 15(3): 330-341.

Fu, W., J. G. Begley, et al. (1999). "Anti-apoptotic Role of Telomerase in Pheochromocytoma Cells." Journal of Biological Chemistry 274(11): 7264-7271.

Fujita, N., S. Sato, et al. (2002). "Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization." J Biol Chem 277(32): 28706-28713.

Grossman, A. B. (2017). "The Molecular Pathology of Cushing Disease: Are We Nearly There?" Journal of the Endocrine Society 1(2): 144-148.

He, W., X. Wang, et al. (2012). A Crosstalk Imbalance Between p27(Kip1) and Its Interacting Molecules Enhances Breast Carcinogenesis, Cancer Biother Radiopharm. 2012 Sep;27(7):399-402. doi:10.1089/cbr.2010.0802.

Hennessy, B. T., D. L. Smith, et al. (2005). "Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery." Nature Reviews Drug Discovery 4(12): 988-1004.

Hernández-Ramírez, L. C., R. Gam, et al. (2017). "Loss-of-function mutations in the CABLES1 gene are a novel cause of Cushing's disease." 24(8): 379.

Hewedi, I., W. Osman, et al. (2011). Differential expression of cyclin D1 in human pituitary tumors: Relation to MIB-1 and p27/Kip1 labeling indices.

Hoek, J. v. d., M. Waaijers, et al. (2005). "Distinct functional properties of native somatostatin receptor subtype 5 compared with subtype 2 in the regulation of ACTH release by corticotroph tumor cells." American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 289(2): E278-E287.

Hofland, L., J. van der Hoek, et al. (2005). The multi-ligand somatostatin analogue SOM230 inhibits ACTH secretion by cultured human corticotroph adenomas via somatostatin receptor type 5.

Hu, Y., R. Guo, et al. (2015). "Effects of PI3K inhibitor NVP-BKM120 on overcoming drug resistance and eliminating cancer stem cells in human breast cancer cells." Cell Death & Disease 6(12): e2020-e2020.

Ibáñez-Costa, A., E. Rivero-Cortés, et al. (2016). "Octreotide and pasireotide (dis)similarly inhibit pituitary tumor cells in vitro." Journal of Endocrinology 231(2): 135-145.

Ikeda, H., T. Yoshimoto, et al. (1997). "Molecular analysis of p21 and p27 genes in human pituitary adenomas." Br J Cancer 76(9): 1119-1123.

Jane, E. P., D. R. Premkumar, et al. (2014). "Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signaling by NVP-BKM120 Promotes ABT-737–Induced Toxicity in a Caspase-Dependent Manner through Mitochondrial Dysfunction and DNA Damage Response in Established and Primary Cultured Glioblastoma Cells." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 350(1): 22-35.

Jian, F. F., Y. F. Li, et al. (2016). "Inhibition of Ubiquitin-specific Peptidase 8 Suppresses Adrenocorticotrophic Hormone Production and Tumorous Corticotroph Cell Growth in AtT20 Cells." Chin Med J 129(17): 2102-2108.

Jiang, Z., J. Huang, et al. (2016). Combined use of PI3K and MEK inhibitors synergistically inhibits lung cancer with EGFR and KRAS mutations.

Jimenez Reina, L., A. Leal Cerro, et al. (1989). In vitro effects of ketoconazole on corticotrope cell morphology and ACTH secretion of two pituitary adenomas removed from patients with Nelson's syndrome.

Jin, L., X. Qian, et al. (1997). "Transforming growth factor-beta, transforming growth factor-beta receptor II, and p27Kip1 expression in nontumorous and neoplastic human pituitaries." Am J Pathol 151(2): 509-519.

Jolley, C. C., M. Ukai-Tadenuma, et al. (2014). "A mammalian circadian clock model incorporating daytime expression elements." Biophysical journal 107(6): 1462-1473.

Justin Seltzer, Charles E. Ashton, et al. (2015). "Gene and protein expression in pituitary corticotroph adenomas: a systematic review of the literature." Neurosurgical Focus 38(2): E17.

Juvekar, A., L. N. Burga, et al. (2012). "Combining a PI3K inhibitor with a PARP inhibitor provides an effective therapy for BRCA1-related breast cancer." Cancer Discov 2(11): 1048-1063.

Kemppainen, R. J. and E. N. Behrend (2010). "Acute inhibition of carboxypeptidase E expression in AtT-20 cells does not affect regulated secretion of ACTH." Regulatory Peptides 165(2): 174-179.

Korbonits, M. r., I. Bujalska, et al. (2001). "Expression of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Isoenzymes in the Human Pituitary: Induction of the Type 2 Enzyme in Corticotropinomas and Other Pituitary Tumors." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86(6): 2728-2733.

Korbonits, M. r., H. S. Chahal, et al. (2002). "Expression of Phosphorylated p27Kip1 Protein and Jun Activation Domain-Binding Protein 1 in Human Pituitary Tumors." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 87(6): 2635-2643.

Koul, D., J. Fu, et al. (2012). "Antitumor Activity of NVP-BKM120—A Selective Pan Class I PI3 Kinase Inhibitor Showed Differential Forms of Cell Death Based on p53 Status of Glioma Cells." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 18(1): 184-195.

Kumar, U., S. I. Grigorakis, et al. (2005). "Somatostatin receptors in primary human breast cancer: quantitative analysis of mRNA for subtypes 1–5 and correlation with receptor protein expression and tumor pathology." Breast Cancer Research and Treatment 92(2): 175-186.

Lambert, J. K., L. Goldberg, et al. (2013). "Predictors of Mortality and Long-term Outcomes in Treated Cushing's Disease: A Study of 346 Patients." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 98(3): 1022-1030.

le Sage, C., R. Nagel, et al. (2007). "Diverse ways to control p27Kip1 function: miRNAs come into play." Cell Cycle 6(22): 2742-2749.

Lidhar, K., M. Korbonits, et al. (1999). "Low expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors." J Clin Endocrinol Metab 84(10): 3823-3830.

Liu, N.-A., H. Jiang, et al. (2011). "Targeting zebrafish and murine pituitary corticotroph tumors with a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108(20): 8414-8419.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." Methods 25(4): 402-408.

Lloyd, R. V., L. Jin, et al. (1997). "Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors." Am J Pathol 150(2): 401-407.

Lu, Y., Q. Wang, et al. (2017). "Effective use of PI3K inhibitor BKM120 to treat human osteosarcoma." International Journal of Clinical and Experimental Medicine 10: 6378-6386.

Luo, J.-L., H. Kamata, et al. (2005). "IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy." The Journal of Clinical Investigation 115(10): 2625-2632.

Ma, Z. Y., Z. J. Song, et al. (2015). "Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease." Cell Res 25(3): 306-317.

Marinoni, I. and N. S. Pellegata (2010). "p27kip1: a new multiple endocrine neoplasia gene?" Neuroendocrinology 93(1): 19-28.

Martins, C., R. Camargo, et al. (2016). P27/CDKN1B Translational Regulators in Pituitary Tumorigenesis.

Min Soo Kim, Kyu Hong Kim, et al. (2014). "Results of immunohistochemical staining for cell cycle regulators predict the recurrence of atypical meningiomas." Journal of Neurosurgery 121(5): 1189-1200.

Mönig, H., I. U. Ali, et al. (1993). "Structure of the POMC Promoter Region in Pituitary and Extrapituitary ACTH Producing Tumors." Exp Clin Endocrinol Diabetes 101(01): 36-38.

Moreira, A. C., S. R. Antonini, et al. (2018). "MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: A sense of time of the glucocorticoid circadian clock: from the ontogeny to the diagnosis of Cushing's syndrome." 179(1): R1.

Morris, D. G., B. Kola, et al. (2003). "Identification of Adrenocorticotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acid in the Human Pituitary and Its Loss of Expression in Pituitary Adenomas." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 88(12): 6080-6087.

Murasawa, S., K. Kageyama, et al. (2014). "Inhibitory effects of SOM230 on adrenocorticotrophic hormone production and corticotroph tumor cell proliferation in vitro and in vivo." Molecular and Cellular Endocrinology 394(1): 37-46.

Musat, M., M. Korbonits, et al. (2005). "Enhanced protein kinase B/Akt signalling in pituitary tumours." Endocr Relat Cancer 12(2): 423-433.

Musat, M., M. Korbonits, et al. (2002). "The Expression of the F-Box Protein Skp2 is Negatively Associated with p27 Expression in Human Pituitary Tumors." Pituitary 5(4): 235-242.

Nakayama, K., N. Ishida, et al. "Mice Lacking p27^{Kip1} Display Increased Body Size, Multiple Organ Hyperplasia, Retinal Dysplasia, and Pituitary Tumors." Cell 85(5): 707-720.

Oyama, K., N. Sanno, et al. (2001). "Expression of neuro D1 in human normal pituitaries and pituitary adenomas." Mod Pathol 14(9): 892-899.

Pei, L., S. Melmed, et al. (1995). "Frequent Loss of Heterozygosity at the Retinoblastoma Susceptibility Gene (RB) Locus in Aggressive Pituitary Tumors: Evidence for a Chromosome 13 Tumor Suppressor Gene Other Than RB." Cancer Research 55(8): 1613-1616.

Perez-Rivas, L. G., M. Theodoropoulou, et al. (2015). "The Gene of the Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease." The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 100(7): E997-E1004.

Pivonello, R., M. De Leo, et al. (2015). "The Treatment of Cushing's Disease." Endocrine Reviews 36(4): 385-486.

Quereda, V. and M. Malumbres (2009). "Cell cycle control of pituitary development and disease." J Mol Endocrinol 42(2): 75-86.

Reincke, M., S. Sbiera, et al. (2014). "Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease." Nat Genet.

Ren, H., M. Chen, et al. (2012). "The combination of RAD001 and NVP-BKM120 synergistically inhibits the growth of lung cancer in vitro and in vivo." Cancer letters 325(2): 139-146.

Roussel-Gervais, A., C. Couture, et al. (2016). "The Cables1 Gene in Glucocorticoid Regulation of Pituitary Corticotrope Growth and Cushing Disease." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 101(2): 513-522.

Sai, J., P. Owens, et al. (2017). "PI3K Inhibition Reduces Mammary Tumor Growth and Facilitates Antitumor Immunity and Anti-PD1 Responses." Clinical Cancer Research 23(13): 3371-3384.

Sajjad, E. A., G. Zieliński, et al. (2013). "mTOR is Frequently Active in GH-Secreting Pituitary Adenomas without Influencing their Morphopathological Features." Endocrine Pathology 24(1): 11-19.

Schneider, C. A., W. S. Rasband, et al. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nat Methods 9(7): 671-675.

Speranza, M.-C., M. O. Nowicki, et al. (2016). "BKM-120 (Buparlisib): A Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase Inhibitor with Anti-Invasive Properties in Glioblastoma." Scientific Reports 6: 20189.

Stratakis, C. A. (2012). "Cushing Syndrome in Pediatrics." Endocrinology and metabolism clinics of North America 41(4): 793-803.

Takeuchi, S., H. P. Koeffler, et al. (1998). "Mutation and expression analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in pituitary tumors." J Endocrinol 157(2): 337-341.

Tanaka, C., K. Yoshimoto, et al. (1997). "Infrequent mutations of p27Kip1 gene and trisomy 12 in a subset of human pituitary adenomas." J Clin Endocrinol Metab 82(9): 3141-3147.

Tavares, M. R., I. C. B. Pavan, et al. (2015). "The S6K protein family in health and disease." Life Sciences 131: 1-10.

Theodoropoulou, M., M. Reincke, et al. (2015). "Decoding the genetic basis of Cushing's disease: USP8 in the spotlight." European Journal of Endocrinology 173(4): M73-M83.

Trovato, M., M. L. Torre, et al. (2013). "HGF/c-met system targeting PI3K/AKT and STAT3/phosphorylated-STAT3 pathways in pituitary adenomas: an immunohistochemical characterization in view of targeted therapies." Endocrine 44(3): 735-743.

Wang, D. G., C. F. Johnston, et al. (1996). "Expression of bcl-2 oncoprotein in pituitary tumours: comparison with c-myc." Journal of Clinical Pathology 49(10): 795-797.

Wen, P. Y., E. Q. Lee, et al. (2012). "Current clinical development of PI3K pathway inhibitors in glioblastoma." Neuro-Oncology 14(7): 819-829.

Yamamoto, M., A. Ben-Shlomo, et al. (2018). "Somatostatin receptor subtype 5 modifies hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress function." JCI Insight 3(19): 122932.

Yoshino, A., Y. Katayama, et al. (2007). "Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas." J Neurooncol 83(2): 153-162.

Zerdes, I., A. Matikas, et al. (2018). "Genetic, transcriptional and post-translational regulation of the programmed death protein ligand 1 in cancer: biology and clinical correlations." Oncogene.

Zhang, C., C. Kang, et al. (2009). "Co-suppression of miR-221/222 cluster suppresses human glioma cell growth by targeting p27kip1 in vitro and in vivo." Int J Oncol 34(6): 1653-1660.

Zhao, P., J. Hall, et al. (2017). "BKM120 induces apoptosis and inhibits tumor growth in medulloblastoma." PLoS ONE 12(6): e0179948.

Zheng, Y. and W. K. Miskimins (2011). "Far upstream element binding protein 1 activates translation of p27Kip1 mRNA through its internal ribosomal entry site." Int J Biochem Cell Biol 43(11): 1641-1648.

Anexo 1 – Certificado da comissão de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 180/2011, sobre o projeto intitulado "*Análise de genes envolvidos no controle da proliferação celular e apoptose na gênese molecular dos adenomas hipofisários*", sob a responsabilidade da Professora Doutora Margaret de Castro está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO em reunião de 27 de fevereiro de 2012.

(We certify that the protocol nº 180/2011, about "Assessment of genes involved in controlling cell proliferation and apoptosis in the molecular genesis of pituitary adenomas", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CUEEA) in 02/27/2012.

Ribeirão Preto, 27 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 186/2011, sobre o projeto intitulado "*Análise de genes envolvidos na regulação do ciclo celular e seu controle por proteínas ribossômicas na gênese molecular dos adenomas hipofisários*", sob a responsabilidade da Professora Doutora Margaret de Castro está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO em reunião de 27 de fevereiro de 2012.

(We certify that the protocol nº 186/2011, about "Assessment of cell cycle genes and ribosomal proteins in the molecular genesis of pituitary adenomas", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CUEEA) in 02/27/2012.

Ribeirão Preto, 27 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Anexo 2 – Certificado de análise da célula AtT-20/D16v-F2

CERTIFICATE OF ANALYSIS

ATCC® Number: CRL-1795™
Lot Number: 70013483
Name: AtT-20/D16v-F2
Description: Anterior Pituitary Tumor
Species: Mouse (*Mus musculus*)
Volume/Ampule: Approximately 1 mL
Date Frozen: 19MAR2018
Recovery: A T-25 setup at a seeding density of 4.0×10^4 viable cells/cm² reaches approximately 20% confluence in 1 day and 70% confluence in 6 days.
Product Format: Cells cryopreserved in the appropriate cryopreservation medium
Expiration Date: Not applicable
Storage Conditions: Vapor phase of liquid nitrogen

Test / Method	Specification	Result
Ampule passage number	Report results	Unknown + 5
Population doubling level (PDL)	Report results	Not applicable
Total cells/ampule (Cell count using Trypan Blue stain method)	Report results	3.1×10^6 total cells/ampule
Post-freeze viability (Cell count using Trypan Blue stain method)	$\geq 50.0\%$	72.2%
Growth properties (Visual observation method)	Adherent	Adherent
Morphology (Visual observation method)	Epithelial-like* and/or rounded	Epithelial-like and rounded
Test for mycoplasma contamination Hoechst DNA stain (indirect) method Agar culture (direct) method PCR-based assay	None detected None detected None detected	None detected None detected None detected
Species determination: COI assay (interspecies)	Mouse	Mouse
Sterility test (BacT/ALERT 3D) IAST bottle (aerobic) at 32.5°C INST bottle (anaerobic) at 32.5°C	No growth No growth	No growth No growth

* Epithelial-like: Any adherent cells of a polygonal shape with clear, sharp boundaries between them.

ATCC
 10801 University Boulevard
 Manassas, VA 20110-2209 USA
 www.atcc.org

800-638-6597 or 703-385-2700
 Fax: 703-385-2790
 E-mail: tech@atcc.org
 or contact your local distributor

- Page 1 of 2 -

Template Doc ID: 31194

Template Revision: 5

Template Effective Date: 10/16/2017

Anexo 3 - Efeito de diferentes concentrações de SOM 230 na viabilidade celular (%) de células ATt20.

Tabela 7 - Efeito de diferentes concentrações de SOM 230 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 24horas.

	Dose SOM 230 (nM), incubação por 24h								
	Controle	1	5	10	25	50	100	150	200
Experimento 1	100,6±6,3	88,3±4,2	91,9±2,2	93,1±4,5	92,0±0,7	66,6±4,5	97,6±3,6	ND	ND
Experimento 2	100,0± 0,4	92,6±0,6	90,1±10,5	97,3±1,9	94,2±1,7	91,1±2,0	93,3±1,2	97,1±3,3	94,1±5,3
Experimento 3	113,0±7,2	117,6±4,2	111,3±2,7	108,8±0,5	112,7±4,0	123,6±4,3	126,0±5,1	118,4±3,3	121,6±2,6
Experimento 4	100,0±3,3	92,0±1,9	91,2±3,7	94,2±1,7	81,2±1,5	83,9±1,7	85,2±1,5	93,4±3,0	90,0±3,9
Experimento 5	100,0±14,8	108,7±2,6	102,2±6,5	108,5±10,2	96,3±16,4	101,6±15,0	93,4±11,4	106,9±6,1	98,0±6,8
Experimento 6	100,0±4,6	91,7±3,0	72,7±6,7	72,5±8,1	89,1±14,4	103,4±7,0	102,9±5,1	87,3±9,4	90,2±8,6
Experimento 7	100,0±2,1	103,5±7,9	120,0±5,5	112,8±3,1	99,4±4,5	120,6±19,0	115,6±6,5	109,2±3,6	103,4±6,4
Média	101,9±4,9	99,2±10,9	97,1±15,6	98,2±13,8	95,0±9,7	98,7±20,2	102,0±14,2	102,1±5,8	111,5 99,5±12,0

Tabela 8 - Efeito de diferentes concentrações de SOM230 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 48horas.

	Dose SOM 230 (nM), incubação por 48h								
	Controle	1	5	10	25	50	100	150	200
Experimento 1	100,0±11,6	69,0±5,6	62,9±8,2	90,9±20,0	97,2±10,0	27,8±5,9	105,3±4,2	ND	ND
Experimento 2	100,0±5,8	89,6±8,4	79,0±8,9	85,4±14,2	101,5±10,8	108,4±9,2	97,2±4,2	100,0±7,4	95,5±3,4
Experimento 3	100,0±5,6	107,6±0,6	105,9±0,9	102,9±1,4	108,8±8,7	111,3±1,8	104,5±14,5	110,0±5,0	106,3±1,3
Experimento 4	106,7±2,4	90,6±5,1	95,9±5,8	63,2±9,5	90,2±2,5	89,5±6,9	90,0±4,3	93,5±1,4	106,8±9,0
Experimento 5	103,3±1,5	96,7±9,7	99,7±9,6	91,1±12,9	130,9±9,0	123,3±10,2	108,7±13,1	124,0±10,5	125,7±16,6
Experimento 6	100,0±8,8	101,3±6,8	96,9±8,2	92,9±9,9	105,3±11,6	87,5±12,0	183,4±22,5	130,1±28,4	104,6±14,9
Experimento 7	100,0±4,4	90,7±8,4	106,2±12,7	78,4±23,7	102,9±28,0	115,4±9,1	108,8±8,4	84,6±24,3	74,7±27,8
Média	101,4±2,6	92,2±12,2	92,4±15,9	86,4±12,6	105,3±12,8	94,7±32,3	114,0±31,4	107,0±17,7	102,3±16,7

Tabela 9 - Efeito de diferentes concentrações de SOM 230 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 72horas.

	Dose SOM 230 (nM), incubação por 72h								
	Controle	1	5	10	25	50	100	150	200
Experimento 1	106,3±9,8	74,1±6,9	74,3±3,2	75,4±3,7	107,8±0,7	21,2±0,5	101,9±0,1	ND	ND
Experimento 2	100,0±2,9	97,2±0,6	97,1±2,7	88,6±12,0	99,2±2,6	103,8±1,0	102,4±2,6	101,5±6,3	96,2±2,1
Experimento 3	117,6±4,5	125,4±2,8	129,7±1,2	126,1±7,5	57,5±11,5	122,5±16,7	136,5±3,6	136,7±3,0	133,4±4,5
Experimento 4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Experimento 5	100,0±5,0	74,4±4,9	90,1±3,4	86,3±1,9	85,9±5,4	100,9±24,6	131,4±5,1	127,7±0,6	103,3±4,5
Experimento 6	100,0±2,0	93,3±15,4	59,7±4,2	112,1±16,0	94,0±23,6	106,9±4,8	94,3±2,4	83,4±18,3	87,1±21,0
Experimento 7	100,0±31,8	108,2±2,6	125,9±21,9	126,8±25,8	131,4±49,3	178,7±22,0	156,8±6,7	180,7±93,8	116,2±48,3
Média	104,0±7,1	95,4±19,8	96,1±27,8	102,6±22,0	96,0±24,5	105,7±50,6	120,6±24,7	126,0±37,2	107,2±18,1

Tabela 10 - Efeito de diferentes concentrações de SOM 230 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 96 horas.

	Dose SOM 230 (nM), incubação por 96h								
	Controle	1	5	10	25	50	100	150	200
Experimento 1	100,0±12,1	42,2±5,5	102,1±8,6	98,1±23,9	98,7±50,5	26,8±1,3	89,8±44,5	ND	ND
Experimento 2	102,5±8,6	91,7±2,2	97,1±3,7	90,0±1,4	98,0±7,0	103,7±5,0	105,3±2,1	97,8±2,2	104,7±7,2
Experimento 3	120,0±7,9	140,5±5,5	141,4±1,6	131,4±3,1	141,2±1,6	140,2±8,8	129,5±5,3	125,8±16,3	138,8±5,7
Experimento 4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Experimento 5	100,0±2,4	91,4±7,1	98,0±6,5	98,2±8,4	119,0±2,5	113,5±3,0	120,8±4,8	125,2±6,0	132,3±3,5
Experimento 6	100,0±1,4	95,8±14,4	97,3±27,0	76,2±25,1	90,4±24,3	102,0±3,4	100,1±13,4	78,4±145,4	84,3±24,1
Experimento 7	100,0±5,4	96,2±6,9	116,2±18,0	89,4±46,2	209,9±88,1	246,4±25,8	259,6±9,7	145,4±80,7	200,3±91,2
Média	103,7±8,0	93,0±31,2	108,7±17,6	97,2±18,6	126,2±45,0	122,1±71,7	134,2±63,1	114,5±26,4	132,1±44,0

Anexo 4 - Efeito de diferentes concentrações de SOM 230 na viabilidade celular (%) de células ATt20

Tabela 11 - Efeito de diferentes concentrações de BKM 120 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 24horas.

	Dose BKM 120 (uM), incubação por 24h						
	Controle	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0
Experimento 1	100,6±6,3	106,8±12,1	105,2±5,2	72,3±5,0	50,0±2,8	67,3±2,1	72,5±3,4
Experimento 2	100,0±2,1	101,5±3,9	96,9±0,7	93,0±2,9	85,6±2,4	84,3±0,4	86,4±5,5
Experimento 3	100,0±2,3	87,4±4,6	89,1±3,3	86,8±4,3	69,3±4,9	69,9±1,5	71,7±0,6
Experimento 4	100,0±5,8	90,2±3,6	88,6±2,0	79,9±2,9	79,1±4,5	72,8±2,6	69,8±0,2
Experimento 5	100,0±7,4	126,5±19,95	118,7±3,9	88,5±2,9	83,4±6,6	77,0±2,0	80,1±1,8
Experimento 6	100,0±7,2	74,8±8,4	65,4±10,1	53,4±6,9	35,0±1,0	30,3±3,2	28,3±3,7
Experimento 7	100,0±11,9	97,7±6,7	101,5±7,5	81,9±3,0	50,9±3,2	60,3±13,1	61,7±7,0
Média	100,1±0,2	97,8±16,4	95,1±16,7	79,4±13,3	64,8±19,6	64,9±18,8	67,2±18,9

Dados estão apresentados em média e desvio padrão (± SD)

Tabela 12 - Efeito de diferentes concentrações de BKM 120 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 48 horas.

	Dose BKM 120 (uM), incubação por 48h						
	Controle	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0
Experimento 1	100,0±11,6	107,6±13,5	108,9±8,4	66,0±10,6	22,1±1,3	44,4±6,6	44,3±1,5
Experimento 2	100,0±12,7	102,1±5,7	91,5±6,4	76,6±5,5	50,2±6,6	46,0±1,4	41,9 ±2,5
Experimento 3	100,0±5,2	105,1±3,9	88,5±0,2	76,7±2,5	55,6±4,7	46,8±2,3	46,9±3,0
Experimento 4	100,0±15,5	91,3±1,9	95,4±9,0	83,5±7,3	68,4±6,2	51,7±2,2	45,2±3,8
Experimento 5	100,0±1,7	102,4±12,4	65,1±1,2	61,7±8,2	49,9±3,0	51,6±3,9	43,2±2,6
Experimento 6	100,0±1,2	94,3±3,3	79,9±7,6	48,4±6,9	40,1±6,6	28,0±4,2	27,6±1,1
Experimento 7	100,0±0,7	85,1±11,9	81,7±10,0	45,3±9,9	34,8±2,1	31,6±1,2	30,6±4,4
Média	100,0±0,0	98,3±8,2	87,3±13,7	65,5±14,7	45,9±15,0	41,4±8,6	40,0±7,6

Dados estão apresentados em média e desvio padrão (± SD)

Tabela 13 - Efeito de diferentes concentrações de BKM 120 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 72 horas.

	Dose BKM 120 (uM), incubação por 72h						
	Controle	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0
Experimento 1	106,3±9,8	104,0±9,2	108,3±8,9	86,1±6,7	23,1±1,6	30,1±7,3	36,4±6,6
Experimento 2	100,0±0,9	96,9±6,4	87,7±7,4	89,7±4,1	50,8±1,5	37,2±4,4	41,1±2,1
Experimento 3	100,0±14,3	132,7±9,0	138,7±4,6	116,7±6	63,1±6,5	76,2±4,2	68,2±11,2
Experimento 4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Experimento 5	100,0±3,9	83,5±12,1	50,5±7,7	29,1±4,0	22,9±1,8	20,1±1,2	18,9±0,1
Experimento 6	100,0±1,6	99,7±5,8	89,8±3,9	62,5±7,8	58,7±9,7	43,2±0,8	39,4±0,5
Experimento 7	100,0±11,1	112,5±10,2	103,5±3,5	39,0±3,3	52,7±14,4	52,9±16,3	49,9±5,4
Média	101,6±2,6	104,9±16,6	96,4±29,0	70,5±33,2	45,2±17,8	43,3±19,6	42,2±16,3

Dados estão apresentados em média e desvio padrão (± SD)

Tabela 14 - Efeito de diferentes concentrações de BKM 120 na viabilidade celular (%) de células ATt20 em 96 horas.

	Dose BKM 120 (uM), incubação por 96h						
	Controle	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0
Experimento 1	98,6±8,8	108,9±3,6	110,3±17,5	115,3±1,6	30,1±0,2	47,9±17,1	50,4±12,2
Experimento 2	100,0±1,3	101,1±8,5	98,7±11,7	107,7±5,3	67,3±6,5	36,4±7,1	40,0±5,6
Experimento 3	100,0±9,8	102,1±5,4	115,7±3,5	104,0±6,8	95,0±10	84,7±4,6	67,3±9,2
Experimento 4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Experimento 5	100,0±1,7	99,1±10,3	54,3±3,0	28,2±2,9	27,7±3,4	17,3±0,2	16,7±1,8
Experimento 6	100±0,1	131,9±5,36	94,84±5,2	43,71±8,3	41,63±4,56	44,12±10,5	35,22±7,1
Experimento 7	100±3,2	105±4,13	96,456±6,34	32,58±4,5	32,6±1,38	30,1±0,83	28,52±3,7
Média	99,8±0,6	108,0±12,2	95,0±21,6	71,9±26,8	49,1±26,8	43,4±22,9	39,7±17,6

Dados estão apresentados em média e desvio padrão (± SD)

ND- não disponível

Anexo 5 - Efeito da administração de SOM 230 na concentração de ACTH no sobrenadante das células ATt20.

Tabela 15 - Efeito da administração de SOM 230 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células ATt20 por 2 horas.

Tempo de incubação 2h	Dose SOM 230 (nM)			
	Controle	1	10	100
Experimento 1	100,0±3,6	78,6±10,1	50,0±2,0	64,4±0,8
Experimento 2	100,0±10,1	103,2±15,0	82,5±10,1	75,4±3,9
Experimento 3	100,0±13,1	104,3±9,5	100,6±7,8	120,2±6,1
Média	100,0±0,0	95,4±14,5	77,7±25,6	86,7±29,6

Dados expressos em média ± desvio-padrão.

Tabela 16 - Efeito da administração de SOM 230 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células ATt20 por 6 horas.

Tempo de incubação 6h	Dose SOM 230 (nM)			
	Controle	1	10	100
Experimento 1	100,0±4,0	58,5±2,9	48,0±0,6	43,9±7,5
Experimento 2	100,0±3,6	95,1±3,0	112,6±1,2	108,6±10,1
Experimento 3	100,0±14,0	89,7±20,5	71,6±9,1	58,1±6,5
Média	100,0±0,0	81,1±19,8	77,4±32,7	70,2±34,0

Dados expressos em média ± desvio-padrão.

Tabela 17 - Efeito da administração de SOM 230 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células ATt20 por 24 horas.

Tempo de incubação 24h	Dose SOM 230 (nM)			
	Controle	1	10	100
Experimento 1	100,0±1,2	61,9±3,1	70,2±1,6	223,0±13,1
Experimento 2	100,0±10,2	126,3±22,8	100,4±26,8	108,1±32,4
Experimento 3	100,0±12,4	89,4±6,3	97,6±3,8	99,4±5,7
Média	100,0±0,0	92,5±32,3	89,4±16,7	143,5±69,0

Dados expressos em média ± desvio-padrão

Anexo 6 - Efeito da administração de SOM 230 na concentração de ACTH no sobrenadante das células ATt20.

Tabela 18 - Efeito da administração de BKM 120 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células ATt20 por 2 horas.

Tempo de incubação 2h	Dose BKM 120 (uM)		
	Controle	0,25	0,5
Experimento 1	100,0±10,6	90,7±10,5	94,8±6,9
Experimento 2	100,0±12,3	87,7±1,4	93,0±4,3
Experimento 3	100,0±29,9	102,2±7,8	196,5±47,1
Média	100,0±0,0	93,6±7,7	128,1±59,3

Dados expressos em média ± desvio-padrão.

Tabela 19 - Efeito da administração de BKM 120 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células ATt20 por 6 horas.

Tempo de incubação 6h	Dose BKM 120 (uM)		
	Controle	0,25	0,5
Experimento 1	100,0±12,0	67,3±7,8	74,9±8,8
Experimento 2	100,0±6,6	77,4±6,3	79,2±4,5
Experimento 3	100,0±18,4	77,6±11,6	64,4±9,6
Média	100,0±0,0	74,1±5,9	72,8±7,6

Dados expressos em média ± desvio-padrão.

Tabela 20 - Efeito da administração de BKM 120 na concentração de ACTH (% relativa ao controle) no sobrenadante das células ATt20 por 24 horas.

24h	Dose BKM 120 (uM)		
	Controle	0,25	0,5
Experimento 1	100,0±5,8	61,8±6,0	63,8±3,2
Experimento 2	100,0±23,2	64,6±1,2	62,7±1,6
Experimento 3	100,0±7,1	92,0±6,0	85,2±5,5
Média	100,0±0,0	72,8±16,7	70,5±12,7

Dados expressos em média ± desvio-padrão.

Anexo 7 – Artigo

Inhibitory effects of BKM120 on adrenocorticotrophic hormone production and corticotroph tumor cell proliferation

Helen Alves Oliveira¹, Ana Carolina Bueno², Renata Sicchieri Pugliesi², Silva, Rui Milton Patrício², Margaret de Castro¹, Clarissa Silva Martins¹,

Departments of (1) Internal Medicine and (2) Pediatrics of Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo.

Corresponding author:

Clarissa Silva Martins

Abstract

Cushing disease caused by adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary adenomas. There is no effective pituitary targeted pharmacotherapy for Cushing disease. The PI3K/AKT pathway plays essential regulatory roles in different cellular processes including cell survival, proliferation, differentiation, cytoskeletal organization, and glucose transport, and is often constitutively activated in human cancers, providing opportunities for therapeutic intervention. The BKM120, a selective pan class I PI3K inhibitor, has been reported to exerts anti-proliferative and cytotoxic effects on solid tumor via selective AKT inhibition. Here, we examined the effects of BKM120, on AtT-20/D16v-F2 mouse pituitary corticotrophinoma cells. BKM120 decreased ACTH levels in the culture medium levels in AtT-20/D16v-F2 cells, suggesting that BKM120 suppresses ACTH synthesis and secretion in corticotroph tumor cells. BKM120 also decreased cell proliferation in AtT20 cells. Furthermore, BKM120 treatment caused changes in expression of P27 and the induction of a robust G0–G1 arrest.

1. Introduction

Cushing's disease is the most common cause of endogenous Cushing's syndrome, resulting from hypersecretion of the adrenocorticotrophic hormone (ACTH), by pituitary corticotrophic adenomas, leading to hypersecretion of cortisol resulting in a significant morbidity and mortality (Bertagna, Guignat et al. 2009; Justin Seltzer, Charles E. Ashton et al. 2015). There is a high recurrence rate even in patients with multiple treatment strategies (Lambert, Goldberg et al. 2013). Despite the different available drugs there are still difficulties in achieving an effective control of the disease in patients with Cushing's disease.

Cell cycle progression is controlled by cyclin-dependent kinases (CDKs), and CDK inhibitors (CDKIs). P27 is a member of inhibitors of CDKs, which regulates cell cycle progression from G1 into S phase by inhibiting the formation of cyclin E/CDK2 complexes for entry into S phase(Quereda and Malumbres 2009; Marinoni and Pellegata 2010). Reduced expression of p27Kip1 it has been reported in human cancers, including pituitary adenomas(Martins, Camargo et al. 2016) and p27 knockout mice develop ACTH-secreting pituitary adenomas (PAs)(Fero, Rivkin et al.).

The activation of serine/threonine protein kinase Akt depends on the conversion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate into phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate by activated PI3K. Then, Akt is activated by phosphorylation on two regulatory residues, Thr-308 and Ser 473(Fujita, Sato et al. 2002; Musat, Korbonits et al. 2005). Akt transcriptionally regulates p27Kip1 expression by phosphorylating and inhibiting Forkhead transcription factors. Therefore, Akt directly phosphorylated p27Kip1 in vivo and *in vitro*(Fujita, Sato et al. 2002). This pathway has been shown to be active in many types of human cancer(Bartholomeusz and Gonzalez-Angulo 2012), including pituitary adenomas and has been implicated in the regulation of P27

expression (Musat, Korbonits et al. 2005). Therefore, inhibition of PI3K pathway in cancer represents a promising therapeutic approach and is the focus of significant efforts in clinical research and development of new agents. (Wen, Lee et al. 2012).

NVPBKM120 (Buparlisib) is an oral pan-class I PI3K inhibitor, which has a potent selective inhibitor capability against the p110 $\alpha/\beta/\delta/\gamma$ catalytic subunit isoforms. BKM120 is currently being clinically evaluated for the treatment of different adult cancers including advanced solid tumors, breast cancer, meduloblastoma, colon cancer, colorectal cancer (Bendell, Rodon et al. 2012; Geuna, Milani et al. 2015; Solberg, Waaler et al. 2017; Yang, Li et al. 2017; Zhao, Hall et al. 2017). The effects of the treatment with PI3K inhibitors were evaluated in rat pituitary somatolactotroph tumors and in primary cell cultures of human pituitary lactotroph tumors with promising results (Chanal, Chevallier et al. 2016).

The present study was performed to elucidate whether BKM120 can influence the PI3K/AKT signaling pathway with aim of investigate the potential use of PI3K inhibitors as a novel drug treatment in corticotroph pituitary adenomas.

2. Materials and methods

2.1. Materials

BKM120 was kindly provided by Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland). Compound was dissolved in DMSO (0.5%).

2.2. Cell culture

AtT-20/D16v-F2 mouse pituitary corticotroph tumor cells were obtained from American Tissue Type Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). They were cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal

bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin, at 37° C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air.

2.3. Cell proliferation assay

Viable cells were measured using a Cell Titer 96 Aqueous One Solution (Promega, Madison, WI, USA) in 96-well plates in triplicate. Cells were plated at 2×10^4 cells/well. After incubation for 48h, cells were treated with increasing concentrations (0.05-1.0 μ M) of BKM120 medium. DMSO in DMEM was used as vehicle control. After incubation with drug for 24-96 hrs, equal volume of 20 μ L of 5mg/mL MTT solution was added to each well. Plates were incubated an additional 2h to allow luminescent signal stabilization. The absorbance was measured at 490nm with a BioTek plate reader and Gen5 software (Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, VT). Five independent experiments were carried out in triplicate for each time point.

2.4. RNA extraction and qPCR

Cells were plated at 10^4 cells/well in triplicate. After incubation for 48h, the cells were incubated with DMSO in medium (control) or medium containing concentrations (0.25 – 0.5 μ M) of BKM120 for 48h. At the end of each experiment, total RNA from AtT-20/D16v-F2 cells was isolated using an TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA concentrations were quantified by spectrometry (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). RNA integrity was checked according to the 28S/18S ratio, with an acceptable range of 1.6 to 2.0. mRNA was reverse transcribed from 100 ng of total RNA using enzyme *MultiScribe[™]* e kit *High Capacity[™]* cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

according to the manufacturer's instructions. Five independent experiments were carried out in triplicate for each time point.

2.5. Real-time RT-PCR

Quantitative Real-Time PCR (qPCR) was performed using cDNA (diluted 1:5) as template and TaqMan® Gene Expression assays (Applied Biosystems, Foster City, CA.): *Cdkn1b* (Mm00438168_m1), *Ccne1* (Mm00432367_m1), *Rb1* (Mm00485586_m1), *Ccnd1* (Mm00432359_m1), *Cdk4* (Mm00726334_s1), *Cdk2* (Mm00443947_m1), *Myc* (Mm00487804_m1). Relative expression values were determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using *Actb* (ID: 4352933E) and *Gapdh* (ID: 4352932E) as endogenous controls. Result was expressed as the threshold cycle (Ct). The relative quantification of the target transcripts was determined by the comparative Ct method ($\Delta\Delta C_t$) according to the manufacturer's protocol. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to analyze the relative changes in gene expression (Livak and Schmittgen 2001).

2.6. ACTH assay

Cells were plated at 100.000 cells/well in triplicate. After incubation for 48h, cells were treated with concentrations of 0.25 and 0.5 μ M of BKM120. DMSO in DMEM was used as vehicle control. After incubation with drug for 2-24 hrs, the medium was then aspirated and the ACTH levels in the supernatants were measured using an ACTH chemiluminescent immunometric assay Siemens IMMULITE 2000XPi. Five independent experiments were carried out in triplicate for each time point. All samples from each experiment were determined in the same assay. The intraassay coefficients of variation (CV) were 1.42% at 25.8pg/ml and 3.96% at x 394.0 pg/ml. The interassay CV were 4.46% at 27.5 pg/ml and 2.51% at 430.0 pg/ml.

2.7. Western Blot

AtT-20/D16v-F2 cells (1×10^6 cells per well) were seeded in 6-well plates and treated as indicated. Cells were lysed with 125 μ L of CellLytic M (Sigma-Aldrich) and 1.25 μ L of Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich). Protein concentration was measured by NanoDrop 2000/2000c (Fisher Scientific, Wilmington, Delaware USA). Equal amounts (40 μ g) of protein were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, blocked in TBST-T containing 5% skim milk and probed with CDKN1B(dilution:1:1000; #SAB4300420; Sigma-Aldrich), anti-p70 S6 Kinase(dilution: 1:1000; #9202S; Cell Signaling), anti-p85 S6 Kinase(dilution: 1:1000; #9202S; Cell Signaling), anti-phospho AKT(S437)(dilution: 1:1000; #9271S; Cell Signaling), anti-AKT(pan)(11E7)(dilution: 1:1000; #4585S; Cell Signaling). Anti- β -Actina(13E5) (dilution: 1:1000; #4970S; Cell Signaling) was used as endogenous/loading control. Complexes were visualized with Goat anti-rabbit IgG-HRP (dilution: 1:3000; #Sc-2004; Santa Cruz Biotechnology) secondary antibodies and developed by enhanced chemiluminescence (ImageQuant Las400; GE Healthcare). Acquired bands were analyzed using the ImageJ(Schneider, Rasband et al. 2012).

2.8 Cell cycle analysis

AtT-20/D16v-F2 cells (1×10^4 per well) were seeded in 24-well plates and treated with 0,25-0,5 μ M of BKM120) or vehicle for 48 hours. The cells were trypsinized, collected by centrifugation, and fixed in ice-cold ethanol overnight at -20°C. The cells were then stained with a solution containing 5 μ g/mL propidium iodide and 50 μ g/mL ribonuclease A (RNase). The cell's DNA content was measured using flow cytometry on a Guava Personal Cell Analysis system (Guava Technologies, Hayward, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. The percentages of cells in the G 0 /G 1, S, or G 2 /M phases were collected and

processed using the Guava CytoSoft 4.2.1 version software. Five independent experiments were carried out in triplicate for each time point.

2.9 Annexin V Apoptosis Assay

Apoptosis induction in control (DMSO-treated) or inhibitor-treated cells was assayed by the detection of membrane externalization of phosphatidylserine with Annexin V-FITC conjugate using an Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit according to the manufacturer's protocol (Sigma Aldrich). In brief, 1×10^6 cells were and treated with 0.5 μ M of BKM120 for 48 hours. Then, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in binding buffer at a concentration of 1×10^6 cells/ml. Annexin V-FITC 5 μ g/mL and 10 μ g/mL propidium iodide were added and cells were incubated for 10 minutes in a dark environment. Results were analyzed with the BD CellQuest Pro software considering 10,000 events.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad, San Diego, CA). ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test was used to determine differences before and after treatment with all BKM120 concentrations in cell proliferation assay. Cell cycle analysis data was analyzed by two-way ANOVA followed by Sidak. Two-way ANOVA test was used to analysis of apoptosis. For analysis of hormone secretion and gene expression was used Kruskal-Wallis followed by Dunn. The level of significance was set at $p \leq 0.05$ in all analyses.

3. Results

3.1. Effects of BKM120 on cell proliferation and cell death

The viability of AtT-20/D16v-F2 cells exposed to NVP-BKM120 was determined by the MTT assay at various time points. As show in Fig. 1, the number

of living cells, proportional to the rate of MTT cleavage reaction, decreased (ANOVA; $P < 0.0001$), with significant effects observed from 0.25 to 1 μM . To investigate whether BKM120 reduces cell viability by inducing apoptosis, flow cytometry analysis was performed. The results showed that treatment with 0.25 and 0.5 μM BKM120 for 48 not induced apoptosis (Fig.2).

Fig.1 Effects of BKM120 on cell proliferation in AtT-20/D16v-F2 cells. Control cells were treated with DMSO in DMEM. The cells were treated in triplicate, with the average at least three independent experiments. Statistical analysis was performed

using one-way ANOVA, followed by a Dunnett * $P < 0.05$ (compared with control). The cells seeded into 96-well plates at a density of 2×10^4 cells/well in 200 μ L of culture medium for 24 to 96h. The cells were incubated vehicle control (Control) or increasing concentrations (0.05-1.0 μ M) of BKM120.

Fig.2 Effects of BKM120 on analysis of apoptosis cell cycle profiles in AtT-20/D16v-F2 cells. Control cells were treated with DMSO in DMEM. The cells were treated in triplicate, with the average at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA. * $P < 0.05$ (compared with control). The cells were incubated for 48 h with 0.25 or 0.5 μ M of BKM120 or vehicle (Control). Apoptosis induction was assayed by the detection of membrane externalization of phosphatidylserine with Annexin V-FITC conjugate using an Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit according to the manufacturer's protocol (Sigma Aldrich). Data acquired on BD CellQuest Prosoftware.

3.2. Effects of BKM120 on ACTH

A time course study showed that 0.25 μ M e 0.5 μ M BKM120 significantly decreased ACTH levels within 6h and 24 h of the addition of BKM120 (ANOVA; $p=0.0002$ and $p=0.0018$ respective, Fig. 3).

Fig.3 Effects of BKM120 on ACTH levels in AtT-20/D16v-F2 cells. Control cells were treated with DMSO in DMEM. The cells were treated in triplicate, with the average at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis followed by Dunn * $P < 0.05$ (compared with control). The cells were incubated for 2, 6 and 24h with 0.25 or 0.5 μ M of BKM120 or vehicle (Control). ACTH levels in the supernatants were measured using an ACTH chemiluminescent immunometric assay Siemens IMMULITE 2000XPi.

3.3. Effects of BKM120 on gene and protein expression

AtT-20/D16v-F2 cells were incubated with BKM120 to determine its effects on changes in *Cdkn1b* mRNA levels. A time course study showed that 0.25 μ M BKM120 significantly increased *Cdkn1b* mRNA levels (ANOVA; $p=0.009$. Fig. 4).

Fig.4 Effects of BKM120 on *Cdkn1b* levels in AtT-20/D16v-F2 cells. Control cells were treated with DMSO in DMEM. The cells were treated in triplicate, with the average at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis followed by Dunn * $P < 0.05$ (compared with control). The cells were incubated for 24h and 48h with 0.25 or 0.5 μ M of BKM120 or vehicle (Control).

The regulation of protein levels by BKM120 were detected using Western bolt analysis. To detect the effect of BKM120 induced phosphorylation of AKT, cells were treated with BKM120 at different concentrations (0.25 and 0.5 μ M). This effect showed that BKM120 decreased the phosphorylation of AKT in AtT-20/D16v-F2 cells in a dose-dependent and time-dependent manner. Treatment with BKM120 resulted in strongly increased expression of CDKN1B. (Figure 5). In addition, the expression

of p70 S6 kinase was increased in the presence of BKM120. In contrast, expression of the p85 S6 kinase, was not changed in the presence of PI3K inhibitor. (Figure 6).

Fig.5 Western blot shows levels of phospho-Akt and CDKN1B in AtT-20/D16v-F2 cells treated with BKM120 (0.25 and 0.5 μ M) for 24 and 48h.

Fig.6 Western blot shows levels of p70 S6 kinase and p85 S6 kinase in AtT-20/D16v-F2 cells treated with BKM120 (0.25 and 0.5 μ M) for 24 and 48h.

3.4. Effects of BKM120 on cell cycle profiles

Considering the observed antiproliferative effect of BKM120 on mouse pituitary corticotroph tumor cells, we sought to determine whether BKM120 treatment influences cell cycle profile. Cell cycle distribution was assessed using flow cytometry. FACS analyses revealed that after a 48h exposure to 0.25 and 0.5 μ M BKM120 the total fraction of replicating and dividing cells in G0/G1 increased from 71.9% to 75.5% and 78.7% respectively. Consequently, the number of cells in S phase decreased on average by 12.4 and 10.0% respectively (Figure 7). There was no significant difference in the G2 / M phase.

Fig.7 4 Effects of BKM120 on on cell cycle profiles AtT-20/D16v-F2 cells. Control cells were treated with DMSO in DMEM. The cells were treated in triplicate, with the average at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using two-way followed by Sidak *P < 0.05 (compared with control). The cells were incubated for 48h with 0.25 or 0.5 μ M of BKM120 or vehicle (Control). The cell's DNA content was measured using flow cytometry on a Guava Personal Cell Analysis

system (Guava Technologies, Hayward, CA, USA), according to the manufacturer's protocol and the cell cycle profiles were determined with Guava CytoSoft 4.2.1 version software.

4. Discussion

We demonstrate that treatment with BKM120, suppresses ACTH-secretion, cell viability by induces of cycle arrest in the G0 / G1 phase in AtT-20/D16v-F2 suggesting that pan-class I PI3K inhibitor could be a new therapeutic candidate for DC.

In order to study the effect of BKM120 in pituitary corticotrophic adenomas we used AtT-20/D16v-F2 cells, that are corticotrophic cells from mouse anterior pituitary adenoma and they secrete high levels of ACTH. Our data demonstrate that, BKM120 potently decreased the ACTH concentration in the supernatant of AtT-20 / D16v-F2 cells after 6h and 24h of treatment. We also observed an inhibitory effect on the cell viability. As far as we know, no previous research has investigated the effect of BKM120 on corticotroph cells. A recent study by Chanal *et al* compared the effects of the treatment with PI3K inhibitors with those of the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 in rat pituitary somatolactotroph tumors and in primary cell cultures of human pituitary lactotroph tumors (GH3). Both the NVP-BEZ235 and the BKM120 can limit pituitary tumor growth *in vitro* as well as *in vivo*. However, *in vitro* results did not reflect the *in vivo* situation, BKM120 inhibited tumor growth more effectively compared with NVP-BEZ23(Chanal, Chevallier et al. 2016).

Previous studies have shown that BKM120 was able to reduce cell viability after 72h of treatment in glioma cell lines and human glioblastomas with different genotypic characteristics(Koul, Fu et al. 2012; Jane, Premkumar et al. 2014). Zhao *et*

al/ evaluating pre-clinical activity of BKM120 in twelve medulloblastoma cell lines demonstrated that all cells lines were sensitive to BKM120, with IC₅₀ values that ranged from 0.279 to 4.38 μ M (Zhao, Hall et al. 2017). In fact, several studies pre-clinical suggest that BKM120 has an antiproliferative and pro-apoptotic effect on a variety of tumor cell lines and xenografts models(Koul, Fu et al. 2012; Blanco, Herrero-Sánchez et al. 2015; Yang, Li et al. 2017; Zhao, Hall et al. 2017). Previous phase I dose-escalation studies of buparlisib in patients with advanced solid tumors have shown that the BKM120 has a manageable safety profile, has favorable pharmacokinetics, and has shown preliminary signs of antitumor activity. The buparlisib 100 mg/day was declared the recommended dose(Bendell, Rodon et al. 2012; Ando, Inada-Inoue et al. 2014). BKM120 is a drug with interesting pharmacological properties with antiproliferative and pro-apoptotic activity. Furthermore, recent research suggests that BKM-120 has potent anti-invasive effects in glioblastoma cell lines and patient-derived glioma cells(Speranza, Nowicki et al. 2016) and is also able of cross blood-brain barrier(Wen, Lee et al. 2012), making it an attractive option for the treatment of DC.

Buparlisibe treatment resulted in further inhibition of cell proliferation as indicated by induces of cycle arrest in the G₀ / G₁ phase, these data indicate that BKM120 can inhibit cell cycle progression prior to the entry into DNA replication phase, and thus prevent the cell proliferative activity. Our findings are in agreement with previous studies reporting that reduction of proliferation caused by BKM120 was related to T cell cycle arrest in G₁ phase human primary T cells(Blanco, Herrero-Sánchez et al. 2015). BKM120 decreased cell proliferation but FACS analyse revealed that BKM120 did not significantly increase DNA fragmentation in AtT-20/D16v-F2. The data suggest that BKM120 does not induce apoptosis.

The p27 protein encoding *CDKN1B* gene is a CDK inhibitor which prevents the formation of the Cyclin D / Cdk4, Cyclin E / Cdk2, Cyclin A / Cdk2 complex. It is recognized as a tumor suppressor for slowing or stopping cell cycle progression. Several studies have shown p27 hypoexpression in pituitary adenomas (Bamberger, Fehn et al. 1999; Martins, Camargo et al. 2016). Hence, studying the expression of *CDKN1B* from these cells will shed light on the importance of this gene on cell cycle progression. We found evidence that BKM120 treatment, increase *CDKN1B* gene and protein expression, suggesting a regulating of cell cycle progression in pituitary adenomas.

Previous studies on different tumor types have shown that BKM120 can inhibit cell proliferation and cell cycle progression and promote apoptosis through selective inhibition of the PI3K / AKT / mTORC pathway (Hennessy, Smith et al. 2005; Anderson, Park et al. 2015; Hu, Guo et al. 2015; Lu, Wang et al. 2017). AKT-mediated activation of mTOR stimulates cell proliferation. mTOR regulates translation in response to growth factors by phosphorylation of protein synthesis components including ribosomal protein S6 kinases (Hennessy, Smith et al. 2005). Since BKM120 is a PI3K pan inhibitor and in our study showed anti-tumor effects on AtT-20 / D16v-F2 cells, we evaluated whether this compound could effectively inhibit the PI3K / Akt / mTOR pathway. We examined the phosphorylation of several key proteins involved in this pathway, including AKT, p70 S6 kinase and p85 S6 kinase. Here, we observed that BKM120 at 0.25 and 0.5 μ M reduced AKT phosphorylation, and increased p70 S6 kinase protein expression. *Anderson et al.*, demonstrated that buparlisib reduces cellular proliferation and induces apoptosis in various sarcoma cell lines. However, while initial buparlisib treatment reduced the activity of Akt and signaling molecules downstream of mTORC1, time course experiments revealed Akt reactivation within

24 hours. Reactivation of Akt within 24 hours of buparlisib treatment suggests possible removal of negative feedback inhibition. Buparlisib demonstrated cytotoxicity as a single agent, but was found to be more effective when used in combination (Anderson, Park et al. 2015).

The use of BKM120 has been proposed as combination therapy with other drugs to overcome the effects of pathway activation. The combination of RAD001 (Everolimus or Afinitor) is an analogue of rapamycin with similar function to rapamycin as an allosteric inhibitor of mTOR and BKM120 exerted synergistic inhibitory effects on the growth of lung cancer cells both in culture and in mouse xenograft model (Ren, Chen et al. 2012). Furthermore, in 2012, Juvekar et al. demonstrated the synergism of the combination of BKM120 with PARP inhibitor olaparib in a preclinical study in murine mice (Juvekar, Burga et al. 2012). In addition, phase I study of the combined use of these two compounds demonstrated that BKM120 might improve outcomes over olaparib alone for breast cancer patients (Ando, Inada-Inoue et al. 2014). These observations do raise the possibility that the BKM120 in combination with other drugs might improve outcomes for CD patients.

In conclusion, the present study demonstrated that BKM120 could decrease the effects of PI3K / AKT pathway activation, since we have shown that BKM120 is effective in reducing ACTH secretion and cell viability in AtT-20 / D16v-F2 corticotrophic tumor cells. Moreover, it might induce arrest of cell cycle progression in G0 / G1 and increased expression of p27. From these effects observed by us in AtT-20 / D16v-F2 cells, further studies will be needed to define the role of BKM120 in the therapeutic approach for Cushing disease patients.

Acknowledgements

The authors thank Novartis Pharma AG for kindly providing the BKM120 compound. The authors thank Rogerio Lenotti Zuliani, Jose Roberto Silva and Maria Fernanda Orsolini Ticotoste for technical assistance.

5. REFERENCES

- Agarwal, R., M. Carey, et al. (2010). "PI3K pathway-directed therapeutic strategies in cancer." Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000) **11**(6): 615-628.
- Anderson, J. L., A. Park, et al. (2015). "Evaluation of In Vitro Activity of the Class I PI3K Inhibitor Buparlisib (BKM120) in Pediatric Bone and Soft Tissue Sarcomas." PLoS ONE **10**(9).
- Ando, Y., M. Inada-Inoue, et al. (2014). "Phase I dose-escalation study of buparlisib (BKM120), an oral pan-class I PI3K inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors." Cancer science **105**(3): 347-353.
- Antonini, S. R. R., A. C. Latronico, et al. (2002). "Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in ACTH-secreting pituitary tumours." Clinical Endocrinology **57**(5): 657-662.
- Bahn, R., J. Furth, et al. (1957). "Morphologic and Functional Changes Associated With Transplantable ACTH-Producing Pituitary Tumors of Mice." The American Journal of Pathology **33**(6): 1075-1097.
- Bamberger, C., M. Fehn, et al. (1999). "Reduced expression levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in human pituitary adenomas." European Journal of Endocrinology **140**(3): 250-255.
- Bamberger, C. M., M. Fehn, et al. (1999). "Reduced expression levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in human pituitary adenomas." Eur J Endocrinol **140**(3): 250-255.
- Bartholomeusz, C. and A. M. Gonzalez-Angulo (2012). "Targeting the PI3K signaling pathway in cancer therapy." Expert Opinion on Therapeutic Targets **16**(1): 121-130.
- Bashash, D., M. Delshad, et al. (2017). "Novel pan PI3K inhibitor-induced apoptosis in APL cells correlates with suppression of telomerase: An emerging mechanism of action of BKM120." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **91**: 1-8.
- Bendell, J. C., J. Rodon, et al. (2012). "Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors." J Clin Oncol **30**(3): 282-290.
- Bertagna, X., L. Guignat, et al. (2009). "Cushing's disease." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **23**(5): 607-623.
- Bilodeau, S., S. Vallette-Kasic, et al. (2006). "Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease." Genes & Development **20**(20): 2871-2886.
- Blanco, B., C. Herrero-Sánchez, et al. (2015). "Comparative effect of two pan-class I PI3K inhibitors used as anticancer drugs on human T cell function." International Immunopharmacology **28**(1): 675-685.
- Boscaro, M., L. Barzon, et al. (2000). "The diagnosis of cushing's syndrome: Atypical presentations and laboratory shortcomings." Archives of Internal Medicine **160**(20): 3045-3053.

- Boscaro, M., W. H. Ludlam, et al. (2009). "Treatment of Pituitary-Dependent Cushing's Disease with the Multireceptor Ligand Somatostatin Analog Pasireotide (SOM230): A Multicenter, Phase II Trial." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **94**(1): 115-122.
- BOSCARO, M., N. SONINO, et al. (1987). "RESPONSE OF PITUITARY-ADRENAL AXIS TO CORTICOTROPHIN RELEASING HORMONE IN PATIENTS WITH CUSHING'S DISEASE BEFORE AND AFTER KETOCONAZOLE TREATMENT." Clinical Endocrinology **27**(4): 461-467.
- Brachmann, S. M., J. Kleylein-Sohn, et al. (2012). "Characterization of the Mechanism of Action of the Pan Class I PI3K Inhibitor NVP-BKM120 across a Broad Range of Concentrations." Molecular Cancer Therapeutics **11**(8): 1747-1757.
- Buonassisi, V., G. Sato, et al. (1962). "HORMONE-PRODUCING CULTURES OF ADRENAL AND PITUITARY TUMOR ORIGIN." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **48**(7): 1184-1190.
- Cawley, N. X., Z. Li, et al. (2016). "60 YEARS OF POMC: Biosynthesis, trafficking, and secretion of pro-opiomelanocortin-derived peptides." Journal of molecular endocrinology **56**(4): T77-T97.
- Cawley, N. X., T. Rathod, et al. (2016). "Carboxypeptidase E and Secretogranin III Coordinately Facilitate Efficient Sorting of Proopiomelanocortin to the Regulated Secretory Pathway in AtT20 Cells." Molecular endocrinology (Baltimore, Md.) **30**(1): 37-47.
- Cervia, D., C. Nunn, et al. (2003). "Pharmacological characterisation of native somatostatin receptors in AtT-20 mouse tumour corticotrophs." British Journal of Pharmacology **139**(1): 109-121.
- Chanal, M., P. Chevallier, et al. (2016). "Differential Effects of PI3K and Dual PI3K/mTOR Inhibition in Rat Prolactin-Secreting Pituitary Tumors." Molecular Cancer Therapeutics **15**(6): 1261-1270.
- Chung, S., G. H. Son, et al. (2011). "Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1812**(5): 581-591.
- Colao, A., S. Petersenn, et al. (2012). "A 12-Month Phase 3 Study of Pasireotide in Cushing's Disease." New England Journal of Medicine **366**(10): 914-924.
- Coleman, J. and K. Miskimins (2009). Structure and activity of the internal ribosome entry site within the human p27Kip1 5'-untranslated region.
- Cuevas-Ramos, D., D. S. T. Lim, et al. (2016). "Update on medical treatment for Cushing's disease." Clinical Diabetes and Endocrinology **2**(1): 16.
- Dahia, P. L., R. C. Aguiar, et al. (1998). "Mutation and expression analysis of the p27/kip1 gene in corticotrophin-secreting tumours." Oncogene **16**(1): 69-76.
- Dahia, P. L., A. Ahmed-Shuaib, et al. (1996). "Vasopressin receptor expression and mutation analysis in corticotropin-secreting tumors." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **81**(5): 1768-1771.
- Dahia, P. L. M., J. r. Honegger, et al. (1997). "Expression of Glucocorticoid Receptor Gene Isoforms in Corticotropin-Secreting Tumors*." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **82**(4): 1088-1093.
- Dworakowska, D., E. Wlodek, et al. (2009). "Activation of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in pituitary adenomas and their effects on downstream effectors." Endocrine-Related Cancer **16**(4): 1329-1338.
- Endoh, T., N. Tsuji, et al. (2005). "Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1- and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription." Experimental Cell Research **305**(2): 300-311.

- Faragher, R. G. A. (2000). "Cell senescence and human aging: where's the link?" Biochemical Society Transactions **28**(2): 221-226.
- Feelders, R. A., L. J. Hofland, et al. (2010). "Medical Treatment of Cushing's Syndrome: Adrenal-Blocking Drugs and Ketaconazole." Neuroendocrinology **92**(suppl 1)(Suppl. 1): 111-115.
- Fero, M. L., M. Rivkin, et al. "A Syndrome of Multiorgan Hyperplasia with Features of Gigantism, Tumorigenesis, and Female Sterility in p27^{Kip1}-Deficient Mice." Cell **85**(5): 733-744.
- Fleseriu, M. (2014). "Recent advances in the medical treatment of Cushing's disease." F1000Prime Reports **6**: 18.
- Fleseriu, M. and S. Petersenn (2012). "Medical management of Cushing's disease: what is the future?" Pituitary **15**(3): 330-341.
- Fu, W., J. G. Begley, et al. (1999). "Anti-apoptotic Role of Telomerase in Pheochromocytoma Cells." Journal of Biological Chemistry **274**(11): 7264-7271.
- Fujita, N., S. Sato, et al. (2002). "Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization." J Biol Chem **277**(32): 28706-28713.
- Geuna, E., A. Milani, et al. (2015). "Buparlisib, an oral pan-PI3K inhibitor for the treatment of breast cancer." Expert Opinion on Investigational Drugs **24**(3): 421-431.
- Grossman, A. B. (2017). "The Molecular Pathology of Cushing Disease: Are We Nearly There?" Journal of the Endocrine Society **1**(2): 144-148.
- He, W., X. Wang, et al. (2012). A Crosstalk Imbalance Between p27(Kip1) and Its Interacting Molecules Enhances Breast Carcinogenesis, Cancer Biother Radiopharm. 2012 Sep;27(7):399-402. doi:10.1089/cbr.2010.0802.
- Hennessy, B. T., D. L. Smith, et al. (2005). "Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery." Nature Reviews Drug Discovery **4**(12): 988-1004.
- Hernández-Ramírez, L. C., R. Gam, et al. (2017). "Loss-of-function mutations in the CABLES1 gene are a novel cause of Cushing's disease." **24**(8): 379.
- Hewedi, I., W. Osman, et al. (2011). Differential expression of cyclin D1 in human pituitary tumors: Relation to MIB-1 and p27/Kip1 labeling indices.
- Hoek, J. v. d., M. Waaijers, et al. (2005). "Distinct functional properties of native somatostatin receptor subtype 5 compared with subtype 2 in the regulation of ACTH release by corticotroph tumor cells." American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism **289**(2): E278-E287.
- Hofland, L., J. van der Hoek, et al. (2005). The multi-ligand somatostatin analogue SOM230 inhibits ACTH secretion by cultured human corticotroph adenomas via somatostatin receptor type 5.
- Hu, Y., R. Guo, et al. (2015). "Effects of PI3K inhibitor NVP-BKM120 on overcoming drug resistance and eliminating cancer stem cells in human breast cancer cells." Cell Death & Disease **6**(12): e2020-e2020.
- Ibáñez-Costa, A., E. Rivero-Cortés, et al. (2016). "Octreotide and pasireotide (dis)similarly inhibit pituitary tumor cells in vitro." Journal of Endocrinology **231**(2): 135-145.
- Ikeda, H., T. Yoshimoto, et al. (1997). "Molecular analysis of p21 and p27 genes in human pituitary adenomas." Br J Cancer **76**(9): 1119-1123.
- Jane, E. P., D. R. Premkumar, et al. (2014). "Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signaling by NVP-BKM120 Promotes ABT-737-Induced Toxicity in a Caspase-Dependent Manner through Mitochondrial Dysfunction and DNA Damage Response in Established and Primary Cultured Glioblastoma Cells." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **350**(1): 22-35.

- Jian, F. F., Y. F. Li, et al. (2016). "Inhibition of Ubiquitin-specific Peptidase 8 Suppresses Adrenocorticotrophic Hormone Production and Tumorous Corticotroph Cell Growth in AtT20 Cells." Chin Med J **129**(17): 2102-2108.
- Jiang, Z., J. Huang, et al. (2016). Combined use of PI3K and MEK inhibitors synergistically inhibits lung cancer with EGFR and KRAS mutations.
- Jimenez Reina, L., A. Leal Cerro, et al. (1989). In vitro effects of ketoconazole on corticotrope cell morphology and ACTH secretion of two pituitary adnomas removed from patients with Nelson's syndrome.
- Jin, L., X. Qian, et al. (1997). "Transforming growth factor-beta, transforming growth factor-beta receptor II, and p27Kip1 expression in nontumorous and neoplastic human pituitaries." Am J Pathol **151**(2): 509-519.
- Jolley, C. C., M. Ukai-Tadenuma, et al. (2014). "A mammalian circadian clock model incorporating daytime expression elements." Biophysical journal **107**(6): 1462-1473.
- Justin Seltzer, Charles E. Ashton, et al. (2015). "Gene and protein expression in pituitary corticotroph adenomas: a systematic review of the literature." Neurosurgical Focus **38**(2): E17.
- Juvekar, A., L. N. Burga, et al. (2012). "Combining a PI3K inhibitor with a PARP inhibitor provides an effective therapy for BRCA1-related breast cancer." Cancer Discov **2**(11): 1048-1063.
- Kemppainen, R. J. and E. N. Behrend (2010). "Acute inhibition of carboxypeptidase E expression in AtT-20 cells does not affect regulated secretion of ACTH." Regulatory Peptides **165**(2): 174-179.
- Korbonits, M. r., I. Bujalska, et al. (2001). "Expression of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Isoenzymes in the Human Pituitary: Induction of the Type 2 Enzyme in Corticotropinomas and Other Pituitary Tumors." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **86**(6): 2728-2733.
- Korbonits, M. r., H. S. Chahal, et al. (2002). "Expression of Phosphorylated p27Kip1 Protein and Jun Activation Domain-Binding Protein 1 in Human Pituitary Tumors." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **87**(6): 2635-2643.
- Koul, D., J. Fu, et al. (2012). "Antitumor Activity of NVP-BKM120—A Selective Pan Class I PI3 Kinase Inhibitor Showed Differential Forms of Cell Death Based on p53 Status of Glioma Cells." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **18**(1): 184-195.
- Kumar, U., S. I. Grigorakis, et al. (2005). "Somatostatin receptors in primary human breast cancer: quantitative analysis of mRNA for subtypes 1–5 and correlation with receptor protein expression and tumor pathology." Breast Cancer Research and Treatment **92**(2): 175-186.
- Lambert, J. K., L. Goldberg, et al. (2013). "Predictors of Mortality and Long-term Outcomes in Treated Cushing's Disease: A Study of 346 Patients." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **98**(3): 1022-1030.
- le Sage, C., R. Nagel, et al. (2007). "Diverse ways to control p27Kip1 function: miRNAs come into play." Cell Cycle **6**(22): 2742-2749.
- Lidhar, K., M. Korbonits, et al. (1999). "Low expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors." J Clin Endocrinol Metab **84**(10): 3823-3830.
- Liu, N.-A., H. Jiang, et al. (2011). "Targeting zebrafish and murine pituitary corticotroph tumors with a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(20): 8414-8419.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method." Methods **25**(4): 402-408.

- Lloyd, R. V., L. Jin, et al. (1997). "Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors." Am J Pathol **150**(2): 401-407.
- Lu, Y., Q. Wang, et al. (2017). "Effective use of PI3K inhibitor BKM120 to treat human osteosarcoma." International Journal of Clinical and Experimental Medicine **10**: 6378-6386.
- Luo, J.-L., H. Kamata, et al. (2005). "IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy." The Journal of Clinical Investigation **115**(10): 2625-2632.
- Ma, Z. Y., Z. J. Song, et al. (2015). "Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease." Cell Res **25**(3): 306-317.
- Marinoni, I. and N. S. Pellegata (2010). "p27kip1: a new multiple endocrine neoplasia gene?" Neuroendocrinology **93**(1): 19-28.
- Martins, C., R. Camargo, et al. (2016). P27/CDKN1B Translational Regulators in Pituitary Tumorigenesis.
- Min Soo Kim, Kyu Hong Kim, et al. (2014). "Results of immunohistochemical staining for cell cycle regulators predict the recurrence of atypical meningiomas." Journal of Neurosurgery **121**(5): 1189-1200.
- Mönig, H., I. U. Ali, et al. (1993). "Structure of the POMC Promoter Region in Pituitary and Extrapituitary ACTH Producing Tumors." Exp Clin Endocrinol Diabetes **101**(01): 36-38.
- Moreira, A. C., S. R. Antonini, et al. (2018). "MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: A sense of time of the glucocorticoid circadian clock: from the ontogeny to the diagnosis of Cushing's syndrome." **179**(1): R1.
- Morris, D. G., B. Kola, et al. (2003). "Identification of Adrenocorticotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acid in the Human Pituitary and Its Loss of Expression in Pituitary Adenomas." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **88**(12): 6080-6087.
- Murasawa, S., K. Kageyama, et al. (2014). "Inhibitory effects of SOM230 on adrenocorticotrophic hormone production and corticotroph tumor cell proliferation in vitro and in vivo." Molecular and Cellular Endocrinology **394**(1): 37-46.
- Musat, M., M. Korbonits, et al. (2005). "Enhanced protein kinase B/Akt signalling in pituitary tumours." Endocr Relat Cancer **12**(2): 423-433.
- Musat, M., M. Korbonits, et al. (2002). "The Expression of the F-Box Protein Skp2 is Negatively Associated with p27 Expression in Human Pituitary Tumors." Pituitary **5**(4): 235-242.
- Nakayama, K., N. Ishida, et al. "Mice Lacking p27^{Kip1} Display Increased Body Size, Multiple Organ Hyperplasia, Retinal Dysplasia, and Pituitary Tumors." Cell **85**(5): 707-720.
- Oyama, K., N. Sanno, et al. (2001). "Expression of neuro D1 in human normal pituitaries and pituitary adenomas." Mod Pathol **14**(9): 892-899.
- Pei, L., S. Melmed, et al. (1995). "Frequent Loss of Heterozygosity at the Retinoblastoma Susceptibility Gene (RB) Locus in Aggressive Pituitary Tumors: Evidence for a Chromosome 13 Tumor Suppressor Gene Other Than RB." Cancer Research **55**(8): 1613-1616.
- Perez-Rivas, L. G., M. Theodoropoulou, et al. (2015). "The Gene of the Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease." The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **100**(7): E997-E1004.
- Pivonello, R., M. De Leo, et al. (2015). "The Treatment of Cushing's Disease." Endocrine Reviews **36**(4): 385-486.

- Quereda, V. and M. Malumbres (2009). "Cell cycle control of pituitary development and disease." J Mol Endocrinol **42**(2): 75-86.
- Reincke, M., S. Sbiera, et al. (2014). "Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease." Nat Genet.
- Ren, H., M. Chen, et al. (2012). "The combination of RAD001 and NVP-BKM120 synergistically inhibits the growth of lung cancer in vitro and in vivo." Cancer letters **325**(2): 139-146.
- Roussel-Gervais, A., C. Couture, et al. (2016). "The Cables1 Gene in Glucocorticoid Regulation of Pituitary Corticotrope Growth and Cushing Disease." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **101**(2): 513-522.
- Sai, J., P. Owens, et al. (2017). "PI3K Inhibition Reduces Mammary Tumor Growth and Facilitates Antitumor Immunity and Anti-PD1 Responses." Clinical Cancer Research **23**(13): 3371-3384.
- Sajjad, E. A., G. Zieliński, et al. (2013). "mTOR is Frequently Active in GH-Secreting Pituitary Adenomas without Influencing their Morphopathological Features." Endocrine Pathology **24**(1): 11-19.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband, et al. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nat Methods **9**(7): 671-675.
- Solberg, N. T., J. Waaler, et al. (2017). "TANKYRASE Inhibition Enhances the Antiproliferative Effect of PI3K and EGFR Inhibition, Mutually Affecting β -CATENIN and AKT Signaling in Colorectal Cancer." Molecular Cancer Research.
- Speranza, M.-C., M. O. Nowicki, et al. (2016). "BKM-120 (Buparlisib): A Phosphatidylinositol-3 Kinase Inhibitor with Anti-Invasive Properties in Glioblastoma." Scientific Reports **6**: 20189.
- Speranza, M. C., M. O. Nowicki, et al. (2016). "BKM-120 (Buparlisib): A Phosphatidylinositol-3 Kinase Inhibitor with Anti-Invasive Properties in Glioblastoma." Sci Rep **6**(20189).
- Stratakis, C. A. (2012). "Cushing Syndrome in Pediatrics." Endocrinology and metabolism clinics of North America **41**(4): 793-803.
- Takeuchi, S., H. P. Koefler, et al. (1998). "Mutation and expression analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in pituitary tumors." J Endocrinol **157**(2): 337-341.
- Tanaka, C., K. Yoshimoto, et al. (1997). "Infrequent mutations of p27Kip1 gene and trisomy 12 in a subset of human pituitary adenomas." J Clin Endocrinol Metab **82**(9): 3141-3147.
- Tavares, M. R., I. C. B. Pavan, et al. (2015). "The S6K protein family in health and disease." Life Sciences **131**: 1-10.
- Theodoropoulou, M., M. Reincke, et al. (2015). "Decoding the genetic basis of Cushing's disease: USP8 in the spotlight." European Journal of Endocrinology **173**(4): M73-M83.
- Trovato, M., M. L. Torre, et al. (2013). "HGF/c-met system targeting PI3K/AKT and STAT3/phosphorylated-STAT3 pathways in pituitary adenomas: an immunohistochemical characterization in view of targeted therapies." Endocrine **44**(3): 735-743.
- Wang, D. G., C. F. Johnston, et al. (1996). "Expression of bcl-2 oncoprotein in pituitary tumours: comparison with c-myc." Journal of Clinical Pathology **49**(10): 795-797.
- Wanichi, I., B. Mariani, et al. (2019). "Cushing's disease due to somatic USP8 mutations: a systematic review and meta-analysis." Pituitary **22**.
- Wen, P. Y., E. Q. Lee, et al. (2012). "Current clinical development of PI3K pathway inhibitors in glioblastoma." Neuro-Oncology **14**(7): 819-829.

- Yamamoto, M., A. Ben-Shlomo, et al. (2018). "Somatostatin receptor subtype 5 modifies hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress function." JCI Insight **3**(19): 122932.
- Yang, S., X. Li, et al. (2017). "NVP-BKM120 inhibits colon cancer growth via FoxO3a-dependent PUMA induction." Oncotarget **8**(47): 83052-83062.
- Yoshino, A., Y. Katayama, et al. (2007). "Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas." J Neurooncol **83**(2): 153-162.
- Zerdes, I., A. Matikas, et al. (2018). "Genetic, transcriptional and post-translational regulation of the programmed death protein ligand 1 in cancer: biology and clinical correlations." Oncogene.
- Zhang, C., C. Kang, et al. (2009). "Co-suppression of miR-221/222 cluster suppresses human glioma cell growth by targeting p27kip1 in vitro and in vivo." Int J Oncol **34**(6): 1653-1660.
- Zhao, P., J. Hall, et al. (2017). "BKM120 induces apoptosis and inhibits tumor growth in medulloblastoma." PLoS ONE **12**(6): e0179948.
- Zheng, Y. and W. K. Miskimins (2011). "Far upstream element binding protein 1 activates translation of p27Kip1 mRNA through its internal ribosomal entry site." Int J Biochem Cell Biol **43**(11): 1641-1648.