MARIANA FURIERI GUZZO

**Efeitos do cetoconazol e seus mecanismos de ação *in vitro*
sobre linhagens hipofisárias tumorais imortalizadas**

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

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Marcello Delano Bronstein

Coorientadora: Dra. Luciani Renata Silveira de
Carvalho

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Guzzo, Mariana Furieri

Efeitos do cetoconazol e seus mecanismos de ação *in vitro* sobre linhagens
hipofisárias tumorais imortalizadas / Mariana Furieri Guzzo. -- São Paulo, 2014.

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

Orientador: Marcello Delano Bronstein.

Coorientadora: Luciani Renata Silveira de Carvalho

Descritores: 1.Doenças da hipófise 2.Neoplasias hipofisárias
3.Hipersecreção hipofisária de ACTH 4.Apoptose 5.Ciclo celular 6.Cetoconazol
7.Expressão gênica 8.Proliferação de células

USP/FM/DBD-306/14

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Bolsa Institucional (161031/2011-0) e Projeto Regular da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp (nº 2011/10582-1)

*Dedico esta tese a você, Juliano,
companheiro no amor, na vida e nos
sonhos, que sempre me apoiou nas horas
difíceis e compartilhou
comigo as alegrias...*

AGRADECIMENTOS

Registro meus agradecimentos a todos os que compartilharam o trilhar de mais esse caminho percorrido, contribuindo para que eu realizasse esta tese.

Minha gratidão, em primeiro lugar, a Deus, por estar comigo em todas as ocasiões.

À minha família, pelo eterno apoio em todos os momentos da minha vida: minha mãe Mirtes e meu pai Heliomar, pelo permanente incentivo aos estudos, pelos bons exemplos, seja profissional seja pessoal, e pelo amor incondicional. Às minhas irmãs Daniela e Paula, pelo convívio constante e amizade; e, ao presente que Deus me deu, meu marido Juliano, que sempre está ao meu lado, pela paciência nos momentos de ausência e de renúncia da nossa vida pessoal, e pelo constante apoio, amor e carinho. O orgulho de todos vocês me impulsiona!

Aos meus parentes, minha avó Azilmar, tia Jane, tio Zé, Anninha e Diogo, e aos meus sogros, Valdério e Fátima, e cunhados, João Pedro e Luisa, pelas palavras de incentivo e carinho.

Ao Prof. Dr. Marcello D. Bronstein e à Dra. Luciani Renata S. Carvalho, meus orientadores, pelo profissionalismo e envolvimento. Muito obrigada pela amizade duradoura, pelo aprendizado e pelas oportunidades criadas ao longo de todos esses anos.

Às professoras da disciplina de Endocrinologia da FMUSP, Dra. Berenice B. Mendonça e Dra. Ana Cláudia Latrônico, pelo exemplo de competência e dedicação.

À equipe da Neuroendocrinologia do HCFMUSP: Dra. Andrea Glezer, exemplo de profissional; Dra. Raquel Jallad, dedicação aos pacientes; Dra. Maria Candida Fragoso, pela excelência e dedicação; Dr. Márcio Machado e Dr. Felipe Gaia, pelas dicas e pelos bons exemplos; e a Ericka Trarbach,

pelo incentivo e pela amizade. A todos vocês, obrigada pelo aprendizado e pelo bom convívio nestes anos!

Aos professores da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, responsáveis pela minha formação em Medicina, em especial, ao Dr. Perseu S. de Carvalho e Dr. Gustavo Peixoto com quem pude dar os primeiros passos na pesquisa médica.

Aos amigos que a UFES me presenteou: Karla, Isa e Rê; da Santa Casa de SP: Joyce; do HCFMUSP: Cris, Lud e Carol; e do CASE: Dra Helena, Wagner e Newton. Vocês foram indispensáveis para nos meus momentos de angústia. Ter a amizade de vocês é uma dádiva de Deus.

A todos os assistentes e funcionários do LIM-42, em especial, ao Ricardo, Cidinha, Míriam, Rosana, Cris, Nilda e Rosângela pela ajuda na bancada e por todo auxílio técnico.

Aos nossos colaboradores nacionais e internacionais, em especial, para a Agata, pela amizade e pelas aulas de inglês.

Aos funcionários da Endocrinologia da FMUSP, destacando a Senária, Cida, Rosana, Rosely, Rubens e Claudinha, pela dedicação e pelo apoio diante das questões burocráticas envolvidas na pós-graduação.

Ao CNPQ e à FAPESP, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste projeto.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Admite-se geralmente que toda arte e toda investigação, assim como toda ação e toda escolha, têm em mira um bem qualquer; e por isso foi dito, com muito acerto, que o bem é aquilo a que todas as coisas tendem.”

Aristóteles

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

A ortografia da Língua Portuguesa adotada está conforme o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, assinado em Lisboa, em 16 de dezembro de 1990, por Portugal, Brasil, Angola, São Tomé e Príncipe, Cabo Verde, Guiné-Bissau, Moçambique e, posteriormente, por Timor Leste. Decreto Legislativo Brasileiro nº 54, aprovado em 18 de abril de 1995 e em vigor desde 1º de janeiro de 2009.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Classificação dos tumores hipofisários e manejo clínico dos corticotropinomas	2
1.1.1 Uso do cetoconazol na prática clínica das doenças hipofisárias	5
1.1.2 Efeito do cetoconazol <i>in vitro</i> na secreção hormonal em células hipofisárias.....	6
1.1.3 Efeito antiproliferativo do cetoconazol <i>in vitro</i> em células não hipofisárias.....	7
1.2 Apoptose celular	8
1.2.1 Mecanismos moleculares da apoptose	9
1.3 Ciclo celular.....	11
1.4 Resumo da introdução	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral.....	15
2.2 Específico	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Cultura de células AtT-20, GH3, α T3.1 e MMQ.....	17
3.2 Ensaio de dosagem hormonal	18
3.3 Kit de viabilidade celular	19
3.4 RT-qPCR Array	21
3.4.1 Extração do RNA	21
3.4.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)	22
3.4.3 PCR em tempo real	22
3.4.4 Estatística	24

4 RESULTADOS	27
4.1 Cetoconazol reduziu os níveis de ACTH no meio de cultura na linhagem hipofisária tumoral corticotrófica AtT-20	27
4.2 Avaliação da viabilidade celular nas linhagens hipofisárias	28
4.2.1 Titulação da densidade celular	28
4.2.2 Cetoconazol reduziu a viabilidade celular nas linhagens AtT-20, GH3, α T3.1 e MMQ.....	29
4.2.3 Recuperação parcial da viabilidade celular após a retirada do cetoconazol nas linhagens tumorais hipofisárias AtT-20, GH3 e α T3.1	32
4.3 O cetoconazol aumentou a expressão de genes relacionados à apoptose celular nas linhagens AtT-20, GH3, αT3.1 e MMQ.	34
4.4 Cetoconazol aumentou a expressão de genes relacionados à inibição do ciclo celular nas linhagens GH3, αT3.1 e MMQ	37
4.5 Cetoconazol reduziu a expressão de genes dos hormônios hipofisários nas linhagens GH3 e αT3.1.	38
5 DISCUSSÃO.....	40
5.1 A incubação com cetoconazol reduziu a viabilidade celular nas linhagens hipofisárias, sendo esta inibição parcialmente revertida após a retirada do cetoconazol do meio de cultura.....	40
5.2 O cetoconazol aumenta a expressão de genes relacionados à apoptose nas linhagens tumorais hipofisárias.	44
5.3 O cetoconazol aumenta a expressão gênica de inibidores do ciclo celular nas linhagens hipofisárias.	48
5.4 O cetoconazol reduz a expressão gênica dos hormônios hipofisários nas linhagens hipofisárias.....	51
6 CONCLUSÕES.....	55
7 ANEXOS.....	57
Anexo A – Artigo de Apoptose celular e hipófise	57
ANEXO B - Protocolo Ensaio de Viabilidade Celular: <i>Celltiter 96® Aqueous One Solution (Promega)</i>	63
ANEXO C - Protocolo para Extração de Rna: <i>Rneasy Mini Kit (Qiagen)</i>	64
ANEXO D - Protocolo para Síntese do cDNA: <i>2X Reverse Transcription Master Mix</i>	66
ANEXO E - Protocolo de Síntese do cDNA: <i>RT² first strand kit</i>	67
ANEXO F - Protocolo PCR em tempo real	69
ANEXO G - Genes escolhidos para estudo de expressão de vias de apoptose e reguladores do ciclo celular na placa de RT-qPCR.....	70

ANEXO H - Efeito do cetoconazol sobre a viabilidade celular nas linhagens tumorais hipofisárias.....	73
ANEXO I - Recuperação parcial da viabilidade celular nas linhagens tumorais hipofisárias após incubação com cetoconazol em diferentes concentrações e tempos de incubação.....	74
8 REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS

$2^{-\Delta\Delta CT}$	Método de quantificação relativa
AC	Adenilato ciclase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AD	Agonista dopaminérgico
Apaf1	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>
AS	Análogo de somatostatina
B2M	<i>Beta-2 microglobulin</i>
Bad	<i>Bcl2-antagonist of cell death</i>
Bax	<i>Bcl2-associated X protein</i>
Bcl2	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>
Bcl2l1	<i>Bcl-2 like 1</i>
Bcl2l11	<i>Bcl-2 like 11(Bim)</i>
Bcl2l2	<i>Bcl-2 like 2</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bnip1	<i>BCL2/adenovirus E1B interacting protein 1</i>
Bnip2	<i>BCL2/adenovirus E1B interacting protein 2</i>
Bnip3	<i>BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3</i>
Casp1	<i>Caspase 1</i>
Casp2	<i>Caspase 2</i>
Casp3	<i>Caspase 3</i>
Casp4	<i>Caspase 4</i>
Casp6	<i>Caspase 6</i>
Casp7	<i>Caspase 7</i>
Casp8	<i>Caspase 8</i>
Casp9	<i>Caspase 9</i>
Casp12	<i>Caspase 12</i>
Casp14	<i>Caspase 14</i>
Ccna1	<i>Cyclin A1</i>

Ccnb1	<i>Cyclin B1</i>
cDNA	DNA complementar
CDK	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
Cdkn1a	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)</i>
Cdkn1b	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)</i>
CGA	<i>Glycoprotein hormones, alpha subunit</i>
CRH	Hormônio de liberação da corticotropina
CRHR1	Receptor de CRH tipo 1
CRHR2	Receptor de CRH tipo 2
DC	Doença de Cushing
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
FADD	<i>Fas Adaptor Death Domain</i>
Faf1	<i>Fas associated factor 1</i>
Fas	<i>TNF receptor superfamily member 6</i>
FSH	Hormônio foliculoestimulante
FSH β	<i>Follicle stimulating hormone, beta polypeptide</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GH	Hormônio do crescimento
GH1	<i>Growth hormone 1</i>
GnRH	Hormônio de liberação das gonadotropinas
HPRT	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
KTC	Cetoconazol
LH	Hormônio luteinizante
LHB	<i>Luteinizing hormone beta</i>
MGDC	<i>Mouse Genomic DNA Contamination</i>
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
Mki67	<i>Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (ki-67)</i>
POMC	Pró-ópio-melanocortina
PLC	Fosfolipase C

PPC	<i>Positive PCR Control</i>
PPIA	<i>Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)</i>
PRL	Prolactina
RE	Retículo endoplasmático
RGDC	<i>Rat Genomic DNA Contamination</i>
RNM	Ressonância nuclear magnética
RTC	<i>Reverse Transcription Control</i>
SSTR	receptor do análogo de somatostatina
Tnf	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
Tnfrsf1a	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a (TNFR1A)</i>
Tnfrsf1b	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b (TNFR1B)</i>
TRH	Hormônio de liberação da tireotropina
Trp53	<i>Transformation related protein 53 (p53)</i>
Trp63	<i>Transformation related protein 63 (p63)</i>
Trp73	<i>Transformation related protein 73 (p73)</i>
TSH	Hormônio tireoestimulante
TSH β	<i>Thyroid stimulating hormone, beta</i>
μ M	Micromolar
μ g/ μ l	Micrograma por microlitro
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vias de sinalização celular envolvidas nos efeitos mediados pelos hormônios hipotalâmicos e hipofisários..	2
Figura 2	Características morfológicas das células durante o fenômeno da apoptose	8
Figura 3	As duas vias de estímulo da apoptose celular: via extrínseca/morte celular e via intrínseca/mitocondrial, ambas convergem na ativação da caspase-3, a qual, subsequentemente, termina nos eventos finais da morte celular.	10
Figura 4	Progressão do ciclo celular.....	12
Figura 5	Fluxograma da metodologia utilizada no ensaio de viabilidade celular.	20
Figura 6	Modelo de placa de 96 poços utilizado no experimento de viabilidade celular.	20
Figura 7	Fluxograma da metodologia utilizada para extração do RNA.....	22
Figura 8	<i>Layout</i> da Placa de PCR Array customizada utilizada nos experimentos de RT-qPCR nas linhagens tumorais hipofisárias AtT-20, GH3, α T3.1 e MMQ.....	23
Figura 9	Efeito do cetoconazol na secreção hormonal na células AtT-20	27
Figura 10	Titulação das densidades celulares de cada linhagem hipofisária estudada.....	28
Figura 11	Efeito na redução da viabilidade celular pelo cetoconazol.....	30
Figura 12	Efeito na redução da viabilidade celular pelo cetoconazol.....	31
Figura 13	Reversão parcial da viabilidade celular.....	33
Figura 14	Recuperação parcial da viabilidade celular após a retirada do cetoconazol do meio de cultura após as células ficarem incubadas 6, 12 e 24h nas células α T3.1.	34
Figura 15	O cetoconazol aumenta a expressão de genes relacionados a apoptose.....	36

Figura 16	Cetoconazol aumentou a expressão dos genes do inibidores do ciclo celular.....	37
Figura 17	O cetoconazol reduziu a expressão dos genes dos hormônios hipofisários.....	38
Figura 18	Ativação da via intrínseca e extrínseca da apoptose pelo cetoconazol nas linhagens tumorais hipofisárias.....	46
Figura 19	Ação do cetoconazol no aumento da expressão dos inibidores do ciclo celular.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Correlação clínico-patológica dos tumores hipofisários3
Tabela 2	Eficácia do cetoconazol no controle hormonal em pacientes portadores de doença de Cushing.....5
Tabela 3	Descrição dos genes avaliados na placa de RT-qPCR de acordo com sua função, em pertencentes as vias de apoptose, regulação do ciclo celular, hormônios hipofisários, genes endógenos e os controles da reação23

RESUMO

Guzzo MF. *Efeitos do cetoconazol e seus mecanismos de ação in vitro sobre linhagens hipofisárias tumorais imortalizadas* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O cetoconazol, inicialmente descrito como um agente antifúngico, revelou-se um potente inibidor da esteroidogênese adrenal, podendo, assim, ser utilizado no manejo da doença de Cushing, como terapia primária ou após insucesso cirúrgico, enquanto aguarda o efeito da radioterapia. Durante o tratamento com cetoconazol, uma redução dos níveis de cortisol é observada, usualmente não acompanhada por uma elevação do ACTH plasmático, como poderia ser esperada. Este fenômeno paradoxal, caracterizado pela redução do cortisol com níveis de ACTH inadequadamente normais ou não elevados, pode estar relacionado a uma ação adicional do cetoconazol nas células hipofisárias produtoras de ACTH. Para se testar essa hipótese, alguns estudos *in vitro* realizados na década de 80, avaliando a secreção de ACTH na vigência do cetoconazol, sugeriram a sua ação em células adenohipofisárias. Em adição, foi evidenciado que o cetoconazol ativou vias de apoptose em linhagens tumorais não hipofisárias. O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito *in vitro* do cetoconazol na viabilidade celular e na expressão de genes envolvidos na apoptose e replicação do DNA em linhagens tumorais hipofisárias imortalizadas corticotróficas (AtT-20), gonadotróficas (α T3.1), mamossomatotróficas (GH3) e mamotróficas (MMQ), utilizando-se a técnica de RT-qPCR. Os resultados mostraram que, na presença do cetoconazol, ocorreu uma redução da viabilidade celular nas linhagens hipofisárias, de forma concentração-dependente, às custas do estímulo da via extrínseca e intrínseca da apoptose, com aumento da expressão dos receptores de morte celular (ex.: Fas, TNFR) e/ou caspases (ex.: -2, -3, -6, -7, -9). Estes resultados foram associados a um aumento da expressão gênica dos inibidores do ciclo celular p21 (nas linhagens GH3 e α T3.1) e p27 (nas linhagens GH3 e MMQ), com uma redução acentuada da expressão destes genes após retirada do cetoconazol do meio de cultura. Concluímos que o cetoconazol tem o potencial de reduzir a viabilidade celular em linhagens tumorais hipofisárias possivelmente devido a uma ação citotóxica (pelo aumento de genes pró-apoptóticos) e citostática (pelo aumento de genes inibidores do ciclo celular).

Descritores: Doenças da hipófise; Neoplasias hipofisárias; Hipersecreção hipofisária de ACTH; Apoptose; Ciclo celular; Cetoconazol; Expressão gênica; Proliferação de células.

ABSTRACT

Guzzo MF. *Effects of ketoconazole and its mechanisms of action in pituitary tumoral immortalized cell lines* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2014.

Ketoconazole, initially described as an antifungal agent, proved to be a potent inhibitor of steroidogenesis, allowing its use in the management of Cushing's disease as primary or after unsuccessfully surgery and waiting the effect of radiotherapy. During treatment with ketoconazole, there a reduction in the cortisol levels is observed, usually not accompanied by an elevation of plasmatic ACTH, as could be expected. This paradoxical phenomenon, characterized by reduced cortisol with ACTH levels inappropriately normal or not elevated, could be related to an additional action of ketoconazole on ACTH-producing pituitary cells. In agreement with this hypothesis, some *in vitro* studies in the 80's, evaluating ACTH secretion in the presence of ketoconazole, suggested its action in pituitary cells. In addition, ketoconazole activated apoptosis pathways in non-pituitary tumor cell lines. Therefore, the present study aims to revisit this topic and evaluate the *in vitro* effect of ketoconazole on cell viability and expression of genes involved in apoptosis and DNA replication by RT-qPCR in immortalized pituitary tumoral corticotroph (AtT-20), gonadotroph (α T3.1), mammosomatotroph (GH3), mammotroph (MMQ) cell line. As a result, there was a reduction in pituitary cell viability with ketoconazole, in a concentration-dependent manner, due to stimulation of the extrinsic and intrinsic pathway of apoptosis, with increased expression of cell death receptors (eg. Fas, TNFR) and/or caspases (eg. -2, -3, -6, -7, -9). These results were associated with an increased gene expression of the cell cycle inhibitors p21 (in GH3 and α T3.1 cell line), and also p27 (in GH3 and MMQ cell line), with a significant reduction in the expression of these genes after removal of ketoconazole in the media. In conclusion, the ketoconazole have the potential of reduce cell viability in pituitary tumoral lineages possibly due to a cytotoxic effect (by increasing of pro-apoptotic genes) and cytostatic (by increasing of inhibitors of cell cycle genes).

Descriptors: Pituitary diseases; Pituitary neoplasms; Pituitary ACTH hypersecretion; Apoptosis; Cell cycle; Ketoconazole; Gene expression; Cell Proliferation.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Classificação dos tumores hipofisários e manejo clínico dos corticotropinomas

A adenohipófise desempenha um papel fundamental na regulação da função endócrina por meio da produção e liberação dos hormônios trópicos que são classificados em três famílias: os glicoproteicos (hormônio de liberação da tireotropina - TSH, hormônio folículoestimulante - FSH e hormônio luteinizante - LH), os hormônios derivados da pró-ópio-melanocortina - POMC (hormônio adrenocorticotrópico - ACTH), e os pertencentes à família do hormônio do crescimento (GH) e da prolactina (PRL). Diferentes vias de sinalização estão envolvidas nos efeitos mediados pelos hormônios hipotalâmicos e hipofisários, conforme descrito na Figura 1.¹

Figura 1 - Vias de sinalização celular envolvidas nos efeitos mediados pelos hormônios hipotalâmicos e hipofisários

Os fatores hipotalâmicos de liberação e inibição medeiam seus efeitos predominantemente por meio dos receptores acoplados à proteína G. Os hormônios da adenohipófise ligam-se aos receptores acoplados à proteína G, que modulam a atividade da adenilato ciclase, ou aos receptores de citocina da classe 1 cuja resposta é por meio da ativação da proteinocinase. TRH: hormônio de liberação da tireotropina; GnRH: hormônio de liberação das gonadotropinas; CRH: hormônio de liberação da corticotropina; GHRH: hormônio de liberação do GH; PLC: fosfolipase C; AC: adenilato ciclase; TSH: hormônio tireoestimulante; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio folículoestimulante; ACTH: hormônio adrenocorticotrópico; GH: hormônio do crescimento; PRL: prolactina. Adaptado de Molina P.¹

Os tumores hipofisários são definidos como neoplasias localizadas na sela túrcica, representados, na sua maioria, por adenomas derivados de células adenohipofisárias, e apenas uma pequena porcentagem representada por carcinomas e outras lesões de origem mesenquimal, neural, epitelial ou metastática.²

Os tumores hipofisários representam cerca de 10-15% de todas as neoplasias intracranianas cirurgicamente ressecadas, entretanto, pequenos adenomas incidentais em séries de autópsia são observados em até 27% dos casos, sendo que até um quinto da população terá anormalidades hipofisárias observadas ao exame de ressonância nuclear magnética (RNM). São classificados em relação ao seu tamanho como microadenomas (<1cm) ou macroadenomas (>1cm) e, clinicamente, como funcionantes ou não funcionantes.^{2,3}

Atualmente, os adenomas hipofisários também são classificados de acordo com o seu padrão imuno-histoquímico, o qual apresenta uma boa correlação com os dados bioquímicos de secreção hormonal, e com os sinais e sintomas clínicos associados à doença hipofisária⁴, conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Correlação clínico-patológica dos tumores hipofisários. Adaptado de Arafah BM *et al.*⁴

Nome do adenoma	Prevalência (% de todos os tumores)	Imunohistoquímica	Manifestação clínica
Prolactinoma	40-45	Prolactina	Sinais e sintomas de hiperprolactinemia
Somatotropinoma	20	GH ± prolactina	Acromegalia
Gonadotropinoma	15	LH, FSH, subunidade alfa	Sintomas mecânicos (efeito de massa), Hipopituitarismo
Corticotropinoma	10-12	ACTH	Hipercortisolismo
Adenoma <i>null-cell</i>	5-10	Nenhum	Efeitos compressivos, hipopituitarismo
Tireotropinoma	1-2	TSH ± subunidade alfa	Hipertireoidismo ± hipopituitarismo

Os corticotropinomas representam cerca de 10 a 12% dos tumores hipofisários, acometendo, predominantemente, mulheres, com pico de incidência entre os 20 e 50 anos. São responsáveis por, aproximadamente, 65 a 70% de todos os casos de síndrome de Cushing.⁴

A terapia de escolha nesses tumores é a adenomectomia transesfenoidal com uma taxa de remissão em pacientes portadores de microadenomas variando de 65 a 90%.⁵ A taxa de recorrência nestes pacientes é de 5 a 10% em 5 anos e de 10 a 20% em 10 anos, sendo que os mais jovens (25 anos ou menos) tem um maior risco de recorrência.⁵ Em adição, devido ao pequeno tamanho desses tumores, cerca de 40 a 50% não são localizados no exame de RNM pré-operatória⁶. Por outro lado, até 15 a 20% dos corticotropinomas se estendem além da sela túrcica, dificultando a ressecção completa do tumor. Portanto, quase invariavelmente, terapias complementares são necessárias para obter um melhor controle do hipercortisolismo e/ou do crescimento tumoral.⁴

A radioterapia é uma opção de tratamento nos casos de recidiva ou remanescente tumoral pós-operatório, cujos efeitos adversos, como o pan-hipopituitarismo, e a demora na resposta clínico-hormonal, são fatores limitantes. Desta forma, a introdução de agentes farmacológicos se tornou prioritária nos casos não curados.^{5,6}

Dentre os agentes farmacológicos utilizados no controle do hipercortisolismo, destaca-se o cetoconazol, um derivado imidazólico que atua como fungicida por alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática dos fungos sensíveis, culminando com rompimento da sua membrana celular.⁷

O cetoconazol que vem sendo utilizado no manejo da síndrome de Cushing, por inibir as enzimas do citocromo p450 envolvidas na esteroidogênese adrenal, reduz, assim, a produção do cortisol.^{5,8}

1.1.1 Uso do cetoconazol na prática clínica das doenças hipofisárias

Para o controle do hipercortisolismo, a dose inicial do cetoconazol preconizada é de 200 mg a cada 12 horas, podendo chegar a 1200 mg/dia, cujo efeito é reversível após a descontinuação da medicação.⁹ Seus principais efeitos adversos são alterações das enzimas hepáticas, distúrbios gastrointestinais e hipogonadismo em homens (por inibição da esteroidogênese gonadal).⁸

A efetividade do tratamento clínico do cetoconazol em portadores de doença de Cushing (DC) já foi estudada, sendo observado um controle hormonal em cerca de 50% dos pacientes previamente operados ou em terapia primária, com regressão clínica dos sinais e sintomas do hipercortisolismo, incluindo redução da pressão arterial e perda de peso.¹⁰

Estudos prévios demonstraram que, em pacientes portadores de DC, o cetoconazol induziu um controle hormonal do hipercortisolismo em cerca de 14-100% dos casos¹⁰⁻¹⁷, conforme descritos detalhadamente na Tabela 2.

Tabela 2 - Eficácia do cetoconazol no controle hormonal em pacientes portadores de doença de Cushing. Adaptado de *Castinetti et al.*¹⁰

Número de pacientes (n)	Média de seguimento (meses)	Pacientes controlados (%)	Efeitos colaterais (%)	Referência
28	7	93	29	(11)
6	8	100	0	(12)
6	1	100	40	(13)
8	0,5	100	25	(14)
6	0,5	83	50	(15)
7	0,5	14	0	(16)
38	22,6	51,5	29	(10)
200 (40:PT; 23:1T; 128: 2T)	PT: 4,05±4,1; 1T and 2T: 24,8±33,6)	PT: 48,7 1T and 2T: 49,3	PT: NI; 1T and 2T: 25,6	(17)
299	7,56	71,0	24,8	Todos os estudos compilados

*PT: tratamento pré-cirurgia; 1T: terapia primária; 2T: terapia secundária; NI: não incluso na análise

Apesar do controle clínico do hipercortisolismo na DC com o uso do cetoconazol, o comportamento do ACTH na vigência do tratamento é um fato bastante intrigante, pois, com o bloqueio da esteroidogênese adrenal, observou-se uma redução paradoxal dos níveis de ACTH¹⁸, ou mesmo uma.

ausência da esperada elevação dos seus níveis (pela perda do *feedback* negativo do cortisol sobre as células corticotróficas), sendo que tal fenômeno foi observado mesmo após estímulo com CRH¹², e associado a uma queda significativa dos níveis do cortisol sérico e/ou urinário.^{11,19} Diante de tais evidências, cogitou-se uma possível ação do cetoconazol sobre as células corticotróficas, e estudos *in vitro* foram realizados, principalmente, na década de 80 para testar esta hipótese.

1.1.2 Efeito do cetoconazol *in vitro* na secreção hormonal em células hipofisárias

Estudos prévios *in vitro* têm evidenciado resultados conflitantes em relação à secreção do ACTH por células adenohipofisárias após a exposição ao cetoconazol. *Burrin et al.*²⁰ demonstraram uma ausência do efeito inibitório do cetoconazol sobre a secreção do ACTH *in vitro* e *in vivo*, enquanto *Stalla et al.*^{21,22}, utilizando tecido hipofisário de rato, evidenciaram uma redução da secreção do ACTH *in vitro* e do RNAm da POMC, mais evidente após estímulo com CRH, sendo este efeito inibitório mediado pela redução da formação do AMPc pelo adenilato ciclase, o qual foi reversível após retirada do cetoconazol do meio de cultura.

Em material obtido de adenomectomia de pacientes portadores de síndrome de Nelson, o cetoconazol induziu *in vitro* uma redução da densidade dos grânulos de secreção dos lisossomas, da superfície do retículo endoplasmático, e também da secreção de ACTH, de forma concentração-dependente, no meio de cultura.²³

O efeito do cetoconazol na secreção de outros hormônios hipofisários também foi avaliado e, utilizando células da hipófise anterior de rato, foi evidenciada uma redução da secreção *in vitro* de GH (após estímulo com

GHRH) e PRL basal.²² Na linhagem tumoral hipofisária de rato (GH3/B6), o cetoconazol reduziu a secreção de GH e PRL (ambos após estímulo com TRH).²⁴

Em adição, *Drouhault et al.*²⁵ observaram um efeito citotóxico do cetoconazol nas células GH3/B6, com uma taxa de sobrevivência de cerca de 50%, sendo que estas células remanescentes pararam de proliferar, porém mantiveram a secreção de GH, mas não de PRL, apesar do estímulo hormonal com TRH.

1.1.3 Efeito antiproliferativo do cetoconazol *in vitro* em células não hipofisárias

Um dos principais e mais graves efeitos adversos do uso clínico do cetoconazol é a hepatotoxicidade, sendo preconizada uma avaliação periódica das enzimas hepáticas durante o uso clínico desta medicação.⁸

O mecanismo de hepatotoxicidade do cetoconazol permanece desconhecido, porém utilizando cultura primária de hepatócitos de rato tratados com cetoconazol *in vitro* houve uma redução da viabilidade celular, de forma concentração e tempo-dependentes, e aumento da lactato desidrogenase no meio de cultura.²⁶

O efeito antiproliferativo do cetoconazol também foi evidenciado em células neoplásicas prostáticas, sugerindo um efeito citotóxico direto nestas células independente de andrógenos.²⁷

Também foi reportado que o cetoconazol reduziu a viabilidade celular por estímulo da apoptose celular, de maneira concentração-dependente, em linhagens celulares de hepatocarcinoma e carcinoma colorretal humanos, assim como nas células de cultura primária hepática de rato.²⁸

Este efeito de estimular as diferentes vias da apoptose celular induzido pelo cetoconazol, com consequente redução da proliferação celular, também foi evidenciado na linhagem celular de osteossarcoma humano.²⁹

1.2 Apoptose celular

A apoptose ou morte celular programada tem um papel essencial na vida de organismos multicelulares, pois mantém o desenvolvimento e a homeostase dos tecidos.³⁰

A apoptose é altamente regulada e balanceada no contexto fisiológico, e falhas nesta regulação resultam em condições patológicas, como malformações, doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas ou neoplasias.³¹ Características morfológicas típicas foram descritas nas células em processo de apoptose, conforme descrito na Figura 2.³²

FONTE: www.promega.com adaptado

Figura 2 - Características morfológicas das células durante o fenômeno da apoptose

Muitos estudos têm sido conduzidos para explorar os mecanismos moleculares da sinalização das vias de apoptose, que controlam sua inicialização, mediação, execução e regulação. Como a desregulação da apoptose é a chave para o desenvolvimento de muitas doenças neoplásicas, como o câncer, esta se torna um alvo atraente para intervenção terapêutica.³⁰

1.2.1 Mecanismos moleculares da apoptose

Estímulos exógenos que agem em receptores de membrana, ou estímulos endógenos gerados após diferentes agressões, como a lesão do DNA induzida por irradiação, estresse oxidativo, agressão química e hipóxia, levam a célula a um de dois caminhos distintos, porém convergentes, de morte celular: via receptor de morte celular (via extrínseca) ou a via mitocondrial (via intrínseca).³³

A via extrínseca é ativada pela ligação do ligante ao receptor de morte, pertencente à superfamília de genes dos receptores TNF (*tumor necrosis factor receptor*, TNFR), incluindo TNFR1 (*TNF receptor-1*), CD95 (Fas), e receptores TRAIL (DR4 e DR5). Estes receptores possuem diversas funções, com importante papel na imunidade e na inflamação (especialmente o TNFR), mas também no controle da proliferação, diferenciação e apoptose celular (especialmente o Fas).^{30,34}

O estímulo por um ligante de morte resulta em oligomerização destes receptores e recrutamento de uma proteína adaptadora ligada ao Fas (*Fas Adaptor Death Domain*, FADD), permitindo a ligação da pró-caspase-8, formando um complexo sinalizador de indução de morte (*Death-Inducing Signaling Complex*, DISC) que irá ativar a caspase-8, com posterior ativação das caspases efetoras (-3, -6 e -7) e consequente execução da apoptose.^{24,29,30}

A via intrínseca é ativada por diversos estímulos de apoptose, os quais convergem na mitocôndria, como dano ao DNA induzida por irradiação, agentes químicos, hipóxia ou estresse oxidativo.³³

A interação entre membros pró-apoptóticos (ex.: Bak, Bax, Bim, Bid e Bnip 1, 2 e 3) e anti-apoptóticos (ex.: Bcl-2, Bcl-xl) da família das Bcl-2 é que controla a via mitocondrial. O principal evento desta via é a permeabilização da membrana externa mitocondrial (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*, MOMP) com consequente efluxo de proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo c, que se liga a Apaf-1 (*Apoptosis Protease-Activating Factor -1*) e a pró-caspase-9, formando o apoptossomo, que libera

a caspase-9 ativa, que ativará a caspase-3, com consequente apoptose celular.^{30,33}

Apesar das diferentes maneiras de inicialização da apoptose, ambas as vias extrínseca e intrínseca convergem para ativação da caspase-3, a qual é fundamental para ativação das caspases efetoras (-2, -6, -8, -10) com progressão do mecanismo de apoptose. A caspase 3 é a principal efetora na quebra dos componentes responsáveis pelas características morfológicas típicas do processo apoptótico, já descritas na Figura 2.³⁷

Uma outra forma de interação entre as duas vias da apoptose também foi evidenciada. A sinalização mediada pelo receptor de morte (via extrínseca), por meio da ativação do Bid mediada pela caspase-8, pode ativar a via intrínseca (mitocondrial).³⁶ Esta interação entre as vias intrínseca e extrínseca da apoptose pode ser visualizada na Figura 3.

Figura 3 - As duas vias de estímulo da apoptose celular: via extrínseca/morte celular e via intrínseca/mitocondrial, ambas convergem na ativação da caspase-3, a qual, subsequentemente, termina nos eventos finais da morte celular. Adaptado de Guzzo *et al.*³⁸.

Uma revisão detalhada sobre papel da apoptose no desenvolvimento hipofisário e nos adenomas hipofisários foi publicado por nós (*Guzzo MF et al.*)³⁸ e está na íntegra no Anexo A.

O p53 é um gene supressor tumoral que está mutado ou inativado em mais de 50% dos cânceres humanos. A proteína p53 participa da regulação do ponto de checagem no estágio G1 do ciclo celular, que tem fundamental importância na manutenção da integridade do genoma, pois permite ações de mecanismos de reparo do DNA, ou remoção de células danificadas por meio do processo de apoptose, essencialmente pela via intrínseca, mas também pela via extrínseca, ilustrado na Figura 3.³⁹

Recentemente, foram identificados genes homólogos ao p53, denominados p63 e p73, provavelmente oriundos de um gene ancestral comum. A indução de morte celular pelo p53 requer a presença de pelo menos um dos membros da família p53, p63 ou p73. Esta necessidade está correlacionada à inabilidade do p53 de se ligar aos promotores de apoptose na ausência do p63/p73.^{39,40}

1.3 Ciclo celular

O ciclo celular é, tradicionalmente, dividido em crescimento celular, replicação do seu genoma e divisão celular, e divide-se em quatro fases: S (síntese do DNA); M (mitose), e as fases de crescimento celular, G1 e G2. Quando as células cessam a proliferação, entram numa fase quiescente ou G0.⁴¹

Para a ocorrência dinâmica dessas fases, algumas proteínas são indispensáveis, como as ciclinas (A, B, D e E), as quinases dependentes de ciclinas (*cyclin-dependent kinases*, CDK 1, 2, 4 e 6) e seus inibidores (*cyclin-dependent kinase inhibitor*, CDKI) pertencentes à família INK 4 (p16, p15, p18, p19), que exibem sua ação por meio da competição com a ciclina D pela subunidade da CDK4/6, e à família WAF (p21 e p27) que formam um

complexo heterodimérico com as CDKs G1/S (preferencialmente a CDK2) e inibem a atividade do complexo CDK2-ciclina E.⁴²⁻⁴⁴

Após estímulos mitogênicos, a ciclina D ativa a CDK4/6 no início da fase G1 e o complexo CDK4/6-ciclina D parcialmente fosforila a proteína regulatória retinoblastoma (Rb). Subsequentemente, há ativação do complexo ciclina E-CDK2 na transição das fases G1-S, que completa a fosforilação da proteína Rb, com consequente liberação dos fatores de transcrição E2F permitindo a progressão do ciclo celular (Figura 4). Em seguida, a CDK2 é capturada pela ciclina A com a progressão do ciclo celular para fase S.⁴¹

Figura 4 - Progressão do ciclo celular.

No início da fase G1, em resposta ao estímulo mitogênico, a ciclina D ativa a CDK4/6 o qual parcialmente fosforila proteína Rb. Após progressão além do ponto de restrição, CDK2 num complexo com ciclina E também fosforila a proteína Rb permitindo a transcrição da ciclina A. O acúmulo da ciclina A captura a CDK2 da ciclina E permitindo a progressão para fase S. Os inibidores da CDK se opõe à ativação das CDK: Na fase inicial G1, a família INK 4 (p16, p15, p18, p19) se liga ao CDK 4/6 e impede a ativação da ciclina D. Na transição da fase G1-S, membros da família WAF (p21 e p27) sequestram a CDK2 da ciclina E/A impedindo a progressão do ciclo celular. Adaptado de Musat *et al.*⁴¹

*CDK= quinases dependentes de ciclinas; P= processo de fosforilação; Rb= proteína do retinoblastoma

O Ki-67 é uma proteína de localização nuclear utilizada para detectar e quantificar as células em proliferação. Está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), estando ausente nas células quiescentes (G0). Embora seja amplamente utilizado como marcador de proliferação celular, sua função está pobremente compreendida. Ademais, sua expressão está elevada numa grande variedade de tecidos tumorais humanos, sendo considerado um importante marcador prognóstico, pois está inversamente correlacionado com as taxas de sobrevivência numa grande variedade de cânceres.^{45,46}

1.4 Resumo da introdução

Diante dos dados prévios sobre o efeito do cetoconazol na redução da secreção hormonal *in vitro* em células hipofisárias corticotróficas, e também nas células mamossomatotróficas, aliado aos estudos prévios que comprovaram o estímulo da apoptose celular pelo cetoconazol em células tumorais não hipofisárias, entendemos que o conhecimento da expressão dos genes envolvidos na apoptose e regulação do ciclo celular na presença do cetoconazol é um importante passo para o entendimento do usual efeito paradoxal do cetoconazol sobre as células tumorais adenohipofisárias já descrito nos ensaios clínicos.

Portanto, esse projeto tem como objetivo contribuir para este tópico, analisando o efeito deste derivado imidazólico sobre a viabilidade celular, e seu mecanismo de ação provável, na linhagem tumoral corticotrófica imortalizada, e, também, apesar das evidências clínicas mais concretas nestas células, optamos por ampliar esta análise molecular nas outras linhagens hipofisárias, como as gonadotróficas, mamossomatotróficas e mamotróficas.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito do cetoconazol na viabilidade celular *in vitro* nas linhagens celulares hipofisárias tumorais imortalizadas corticotrófica (AtT-20), mamossomatotrófica (GH3), mamotrófica (MMQ) e gonadotrófica (α T3.1).

2.2 Específico

Análise da expressão gênica quantitativa por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real (RT-qPCR) de genes anti-apoptóticos, pró-apoptóticos e reguladores do ciclo celular, na presença do cetoconazol e após sua retirada do meio de cultura, nas linhagens tumorais hipofisárias AtT-20, GH3, α T3.1 e MMQ.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Processo nº 0216/11). As culturas celulares e as avaliações moleculares foram realizadas no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas, FMUSP.

3.1 Cultura de células AtT-20, GH3, α T3.1 e MMQ

As culturas celulares da linhagem tumoral gonadotrófica de camundongo – α T3.1 (gentilmente cedidas pela *Dra Pamela Melon, University of California, San Diego, USA*), da linhagem tumoral hipofisária corticotrófica de camundongo – AtT-20 (gentilmente cedidas pela *Dra Audrey F. Seasholtz, University of Michigan, USA*); linhagem tumoral hipofisária mamossomatotrófica de rato – GH3 e a linhagem tumoral hipofisária mamotrófica de rato – MMQ (cedidas gentilmente pela *Dra Sally Camper, University of Michigan, USA*) foram mantidas a 37°C, 5% CO² em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco products, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA*) suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% antibióticos (Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA), e sem antifúngico, exceto a linhagem MMQ que foi mantida em meio DMEM/F12 (1:1) (*Gibco products, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA*), suplementada com 2,5% soro fetal bovino (*Gibco products, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA*), e 15% de soro de cavalo (*Gibco products, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA*). Para manutenção do estoque, todas as linhagens celulares foram congeladas em meio de

cultura celular específico contendo DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e mantidas no nitrogênio líquido.

Uma solução-estoque de cetoconazol (1mM) (Purifarma, São Paulo, SP, Brasil) foi preparada na diluição (1:1) com metanol:água, baseado em estudos prévios *in vitro* do uso de cetoconazol em células hipofisárias^{21,22} e não hipofisárias.^{28,29} De acordo com o fabricante, o cetoconazol deve ser diluído em metanol, e estudos anteriores demonstraram que a concentração utilizada (cerca de 74,1 mmol/l) está dentro da faixa de 30-100 mmol/l, que se mostrou previamente não ter interferência em células murinas.⁴⁷ Uma alíquota da solução-estoque do cetoconazol foi rediluído no meio de cultura específico suplementado com soro fetal bovino e/ou soro de cavalo em cada linhagem celular estudada, com a concentração final variando de 20 a 100µM.

As concentrações utilizadas de cetoconazol no nosso estudo foram baseadas em estudos prévios em células hipofisárias e não hipofisárias, cuja concentração de cetoconazol *in vitro* variou de 1 a 200µM.^{28,29} Além disso, foi considerado, também, que a concentração terapêutica no plasma humano após ingesta oral de 200 mg de cetoconazol variou de 3,3 a 9,6µM^{48,49}, portanto, após a ingestão máxima via oral de 1200 mg/dia, a concentração sérica esperada seria, aproximadamente, de 60 µM, que foi a concentração máxima utilizada nos nossos experimentos.

3.2 Ensaio de dosagem hormonal

As células corticotróficas AtT-20 foram plaqueadas e incubadas com cetoconazol (em diferentes concentrações) em placas de cultura com 12 poços na densidade de 10^5 células/poço. Após adicionar o cetoconazol no meio de cultura celular, uma alíquota do sobrenadante foi coletada aos 30 e 180 minutos (3 horas). Após 3h de incubação, o meio contendo cetoconazol foi removido, e as células lavadas com PBS (1x), e novo meio DMEM foi adicionado. Três horas após a troca do meio, o sobrenadante foi,

novamente, coletado. O material coletado nos diferentes pontos descritos foi estocado a -20°C , e, posteriormente, as amostras foram submetidas à dosagem hormonal de ACTH. Foram realizados dois experimentos independentes com, pelo menos, três poços por amostra, sendo estas amostras tratadas com cetoconazol nas concentrações 25, 50 e $100\text{ }\mu\text{M}$ ou não tratadas (controle). A concentração do ACTH no sobrenadante foi mensurada pelo imunoensaio comercial (*AutoDELFIA*; *PerkinElmer*®, *Waltham, MA*) com uma sensibilidade analítica de 5 pg/ml e variação inter e intraensaio de 4,4% e $<6\%$, respectivamente.

3.3 Kit de viabilidade celular

As linhagens tumorais hipofisárias AtT-20, GH3, $\alpha\text{T3.1}$ e MMQ foram crescidas em placas de 96 poços em uma densidade de $0,7 \times 10^4$ células/ml (para AtT-20), $1,5 \times 10^4$ células/ml (para GH3 e $\alpha\text{T3.1}$) e 9×10^4 células/ml (para MMQ). As densidades celulares descritas foram escolhidas após o experimento da titulação das densidades discriminados nos resultados. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram incubadas com cetoconazol em diferentes concentrações (20, 40 e $60\mu\text{M}$), com, pelo menos, seis poços em cada amostra tratada ou não tratada (controle) por experimento, nos períodos de incubação de 6, 12 e 24h (Figura 5).

Com objetivo de avaliar se o efeito antiproliferativo do cetoconazol era reversível, também foi estudada a viabilidade celular após 48h da retirada do cetoconazol do meio de cultura posteriormente às células terem sido expostas por 6h, 12h e 24h à medicação em diferentes concentrações, exceto na linhagem MMQ, que, sendo uma linhagem celular em suspensão, por questões técnicas, não foi possível a realização deste passo.

De acordo com as instruções do fabricante (Anexo B), o *CellTiter 96*® *AQueous One Solution* (*Promega, Madison, WI, USA*) foi adicionado nas últimas 2 horas de cada experimento. A intensidade da reação colorimétrica foi mensurada em um leitor de Elisa (*Stat Fax 2100- Technology Inc*)

utilizando um comprimento de onda de 492nm. O modelo da placa está ilustrado na Figura 6.

Figura 5 - Fluxograma da metodologia utilizada no ensaio de viabilidade celular

Foi utilizado o kit *CellTiter 96® Aqueous One Solution* que foi adicionado ao meio 2h antes do término de cada experimento em todas as linhagens tumorais hipofisárias estudadas.

*KTC = cetoconazol

Figura 6 - Modelo de placa de 96 poços utilizado no experimento de viabilidade celular

As células foram incubadas com cetoconazol (20, 40 e 60µM) por 6, 12 e 24h. Círculo azul: poços controle; Retângulo roxo: poços contendo somente o meio DMEM (*background*); Retângulo verde: poços contendo cetoconazol 20µM; Retângulo amarelo: poços contendo cetoconazol 40µM; Retângulo vermelho: poços contendo cetoconazol 60µM.

O ensaio de proliferação celular *CellTiter 96® AQueous One Solution* baseia-se na biorredução do composto tetrazólio (amarelo) em formazan (castanho), solúvel no meio de cultura. Esta reação de redução é realizada somente por células viáveis. Desta forma, a viabilidade celular é diretamente proporcional à absorbância do formazan mensurada no meio. Os resultados apresentados correspondem à média dos valores em triplicata em replicata.

3.4 RT-qPCR Array

3.4.1 Extração do RNA

As amostras de RNA total das linhagens hipofisárias tumorais estudadas foram extraídas em dois momentos: após 6h da incubação com cetoconazol na concentração de 40µM e 48h da retirada do cetoconazol após as células ficarem incubadas com a medicação na concentração de 40µM por 6h. Optamos pela concentração de cetoconazol 40µM e o tempo de incubação de 6h por representarem uma redução de cerca de 50% na viabilidade celular em todas as linhagens hipofisárias estudadas.

Foi utilizado o kit *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), incluindo o passo de descontaminação de DNA genômico utilizando a enzima *RNase-Free DNase Set* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), conforme protocolo do fabricante (Anexo C) e descrição na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma da metodologia utilizada para extração do RNA

O RNA foi extraído após as células ficarem incubadas com cetoconazol 40 µM por 6h e 48h da retirada do cetoconazol do meio de cultura, utilizando o kit RNeasy Minikit (Qiagen), conforme instruções do fabricante (Anexo C). *KTC= cetoconazol

3.4.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

O cDNA das linhagens celulares GH3, AtT-20 e αT3.1 foram sintetizados a partir de 5 µg de RNA total utilizando-se o kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) conforme protocolo do fabricante (Anexo D).

Por questões técnicas, o cDNA da linhagem celular MMQ foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total utilizando-se o kit *RT² First Strand* (SABioscences- QIAGEN, Valencia, CA, USA), seguindo protocolo do fabricante (Anexo E).

3.4.3 PCR em tempo real

Os cDNAs foram utilizados nas reações de RT-qPCR utilizando o *kit RT² Profiler™ PCR Array* (SYBR® Green PCR Mastermix) – CAPM11120A (camundongo) e CAPR11121A (rato) (SABioscences- QIAGEN, Valencia,

CA, USA), conforme protocolo do fabricante (Anexo F). Os genes analisados encontram-se divididos em 2 amostras por placa que estão descritos e classificados de acordo com sua função na Figura 8 e Tabela 3, e estão pormenorizados no Anexo G.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Casp1	Casp2	Casp3	Casp4	Casp6	Casp7	Casp1	Casp2	Casp3	Casp4	Casp6	Casp7
B	Casp8	Casp9	Casp12	Casp14	Bad	Bax	Casp8	Casp9	Casp12	Casp14	Bad	Bax
C	Bcl2	Bcl2l1	Bcl2l2	Bcl2l11	Fas	faf1	Bcl2	Bcl2l1	Bcl2l2	Bcl2l11	Fas	faf1
D	Apaf1	Trp53	Trp63	Trp73	Mki67	Ccna1	Apaf1	Trp53	Trp63	Trp73	Mki67	Ccna1
E	ccnb1	Cdkn1a	Cdkn1b	Tnfrsf1b	Tnfrsf1a	Tnf	ccnb1	Cdkn1a	Cdkn1b	Tnfrsf1b	Tnfrsf1a	Tnf
F	Bid	Bnip1	Bnip2	Bnip3	TSHB	CGA	Bid	Bnip1	Bnip2	Bnip3	TSHB	CGA
G	GH	LH	FSHB	PRL	POMC	PPIA	GH	LH	FSHB	PRL	POMC	PPIA
H	B2M	HPRT	GAPDH	MGDC*	RTC*	PPC*	B2M	HPRT	GAPDH	MGDC*	RTC*	PPC*

Amostra 1
Amostra 2

Figura 8 - *Layout* da Placa de PCR Array customizada utilizada nos experimentos de RT-qPCR nas linhagens tumorais hipofisárias AtT-20, GH3, αT3.1 e MMQ

Tabela 3 - Descrição dos genes avaliados na placa de RT-qPCR de acordo com sua função, em pertencentes as vias de apoptose, regulação do ciclo celular, hormônios hipofisários, genes endógenos e os controles da reação

VIA INTRÍNSECA DA APOPTOSE	VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE	CICLO CELULAR	HORMÔNIOS HIPOFISÁRIOS	GENES ENDÓGENOS	CONTROLES
Bad, Bax, Bcl2, Bcl2l1, Bcl2l2, Bcl2l11 (Bim), Bid	Fas, Faf1	ki67	GH1, POMC, PRL, TSHB, FSHβ, LHβ, CGA	Ppia, B2m, Hprt, Gapdh	MGDC*, RGDC*, RTC*, PPC*
Bnip1, Bnip2, Bnip3	Tnf (1a e 1b)	Ccna1 (ciclina A1), Ccnb1 (ciclina D1)			
Casp1, Casp2, Casp3, Casp4, Casp6, Casp7, Casp8, Casp9, Casp12, Casp14		Cdkn1a (p21), Cdkn1b (p27)			
Apaf1					
p53, p63, p73					

As amplificações foram efetuadas no termociclador ABI Prism 7000 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). A expressão dos genes foi normalizada utilizando-se a média dos C_{Ts} das amostras utilizadas como calibradores que consistiram de RNAs obtidos de células de cada linhagem hipofisária estudada que não foram expostas ao cetoconazol (grupo controle). A quantificação relativa foi realizada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)⁵⁰, em que o ΔC_T representa a diferença de expressão entre o gene-alvo e cada gene endógeno (total de quatro) de uma determinada amostra (tratado ou não tratado/calibrador) e o $\Delta\Delta C_T$ corresponde à diferença entre o ΔC_T de uma amostra tumoral tratada com cetoconazol e ΔC_T do calibrador/não tratado. Os valores da expressão gênica representam o número de vezes em que o gene-alvo está expresso nas células tratadas com cetoconazol em relação às células não tratadas. Os resultados do RT-qPCR estão representados por experimentos independentes em triplicata para cada linhagem celular hipofisária. Os dados da expressão gênica estão descritos nos resultados da seguinte forma: média $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (log2) $\pm$ DP na presença do cetoconazol *versus* a média $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (log2) $\pm$ DP 48h da retirada do cetoconazol 40 μ M após as células terem ficado incubadas por 6h.

3.4.4 Estatística

Para a análise estatística dos resultados da dosagem de ACTH nas células AtT-20 tratadas com cetoconazol comparadas ao controle (células não tratadas), assim como para os ensaios de viabilidade celular em todas as linhagens hipofisárias estudadas, em que os resultados da absorbância (Abs) foram avaliados por meio do cálculo da média e desvio padrão dos grupos expostos às diferentes concentrações de cetoconazol (nos diferentes períodos de incubação realizados) comparados ao grupo controle (células não tratadas), ambos os experimentos descritos foram analisados utilizando o teste estatístico de análise de variância (ONE WAY ANOVA) com correção para múltiplos testes de Bonferroni.

Para realização dos gráficos de viabilidade celular, foi utilizada a fórmula: inibição da proliferação celular (%) = (Abs da amostra tratada/Abs do controle) x 100, logo os dados estão expressos em porcentagem do controle.

Para análise do RT-qPCR, foi realizada a conversão dos resultados do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de cada gene estudado para uma escala logarítmica de base 2, e calculado a média e o desvio-padrão. Valores maiores ou menores que 1,32 (log2 de 2,5) foi considerado estatisticamente diferente do controle, e podem ser analisados conjuntamente nos gráficos demonstrados nos resultados.

Para comparar os valores da expressão gênica das células tratadas com cetoconazol 40µM por 6h e a expressão encontrada nas células 48h da retirada do cetoconazol 40 µM (após ficarem incubadas por 6h), foi utilizado o *test t Student* pareado.

Para os diferentes cálculos estatísticos supracitados, foram utilizados o programa SigmaStat 3.5 (*Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA*) e Biostat 5.0 (*Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brasil*), e $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Cetoconazol reduziu os níveis de ACTH no meio de cultura na linhagem hipofisária tumoral corticotrófica AtT-20

No ensaio de avaliação hormonal na linhagem AtT-20, os níveis de ACTH no meio de cultura estavam no limite superior de detecção após 3h de incubação com cetoconazol. Observamos que os níveis de ACTH dosados 3h após a retirada do cetoconazol do meio de cultura estavam significativamente reduzidos, de forma concentração-dependente, em 30,2% e 91,1% após a incubação com cetoconazol 50 μ M e 100 μ M, respectivamente ($p < 0,05$, vs controle). Este resultado pode sugerir que o cetoconazol induza à morte celular na linhagem tumoral hipofisária produtora de ACTH, com consequente redução dos níveis de ACTH no meio de cultura (Figura 9).

Figura 9 - Efeito do cetoconazol na secreção hormonal na células AtT-20

As células foram tratadas com diferentes concentrações de cetoconazol (25, 50 e 100 μ M) por 3h. As amostras foram coletadas com 30 min e 3h de incubação, e também 3h após retirada do cetoconazol do meio de cultura. O ACTH foi mensurado por imunoensaio. Os resultados estão apresentados como porcentagens dos níveis hormonais em relação ao controle. Cada ponto representa a média de 3 poços/experimento em 2 experimentos independentes. * $p < 0.05$ vs. Controle; KTC= cetoconazol

4.2 Avaliação da viabilidade celular nas linhagens hipofisárias

4.2.1 Titulação da densidade celular

No primeiro momento, conforme orientação do fabricante, foi realizada a titulação da densidade celular para cada linhagem hipofisária, e calculado o coeficiente de correlação linear (r^2 próximo de 1, que indica uma resposta linear entre número de células/poço e a absorbância).

Foi utilizado, nos experimentos, a densidade celular que representasse o valor médio das densidades encontradas em cada linhagem, e também uma confluência celular de cerca de 50% à microscopia óptica.

Foi escolhida a densidade celular de $0,7 \times 10^4$ células/ml na linhagem celular AtT-20, de $1,5 \times 10^4$ células/ml para linhagens GH3 e α T3.1, e de 9×10^4 células/ml para linhagem MMQ (Figura 10).

Figura 10 - Titulação das densidades celulares de cada linhagem hipofisária estudada

Foi utilizado, nos experimentos, a densidade celular que representasse o valor médio das densidades encontradas em cada linhagem, e também uma confluência celular de cerca de 50% à microscopia óptica, logo para a linhagem AtT-20: $0,7 \times 10^4$ cél/ml (Fig10A); na linhagem GH3: $1,5 \times 10^4$ cél/ml (Fig 10B); na linhagem α T3.1: $1,5 \times 10^4$ cél/ml (Fig 10C) e na linhagem MMQ: 9×10^4 cél/ml (Fig 10D).

4.2.2 Cetoconazol reduziu a viabilidade celular nas linhagens AtT-20, GH3, α T3.1 e MMQ.

O tratamento com cetoconazol causou um importante efeito concentração-dependente na redução da viabilidade celular nas concentrações de 20 μ M ($79,2 \pm 5,4\%$ vs controle, $p < 0,05$), 40 μ M ($47,3 \pm 11,89\%$, $p < 0,001$) e 60 μ M ($29,6 \pm 4,32\%$, $p < 0,001$) no período de incubação de 6h na linhagem AtT-20. Após 12h, não verificamos redução significativa da viabilidade celular com 20 μ M ($77,8 \pm 7,8\%$, $p = \text{NS}$), mas houve efeito de inibição da proliferação celular com 40 μ M ($59,7 \pm 11,6\%$, $p < 0,05$) e 60 μ M ($21,5 \pm 21,4\%$, $p < 0,001$). Adicionalmente, este efeito inibitório do cetoconazol foi semelhante após 24h de incubação nas concentrações de 20 μ M ($93,0 \pm 1,44\%$, $p = \text{NS}$), 40 μ M ($34,0 \pm 1,44\%$, $p < 0,001$) e 60 μ M ($10,88 \pm 5,7\%$, $p < 0,001$) (Figura 11A).

Foi evidenciado um efeito na redução da viabilidade celular pelo cetoconazol, de forma concentração-dependente, na linhagem tumoral hipofisária GH3 nas concentrações de 20 μ M ($90,0 \pm 0,6\%$, $p < 0,001$), 40 μ M ($51,2 \pm 3,1\%$, $p < 0,001$) e 60 μ M ($43,4 \pm 0,3\%$, $p < 0,001$) no tempo de exposição de 6h. Este efeito inibitório foi similar após 12h de incubação com 20 μ M ($87,9 \pm 6,1\%$, $p < 0,001$), 40 μ M ($51,2 \pm 0,7\%$, $p < 0,001$) e 60 μ M ($38,7 \pm 0,3\%$, $p < 0,001$). Entretanto, após 24h o efeito inibitório do cetoconazol 20 μ M ($100 \pm 2,2\%$, $p = \text{NS}$), não foi evidenciado, mas, com 40 μ M ($53,7 \pm 2,5\%$, $p < 0,001$) e 60 μ M ($17,2 \pm 3,6\%$, $p < 0,001$), houve uma redução significativa da viabilidade celular (Figura 11B).

Figura 11 - Efeito na redução da viabilidade celular pelo cetoconazol

A: Redução de forma concentração – dependente na linhagem celular hipofisária AtT-20 nos períodos de incubação 6, 12 e 24h. **B:** Efeito inibitório do cetoconazol, de forma concentração-dependente, na redução da viabilidade na linhagem hipofisária GH3 nos períodos de incubação 6, 12 e 24h.

*KTC= cetoconazol;

Evidenciamos um importante efeito do cetoconazol, de forma concentração-dependente, na redução da viabilidade celular na linhagem hipofisária α T3.1 nas concentrações de 20µM ($82,0 \pm 4,4\%$, $p<0,001$), 40µM ($66,8 \pm 16,8\%$, $p<0,001$) e 60µM ($39,0 \pm 0,8\%$, $p<0,001$) após 6h de incubação. Este efeito inibitório do cetoconazol sobre a viabilidade celular também foi significativo após 12h de incubação com cetoconazol 20µM ($86,0 \pm 4,7\%$; $p<0,001$), 40µM ($50,3 \pm 2,3\%$, $p<0,001$) e 60µM ($27,9 \pm 1,5\%$, $p<0,001$), e, também, após 24h de incubação com cetoconazol 20µM ($79,6 \pm 5,2\%$, $p<0,001$), 40µM ($28,7 \pm 1,3\%$, $p<0,001$) e 60µM ($11,2 \pm 1,3\%$, $p<0,001$) (Figura 12A).

Já na linhagem tumoral hipofisária produtora de prolactina (MMQ), observamos um efeito menos evidente do cetoconazol na redução da viabilidade celular, que se manteve de forma concentração-dependente, em todos os tempos estudados. Após 6h de incubação, observamos que não houve uma redução da viabilidade com cetoconazol 20 μ M ($119,4 \pm 53,7\%$, $p=NS$), porém uma redução significativa com 40 μ M ($53,3 \pm 23,1\%$, $p<0,05$) e 60 μ M ($38,8 \pm 22,1\%$, $p<0,001$) foi evidenciada. Um resultado semelhante foi observado após 12h de incubação com cetoconazol 20 μ M ($98,1 \pm 5,0\%$; $p=NS$), 40 μ M ($83,3 \pm 11,0\%$, $p=NS$) e 60 μ M ($74,6 \pm 14,2\%$, $p<0,05$), e, também, após 24h de incubação com cetoconazol 20 μ M ($115,6 \pm 48,3\%$, $p=NS$), 40 μ M ($123,6 \pm 46,5\%$, $p=NS$) e 60 μ M ($51,7 \pm 12,9\%$, $p<0,05$) (Figura 12B). Estes dados estão sumarizados no Anexo H.

Figura 12 - Efeito na redução da viabilidade celular pelo cetoconazol

A: Redução de forma concentração-dependente nas células α T3.1 nos períodos de incubação 6, 12 e 24h. **B:** Efeito inibitório do cetoconazol de forma concentração-dependente na redução da viabilidade nas células MMQ nos períodos de incubação 6, 12 e 24h.

*KTC= cetoconazol

4.2.3 Recuperação parcial da viabilidade celular após a retirada do cetoconazol nas linhagens tumorais hipofisárias AtT-20, GH3 e α T3.1

Com o objetivo de avaliar se o efeito inibitório do cetoconazol na proliferação celular era sustentado, avaliamos a viabilidade celular 48h da retirada do cetoconazol em diferentes concentrações (20 μ M, 40 μ M e 60 μ M), após as linhagens tumorais hipofisárias ficarem incubada por 6h, 12h e 24h. Na linhagem AtT-20, houve uma recuperação parcial da viabilidade celular (% do controle $\pm$ DP; p em relação às células tratadas com cetoconazol) após 48h da retirada do cetoconazol, sendo observado, principalmente, na concentração de 60 μ M (48h após 6h de incubação com cetoconazol: $44,9 \pm 12,3\%$, $p < 0,05$; 48h após 12h: $58,8 \pm 0,7\%$, $p < 0,001$; 48h após 24h: $21,3 \pm 3,4\%$, $p < 0,05$), seguido da concentração de 40 μ M (48h após 6h: $64,2 \pm 11,4\%$, $p < 0,05$; 48h após 12h: $78,4 \pm 18,5\%$, $p < 0,001$; 48h após 24h: $42,7 \pm 13,7\%$, $p = \text{NS}$), e menos evidente com 20 μ M (48h após 6h: $64,3 \pm 0,9\%$, $p = \text{NS}$; 48h após 12h: $94,9 \pm 0,0\%$, $p = \text{NS}$; 48h após 24h: $78,9 \pm 3,4\%$, $p < 0,05$) (Figura 13A).

Já na linhagem GH3, observamos uma recuperação parcial da viabilidade após 48h da retirada do cetoconazol do meio de cultura, principalmente nas concentrações do cetoconazol de 60 μ M (48h após 6h: $78,1 \pm 18,1\%$, $p < 0,001$; 48h após 12h: $64,6 \pm 16,4\%$, $p < 0,001$; 48h após 24h: $16,4 \pm 0,6\%$, $p = \text{NS}$) e 40 μ M (48h após 6h: $72,0 \pm 18,8\%$, $p < 0,001$; 48h após 12h: $57,6 \pm 8,8\%$, $p < 0,05$; 48h após 24h: $22,8 \pm 1,2\%$, $p < 0,001$), entretanto, houve uma menor recuperação da viabilidade celular com cetoconazol 20 μ M (6h: $89,2 \pm 1,9\%$, $p = \text{NS}$; 12h: $88,9 \pm 23,5\%$, $p = \text{NS}$; 24h: $59,5 \pm 11,0\%$, $p < 0,05$) (Figura 13B).

Figura 13 - Reversão parcial da viabilidade celular

A: Reversão 48h da retirada do cetoconazol do meio de cultura após as células ficarem incubadas por 6, 12 e 24h na linhagem AtT-20. **B:** Reversão parcial da viabilidade celular 48h da retirada do cetoconazol do meio de cultura após as células ficarem incubadas por 6, 12 e 24h na linhagem GH3.

Barra sólida: incubação com KTC; **Barra tracejada:** 48h da retirada do KTC após incubação por 6h, 12h e 24h; *KTC= cetoconazol

Também evidenciamos, na linhagem hipofisária gonadotrófica α T3.1, uma tendência de recuperação da viabilidade celular 48h da retirada do cetoconazol do meio de cultura em todas as concentrações estudadas, sendo este menos expressivo na concentração de 60 μ M (48h após 6h: $39,3 \pm 6,3\%$, $p=NS$; 48h após 12h: $47,3 \pm 11,5\%$, $p<0,05$; 48h após 24h: $9,5 \pm 3,1\%$, $p=NS$). Entretanto, nas concentrações de 20 μ M (48h após 6h: $99,9 \pm 15,7\%$, $p<0,05$; 48h após 12h: $97,1 \pm 14,9\%$, $p<0,05$; 48h após 24h: $121,9 \pm 9,9\%$, $p<0,001$) e 40 μ M (48h após 6h: $83,1 \pm 26,5\%$, $p<0,05$; 48h após 12h: $69,4 \pm 12,3\%$, $p<0,001$; 48h após 24h: $59,6 \pm 7,1\%$, $p<0,001$), houve recuperação significativa da viabilidade celular em relação às células incubadas com cetoconazol em todos os períodos de incubação estudados, conforme Figura 14. Estes dados estão sumarizados no Anexo I.

Figura 14 - Recuperação parcial da viabilidade celular após a retirada do cetoconazol do meio de cultura após as células ficarem incubadas 6, 12 e 24h nas células α T3.1

Barra sólida: incubação com KTC; **Barra tracejada:** 48h da retirada do KTC após incubação por 6h, 12h e 24h. *p<0.05 and **p<0.001 entre os dois grupos descritos. **KTC**=cetoconazol

4.3 O cetoconazol aumentou a expressão de genes relacionados à apoptose celular nas linhagens AtT-20, GH3, α T3.1 e MMQ

Conforme já esplanado, foi observada uma redução da viabilidade celular na presença do cetoconazol, de forma concentração-dependente, nas linhagens tumorais hipofisárias AtT-20, GH3, α T3.1 e MMQ.

Com objetivo de identificar um possível mecanismo de ação pelo qual o cetoconazol leva ao efeito inibitório na proliferação celular, analisamos a expressão dos genes relacionados à apoptose e reguladores do ciclo celular por meio do RT-qPCR na presença do cetoconazol 40 μ M, e também, 48h da sua retirada do meio de cultura, conforme já descrito nos materiais e métodos.

Na linhagem AtT-20, a expressão dos genes Bim ($0,39 \pm 0,22$ vs $-0,42 \pm 0,21$, $p < 0,001$), Bid ($0,73 \pm 0,16$ vs $-0,17 \pm 0,12$, $p < 0,001$), Casp9 ($0,83 \pm 0,27$ vs $-0,08 \pm 0,25$, $p < 0,05$) apresentaram uma expressão aumentada na presença do cetoconazol em relação após sua retirada do meio de cultura. Ademais, houve uma redução da expressão do gene p63 estatisticamente significativa na presença do cetoconazol ($-1,54 \pm 0,40$ vs $0,32 \pm 0,35$, $p < 0,05$), conforme descrição na Figura 15A. Não houve diferença estatisticamente significativa nos demais genes analisados entre os dois tempos estudados.

Na linhagem GH3, os genes Bnip2 ($0,46 \pm 0,20$ vs $-0,23 \pm 0,16$, $p < 0,05$), Casp6 ($1,84 \pm 0,15$ vs $0,66 \pm 0,17$, $p < 0,05$), Casp7 ($0,67 \pm 0,08$ vs $-0,26 \pm 0,16$, $p < 0,05$), Faf1 ($0,09 \pm 0,13$ vs $-0,35 \pm 0,07$, $p < 0,05$), Fas ($1,97 \pm 0,06$ vs $-0,52 \pm 0,32$, $p < 0,05$) apresentaram uma expressão estatisticamente aumentada quando incubadas com cetoconazol 40 μ M por 6h. Entretanto, houve redução sustentada da expressão do gene TNFR1a ($-0,12 \pm 0,14$ vs $-0,42 \pm 0,09$, $p < 0,05$), e do p73 ($-0,03 \pm 0,08$ vs $-0,52 \pm 0,18$, $p < 0,05$) na presença do cetoconazol que se manteve menor expresso após a retirada do cetoconazol. Já os genes Bnip3 ($0,33 \pm 0,29$ vs $0,81 \pm 0,15$, $p < 0,05$) e TNFR1b ($0,15 \pm 0,07$ vs $0,27 \pm 0,04$, $p < 0,05$) apresentaram maior expressão gênica após a retirada do cetoconazol do meio de cultura (Figura 15B). Não houve diferença estatisticamente significativa nos demais genes analisados entre os dois tempos estudados.

Já na linhagem α T3.1, os genes Bim ($1,46 \pm 0,46$ vs $-0,15 \pm 0,46$, $p < 0,05$), Bid ($1,27 \pm 0,10$ vs $0,12 \pm 0,22$, $p < 0,05$), Bnip1 ($0,71 \pm 0,18$ vs $-0,01 \pm 0,19$, $p < 0,05$), Casp12 ($0,97 \pm 0,55$ vs $-0,32 \pm 0,47$, $p < 0,05$), Faf1 ($0,98 \pm 0,19$ vs $-0,03 \pm 0,23$, $p < 0,05$), Fas ($1,28 \pm 0,50$ vs $-0,96 \pm 0,40$, $p < 0,05$),

Mki67 ($1,90 \pm 0,43$ vs $-1,05 \pm 0,16$, $p < 0,05$), TNF ($1,10 \pm 0,44$ vs $-0,77 \pm 0,35$, $p < 0,05$), TNFR1a ($1,36 \pm 0,29$ vs $-0,08 \pm 0,30$, $p < 0,05$), TNFR1b ($2,01 \pm 0,11$ vs $0,26 \pm 0,29$, $p < 0,05$) apresentaram uma expressão aumentada na presença do cetoconazol (Figura 15C).

Já na linhagem MMQ, na presença do cetoconazol, houve aumento da expressão dos genes Afaf1 ($1,40 \pm 0,00$ vs $-0,61 \pm 0,51$, $p < 0,05$), Bad ($2,40 \pm 0,80$ vs $-0,84 \pm 2,98$, $p < 0,05$), Bax ($2,75 \pm 0,59$ vs $0,40 \pm 1,04$, $p < 0,05$), Bim ($0,86 \pm 0,07$ vs $-0,56 \pm 0,88$, $p < 0,05$), Bnip2 ($0,98 \pm 0,66$ vs $-0,43 \pm 0,13$, $p < 0,05$), Casp 2 ($2,25 \pm 0,10$ vs $-0,14 \pm 1,35$, $p < 0,05$), Casp 3 ($1,63 \pm 0,06$ vs $-0,08 \pm 0,76$, $p < 0,05$) (Figura 15D). Não houve diferença estatística nos demais genes analisados.

Figura 15 - O cetoconazol aumenta a expressão de genes relacionados a apoptose

A incubação com cetoconazol aumentou a expressão de genes pró-apoptóticos como Bim, Bid, a caspase-9 nas células AtT-20 (Fig.15A); Bnip-2, Bnip-3, caspase-6, caspase-7, Faf1, e Fas nas células GH3 (Fig 15B); Bim, Bid, Bnip-1, caspase-12, Faf1, Fas, Mki67, Tnf, TNFR1a, e TNFR1b nas células αT3.1 (Fig15C); Afaf1, Bad, Bax, Bim, Bnip2, caspase-2 e caspase-3 nas células MMQ (Fig15D). Cada barra representa a média $\pm$ DP de três experimentos independentes (normalizados por quatro genes endógenos e células não tratadas). **Barras escuras:** Tratada com KTC; **barras claras:** 48h da retirada do KTC. * $p < 0,05$ and ** $p < 0,001$ entre os dois grupos descritos. KTC=cetoconazol

4.4 Cetoconazol aumentou a expressão de genes relacionados à inibição do ciclo celular nas linhagens GH3, α T3.1 e MMQ

Observamos, na linhagem GH3 (figura 16A), que os genes p21 ($0,52 \pm 0,04$ vs $-0,72 \pm 0,17$, $p < 0,001$) e o p27 ($1,85 \pm 0,70$ vs $0,09 \pm 0,56$, $p < 0,05$), assim como na linhagem α T3.1 (figura 16B), o gene p21 ($0,93 \pm 0,10$ vs $-0,22 \pm 0,09$, $p < 0,001$) e na linhagem MMQ (figura 16C), o gene do p27 ($1,70 \pm 0,20$ vs $-0,92 \pm 3,00$, $p < 0,05$) tiveram sua expressão gênica aumentada na presença de cetoconazol em relação após a retirada da medicação no meio de cultura.

Figura 16 - Cetoconazol aumentou a expressão dos genes do inibidores do ciclo celular

O cetoconazol aumentou a expressão do p21 e p27 nas células GH3 (Fig 16A), p21 nas células α T3.1 (Fig16B) e p27 nas células MMQ (Fig16C). Cada barra é a média $\pm$ DP de três experimentos independentes (normalizados por quatro genes endógenos e células não tratadas).

Barras escuras: Tratado com KTC; **Barras claras:** após retirada do KTC; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ entre os dois grupos descritos; **KTC**= cetoconazol

4.5 Cetoconazol reduziu a expressão de genes dos hormônios hipofisários nas linhagens GH3 e α T3.1.

Também observamos uma redução sustentada da expressão do gene prolactina ($-0,60 \pm 0,10$ vs $-2,29 \pm 0,10$, $p < 0,05$), entretanto, não evidenciamos uma diferença estatisticamente significativa no gene do GH na linhagem mamossomatotrófica GH3 ($p = 0,99$) (Figura 17A).

Ademais, houve uma redução também sustentada da expressão do gene da subunidade alfa ($-1,29 \pm 0,21$ vs $-0,42 \pm 0,31$, $p < 0,05$) na linhagem gonadotrófica α T3.1 nos tempos analisados (Figura 17B).

Porém, é importante ressaltar que não evidenciamos uma diferença estatisticamente significativa nos genes da POMC na linhagem corticotrófica AtT-20 ($p = 0,19$) e do gene da prolactina na linhagem mamotrófica MMQ ($p = 0,29$).

Figura 17 - O cetoconazol reduziu a expressão dos genes dos hormônios hipofisários

O cetoconazol reduziu a expressão do gene da prolactina nas células GH3 (Fig17A) e o gene da subunidade alfa nas células α T3.1 (Fig17B). Cada barra é a média $\pm$ DP de três experimentos independentes (normalizados por quatro genes endógenos e células não tratadas).

Barras escuras: tratadas com KTC; **barras claras:** após a retirada do KTC. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ entre os dois grupos descritos; **KTC**= cetoconazol.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O derivado imidazólico cetoconazol vem sendo utilizado no tratamento da doença de Cushing por reduzir os níveis de hipercortisolismo por meio, classicamente, da inibição de uma variedade de enzimas citocromo p450 pertencentes à esteroigênese adrenal.⁹

A sensibilidade para redução da produção hormonal *in vitro* pelo cetoconazol é bastante distinta nos diferentes tecidos, visto que o bloqueio da síntese de cortisol pela adrenal, assim como dos esteroides sexuais pelas gônadas, necessitam de concentrações menores da medicação (1 μ M)^{16,51}, enquanto que somente a incubação com concentrações maiores do cetoconazol (10 a 50 μ M) reduziu a secreção do ACTH pelas células adenohipofisárias, mais evidente após estímulo com CRH.^{21,22}

Em adição ao efeito antiesteroideogênico adrenal e gonadal, o cetoconazol pode apresentar, também, uma ação extra-adrenal, por competir com a dexametasona pelo receptor de glicocorticoide em diversos órgãos, sendo esta ação dose dependente, competitiva por natureza, e com atividade puramente antagonista do glicocorticoide.⁵²

5.1 A incubação com cetoconazol reduziu a viabilidade celular nas linhagens hipofisárias, sendo esta inibição parcialmente revertida após a retirada do cetoconazol do meio de cultura

Na década de 90, *Drouhault et al.*²⁵ evidenciaram que o cetoconazol causava um efeito citotóxico nas células mamossomatotróficas GH3/B6, com uma redução de, aproximadamente, 50% do crescimento celular, o qual foi condizente com nosso estudo, em que se observou uma redução da viabilidade celular, de forma concentração-dependente, pelo cetoconazol nas linhagens tumorais hipofisárias corticotróficas, mamossomatotróficas e gonadotróficas, e menos evidente na mamotrófica.

Um fato intrigante encontrado no nosso estudo foi uma menor atividade antiproliferativa pelo cetoconazol na linhagem tumoral hipofisária produtora de PRL (células MMQ), o qual pode ser explicado por estudos clínicos e experimentais prévios, em que a PRL esteve envolvida na diferenciação e proliferação de numerosos tecidos, incluindo mama e próstata⁵³⁻⁵⁵. A regulação autócrina e parácrina no *turnover* das células hipofisárias pelos hormônios hipofisários é ainda pouco compreendida, no entanto, apesar de controverso^{56,57}, existem evidências que a PRL pode exercer uma ação trófica, com uma atividade de fator de crescimento de forma autócrina, nas células adenohipofisárias^{58,59}.

O cetoconazol, apesar de ser um antifúngico de amplo espectro⁷, tem evidenciado um potencial antiproliferativo não somente em linhagens tumorais hipofisárias, como também já foi descrito um efeito de redução da viabilidade celular *in vitro*, de forma concentração-dependente, em células tumorais hepáticas, colônicas e ósseas.^{28,29}

Considerando estudos prévios^{48,49} de farmacocinética e farmacodinâmica do cetoconazol, a concentração máxima utilizada nos nossos experimentos (60µM), na qual teve um maior efeito antiproliferativo, seria equivalente à concentração sérica da dose máxima oral preconizada nos estudos clínicos de 1200 mg/dia de cetoconazol.

Logo, se por um lado, há evidências, na literatura¹⁰, do aparecimento do adenoma hipofisário na RNM de sela túrcica em pacientes portadores de DC diante do uso de dose baixa do cetoconazol no seguimento clínico, por outro lado, foi relatado, recentemente, em um paciente portador de DC⁶⁰, o desaparecimento do macroadenoma hipofisário após o uso de dose elevada de cetoconazol (1200 mg/dia) associado a uma dose baixa de cabergolina (1,0 mg/semana), agonista dopaminérgico, classicamente utilizado no tratamento dos prolactinomas, mas com evidências clínicas no tratamento dos adenomas produtores de ACTH.^{4,5}

Outros estudos sugerem uma associação sinérgica da cabergolina com cetoconazol no controle do hipercortisolismo em pacientes portadores de DC. Vilar L *et al.*⁶¹ observaram uma redução significativa dos níveis de

cortisol urinário de 24h, em pacientes portadores de DC mal controlados com cabergolina em monoterapia (dose média de $2,5 \pm 0,5$ mg/semana), após a associação com baixas doses de cetoconazol (dose média de $325 \pm 103,5$ mg/dia).

Em outro estudo, a associação de baixas doses de cetoconazol induziu uma remissão bioquímica em cerca de 80% dos pacientes portadores de DC, que não foram controlados previamente pela combinação de cabergolina e pasireotide, sendo este um análogo de somatostatina que se liga com alta afinidade aos receptores de somatostatina- SSTR 1, 2 e 3, e principalmente, ao tipo 5)⁶².

Em adição, o tratamento pré-operatório com cetoconazol em pacientes portadores de DC parece estar associada a um aumento da taxa de remissão da doença a longo prazo, o qual, segundo os autores, seria devido a redução do cortisol pré-operatório, que poderia ativar as células corticotróficas adormecidas, culminando com o eucortisolismo mais precoce⁶³.

Baseado nestes dados apresentados, especulamos, então, que doses mais elevadas de cetoconazol (1200 mg/dia) poderiam ter uma ação em nível hipofisário, culminando com uma redução tumoral, o qual é apoiado pelos nossos dados *in vitro*, enquanto doses baixas de cetoconazol (200-400 mg/dia) poderiam não apresentar um efeito antiproliferativo na hipófise, mas sim de redução da secreção de ACTH, justificando, então, uma ação sinérgica com medicações que, sabidamente, tem uma ação sobre o adenoma hipofisário, como a cabergolina e o pasireotide.

Sabe-se que um importante limitante para uso clínico do cetoconazol em pacientes portadores da DC são os efeitos adversos, incluindo náuseas, dispepsia, *rash* e hipogonadismo (devido à inibição enzimática da síntese dos esteroides sexuais). A hepatotoxicidade com elevação reversível das transaminases pode ocorrer, e não requer descontinuação da medicação, exceto em quadros severos, progressivos e sintomáticos^{5,17,64}. A hepatotoxicidade não é dose-dependente, mas pode ocorrer no início do tratamento ou após a mudança brusca da dose, logo, é recomendado que a

função e enzimas hepáticas sejam cuidadosamente monitorados nos pacientes em terapia com cetoconazol.¹⁷

Castinetti *et al.*¹⁷ observaram uma elevação das enzimas hepáticas (maior que 5x) em cerca de 15% dos pacientes tratados com cetoconazol, porém não houve diferença na dose da medicação naqueles que apresentaram (765 ± 293 mg/dia) alteração das enzimas hepáticas, daqueles que não apresentaram (716 ± 268 mg/d, $p=0,491$) esta alteração, embora é sabido que o uso de doses elevadas de cetoconazol, principalmente no início do tratamento, induza a um maior risco de complicações, especialmente gastrointestinais e hepáticas⁶⁵.

O mecanismo da hepatotoxicidade do cetoconazol permanece desconhecido, porém, em estudos *in vitro*, a incubação de hepatócitos com cetoconazol levou a uma redução da viabilidade celular, de forma concentração e tempo-dependentes.²⁶ Portanto, a lesão hepática parece estar relacionada a um efeito antiproliferativo induzido pelo cetoconazol.

O controle bioquímico em pacientes portadores de DC pelo cetoconazol é reversível após a descontinuação da medicação⁹, portanto, no presente estudo, questionamos se o efeito *in vitro* da inibição da proliferação celular pelo cetoconazol nas linhagens hipofisárias estudadas era sustentado após sua retirada do meio de cultura.

Nossos resultados demonstraram uma tendência a uma melhora parcial do crescimento celular após a retirada do cetoconazol em todas as linhagens hipofisárias, entretanto, não atingindo a taxa de proliferação semelhante ao do controle (células não tratadas) no tempo máximo estudado (48h).

É possível que um período maior de análise após a retirada do cetoconazol pudesse nos fornecer a informação do tempo necessário para que o crescimento celular fosse restabelecido (semelhante ao controle), principalmente após a exposição a concentrações menores da medicação, em que a injúria foi menor.

Corroborando com esta especulação, Ren *et al.*⁶⁶ evidenciaram que, após uma injúria celular causada pela piridoxina (vitamina B6) em linhagens

tumorais hipofisárias, estas células restabeleceram seu crescimento, semelhante ao controle, somente após 3 a 6 dias da retirada deste composto do meio de cultura, quando expostas a menores concentrações da medicação, e, em até 11 dias, quando expostas a maiores concentrações.

Entretanto, no presente estudo, quando avaliamos a viabilidade celular nas placas de 96 poços após o período de 48h da retirada do cetoconazol do meio de cultura, houve morte celular até mesmo do controle (células não tratadas), o que atribuímos ao limite de espaço físico para o crescimento celular. Diante do observado, optamos por não estender o tempo de observação além de 48h.

A habilidade do cetoconazol em inibir a viabilidade celular nas células hipofisárias, de forma concentração-dependente, e o fato da proliferação celular ser parcialmente restaurada após retirada do cetoconazol do meio de cultura, principalmente na maior concentração (60µM), sugere que o cetoconazol não tenha um efeito tóxico idiossincrásico, ou seja, um efeito independente de dose nas células hipofisárias.

Portanto, o entendimento do possível mecanismo de ação *in vitro* do cetoconazol torna-se necessário para sua possível utilização no controle, não só hormonal, mas, também, no crescimento tumoral dos adenomas hipofisários.

5.2 O cetoconazol aumenta a expressão de genes relacionados à apoptose nas linhagens tumorais hipofisárias

A resistência adquirida à apoptose é uma característica comum em diversos tipos de neoplasias. Muitas células neoplásicas podem adquirir resistência à apoptose por meio da estimulação ou hiperativação de proteínas antiapoptóticas, e também por inibição ou mutação de proteínas pró-apoptóticas. Portanto, o estímulo das vias de apoptose torna-se um alvo atraente para tratamento de diversos tumores.³⁰

Os adenomas hipofisários são neoplasias benignas com baixa taxa de proliferação, e, assim como as mitoses, as células em apoptose estão

ausentes ou são difíceis de serem identificadas nas colorações histoquímicas de rotina⁶⁷.

Poucos estudos foram realizados sobre a regulação das vias de apoptose nos adenomas hipofisários. *Kontogeorgos et al.*⁶⁷ evidenciaram um alto índice de apoptose nos adenomas agressivos, atípicos e resistentes ao tratamento medicamentoso. Apesar de controverso, o autor conclui que a presença de um índice apoptótico elevado seria um marcador preditivo de um comportamento agressivo dos adenomas hipofisários.

A expressão do p53 tem um papel importante na biologia do tumor. Apesar de não ter sido identificada mutação deste gene nos adenomas de hipófise, sua expressão nuclear por imuno-histoquímica é mais extensa nos carcinomas, e raramente observada nos adenomas hipofisários.²

Os adenomas, em geral, têm baixo índice mitótico e índice de Ki-67 menor que 3%. A expressão difusa do p53 e um índice de ki-67 maior que 3% sugere um comportamento agressivo e a denominação “adenoma atípico” pode ser usada quando tais marcadores estão presentes, e quando não há comemorativos de carcinoma (metástase ou disseminação liquórica).²

O desbalanço entre membros antiapoptóticos (ex.: redução da Bcl-2) e pró-apoptóticos (ex.: aumento da Bax) da família das bcl-2 já foi descrito em adenomas hipofisários funcionantes e não funcionantes, sugerindo que uma alteração na regulação dos mecanismos de apoptose poderia estar implicado na patogênese dos tumores hipofisários⁶⁸.

No presente estudo, após a incubação com cetoconazol, observou-se um aumento significativo da expressão de genes pró-apoptóticos em todas as linhagens tumorais hipofisárias estudadas, com uma redução significativa da expressão destes genes após a retirada do cetoconazol do meio de cultura.

Nossos dados sugerem que o estímulo apoptótico do cetoconazol nas linhagens tumorais hipofisárias AtT-20, GH3 e α T3.1 seja através predominantemente da ativação da via extrínseca da apoptose, pois observamos um aumento da expressão dos receptores de morte celular Fas

e do Fas 1 (membro do complexo fas-DISC)⁶⁹, e do TNFR nas linhagens hipofisárias GH3 e α T3.1, respectivamente (Figura 15).

Embora na linhagem AtT-20 não observamos o aumento da expressão dos receptores de morte Fas e/ou TNFR, evidenciamos um aumento da expressão gênica do Bid, o que representa uma ativação da via extrínseca da apoptose, pois sua ativação ocorre indiretamente após ativação dos receptores de morte celular (Figura 18).³⁶

Diferentemente, na linhagem MMQ, parece haver uma ativação predominante da via intrínseca da apoptose, devido ao aumento da expressão dos genes pró-apoptóticos pertencentes à família da Bcl-2 (Bax, Bad e Bim), os quais levam a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, deste modo, promovendo a liberação de proteínas pró-apoptóticas (ex.: citocromo c) do espaço intermitocondrial da membrana³³, conforme ilustrado na Figura 18.

Figura 18 - Ativação da via intrínseca e extrínseca da apoptose pelo cetoconazol nas linhagens tumorais hipofisárias

O cetoconazol aumentou a expressão dos receptores de morte celular (fas/TNFR) que, por meio da caspase 8, ativará o Bid estimulando a mitocôndria a liberar fatores pró-apoptóticos, como citocromo c, promovendo a apoptose nas linhagens AtT-20, GH3 e α T3.1. Na linhagem MMQ, houve um aumento predominante dos genes relacionados à via intrínseca de apoptose (Bad, Bim e Bax). Adaptado de Guzzo *et al.*³⁸

Embora a ativação mitocondrial seja o principal mecanismo de continuação da apoptose, encontramos, na linhagem tumoral gonadotrófica α T3.1, uma participação do estresse do retículo endoplasmático (RE) na progressão da morte celular, pois evidenciamos um aumento da expressão da caspase-12, a qual estimula a liberação do citocromo c pela mitocôndria, resultando numa dramática ativação das caspases, e, finalmente, na morte celular⁷⁰.

Nosso estudo também demonstrou que a apoptose induzida pelo cetoconazol nas células hipofisárias parece ser independente da família do p53, pois observamos uma redução da expressão gênica do p63 (na linhagem AtT-20), e do p73 (na linhagem GH3), sendo que a expressão do p53 se manteve estável na presença do cetoconazol (em relação após a retirada do cetoconazol) em todas as linhagens hipofisárias estudadas (MMQ, $p=0,09$; GH3, $p=0,52$; AtT-20, $p=0,9$; α T3.1, $p=0,12$; Cetoconazol 40 μ M por 6h vs 48h após a retirada do cetoconazol do meio de cultura).

Por outro lado, *Ho et al.*²⁸ demonstraram que, em linhagens tumorais de fígado e cólon humanas, e hepáticas normais de rato, a indução da apoptose pelo cetoconazol foi relacionada à presença do p53 selvagem, pois genes regulados pelo p53 (como o bax e bcl-2) estavam alterados (aumentados na bax e reduzidos no bcl-2) após a exposição ao cetoconazol.

Medicações classicamente utilizadas no manejo dos adenomas hipofisários produtores de PRL e GH, os agonistas dopaminérgicos (AD, ex.: cabergolina) e análogos de somatostatina (AS, ex.: octreotide), respectivamente, apresentam, em geral, uma significativa resposta clínica, com um bom controle hormonal e/ou redução do volume tumoral.⁴

Estudos *in vitro* apresentaram resultados duvidosos³⁸ se o efeito antiproliferativo causado pelos AD e AS seria por indução de apoptose celular nos adenomas hipofisários.

Ferrante *et al.*⁷¹ evidenciaram que o octreotide induziu apoptose em células de tumor somatotrófico humano, com envolvimento do SSTR-2 neste processo, no entanto, Casarini *et al.*⁷² descreveram que a redução tumoral por estímulo de apoptose estaria relacionada à ativação do SSTR-3

nestes tumores. Por outro lado, Losa *et al.*⁷³ observaram não haver diferença no índice apoptótico entre somatotropinomas tratados com octreotide em relação aos não tratados.

Os AD, principais inibidores da função do lactotrofo, cuja interação com receptor D2 não apenas inibe secreção de prolactina, a expressão do gene da prolactina e a proliferação do lactotrofo, mas também induziu apoptose nestas células, de maneira estrogênio-dependente^{56,74}. No entanto, Stefanescu L *et al.*⁷⁵ evidenciaram que, em prolactinomas tratados com AD, o índice apoptótico não diferiu daqueles não tratados.

5.3 O cetoconazol aumenta a expressão gênica de inibidores do ciclo celular nas linhagens hipofisárias

A perda da regulação na transição das fases G1/S parece ser um evento comum em diversos tipos de neoplasias humanas, incluindo adenomas hipofisários, visto que algumas alterações moleculares relacionadas à regulação do ciclo celular já foram identificadas, como a hiperexpressão do gene da ciclina D, mutações no gene do CDK4, redução da expressão proteica do retinoblastoma, e redução da expressão dos CDKI p16 e p27.⁴¹

O gene do p27, pertencente à família dos CDKI, regula a progressão do ciclo celular, da fase G1 para fase S. Os níveis da proteína p27 de muitas neoplasias malignas estão expressas em menor quantidade que o tecido normal, sugerindo que o p27 possa atuar como supressor e ter um significado prognóstico⁷⁶.

Achados em tecido hipofisário sugerem que uma hipoexpressão do p27 é encontrada em adenomas recorrentes e invasivos, e em carcinomas hipofisários. Entretanto, a baixa taxa de proliferação encontrada na grande maioria dos adenomas hipofisários estreita a utilização da proteína p27 como marcador preditivo⁶⁷.

Diante do efeito antiproliferativo do cetoconazol nas células tumorais hipofisárias GH3/B6 evidenciado na década de 90, foi proposto uma possível ação do cetoconazol no bloqueio do ciclo celular²⁵, porém esta hipótese não havia sido comprovada.

No presente estudo, de forma original, além do aumento da expressão gênica de membros das vias extrínseca e intrínseca da apoptose pelo cetoconazol, demonstrou-se, também, um provável efeito citostático, isto é, de inibição do crescimento celular, pois observamos um aumento da expressão gênica dos CDKI p21 (nas linhagens GH3 e α T3.1) e p27 (nas linhagens GH3 e MMQ), com uma redução significativa da expressão destes genes após retirada do cetoconazol do meio de cultura.

Outras medicações já utilizadas no tratamento dos adenomas hipofisários parecem inibir a progressão do ciclo celular, como os análogos do receptor SSTR2, que demonstraram aumentar a expressão do p21 e p27, via ativação da proteína quinase ativadora da mitose (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK), em somatotropinomas^{77,78}.

Entretanto, em prolactinomas tratados com AD, a expressão do p27 foi menor que a expressão encontrada nos adenomas não tratados, logo, aparentemente, o p27 não parece ter um papel na redução da proliferação celular mediada pelos AD⁷⁵.

Outras substâncias vêm sendo pesquisadas com atividade promissora no bloqueio do ciclo celular nos adenomas hipofisários. A curcumina, um produto natural bifenólico também conhecido com “curry” indiano, reduziu a expressão da ciclina D e CDK4 em células GH3 e células foliculoestelares hipofisárias^{79,80}.

Paradoxalmente, no nosso estudo, observamos, também, um aumento da expressão gênica do Ki67 na linhagem α T3.1, um importante marcador de proliferação celular⁶⁷, na presença do cetoconazol. Embora este aumento seja divergente ao esperado diante da redução da proliferação celular encontrada, existem evidências de que este achado não deve ser valorizado.⁸¹

Van Oijen *et al.*⁸¹ demonstraram que as células de osteossarcomas humanas mantinham a positividade para o ki67, mesmo diante do bloqueio do ciclo celular pelo p21, e alertam que nem todas as células que expressam o Ki67 estão com a proliferação celular em atividade, no entanto estas células detêm o potencial de retomar sua proliferação após cessar o bloqueio sobre o ciclo celular. Os autores reforçam ainda que não deve ser utilizado o Ki67 como marcador de proliferação em células que hiperexpressam o p21.

O papel do cetoconazol no aumento da expressão dos inibidores do ciclo celular nas linhagens hipofisárias GH3, α T3.1 e MMQ está ilustrado na Figura 19.

Figura 19 - Ação do cetoconazol no aumento da expressão dos inibidores do ciclo celular p21 e p27, levando a um possível efeito citostático nas linhagens hipofisárias tumorais produtoras de GH, prolactina e subunidade alfa. Adaptado de Musat *et al.*⁴¹

5.4 O cetoconazol reduz a expressão gênica dos hormônios hipofisários nas linhagens hipofisárias.

O cetoconazol reduziu a expressão gênica da PRL na linhagem mamossomatotrófica GH3, a qual foi sustentada após a retirada da medicação do meio de cultura, sugerindo um bloqueio persistente na produção deste hormônio. Entretanto, a expressão do gene do GH se manteve estável nestas células. Corroborando com nossos dados, foi observado previamente que o cetoconazol reduziu a secreção *in vitro* de PRL, tanto basal quanto após estímulo com TRH, mas não afetou a secreção de GH em células GH3²⁵. Uma hipótese para tal fenômeno foi justificada pelos autores que seria devido a uma alteração no metabolismo do ácido aracdônico na membrana plasmática destas células causada pelo cetoconazol.

No presente estudo, observamos também que a expressão da POMC na linhagem corticotrófica AtT-20 não sofreu alteração na presença do cetoconazol. Em contrapartida, Stalla *et al.*²² demonstraram uma redução da expressão da POMC pelo cetoconazol, o qual foi mais evidente após o estímulo pelo CRH, sugerindo que este derivado imidazólico induziu uma inibição direta do componente catalítico da adenilato ciclase.

Em adição, a expressão de Cga na linhagem tumoral gonadotrófica α T3.1 reduziu de forma expressiva com a exposição ao cetoconazol, que foi sustentada após retirada da medicação do meio de cultura.

Especulamos, então, que é possível que, com a análise da expressão gênica após maiores períodos de incubação, como 12h e/ou 24h, ou mesmo a utilização do estímulo com hormônios hipotalâmicos (como CRH ou TRH), poderíamos encontrar uma redução da expressão gênica dos hormônios hipofisários (como POMC na AtT-20 e PRL na MMQ), e, até mesmo, aumento da expressão de outros genes pró-apoptóticos ou inibidores do ciclo celular. Validando esta hipótese, Stalla *et al.*²¹ demonstraram uma redução da expressão do RNAm da POMC nas células corticotróficas, estimuladas ou não pelo CRH, somente quando o tempo de incubação com cetoconazol foi prorrogado para 24h.

Apesar do racional do estudo ter sido baseado em dados controversos clínicos e experimentais da ação do cetoconazol em células hipofisárias corticotróficas, pudemos observar um efeito mais significativo, com aumento da expressão de genes pró-apoptóticos de forma mais extensa, em outras linhagens hipofisárias, destacando-se a linhagem gonadotrófica α T3.1.

Além disso, a ação combinada do cetoconazol no aumento da expressão de genes pró-apoptóticos (efeito citotóxico), assim como dos genes relacionados ao bloqueio da progressão do ciclo celular (efeito citostático) nas linhagens tumorais hipofisárias imortalizadas, podem justificar a redução da proliferação celular vista nos ensaios de viabilidade do nosso estudo, tornando o cetoconazol uma droga promissora no controle do volume tumoral em adenomas hipofisários.

Todavia, uma possível limitação do nosso estudo foi não ter utilizado modelos humanos, como cultura primária de adenoma de hipófise funcionante ou não funcionante. No entanto, tentamos estabelecer em nosso laboratório métodos para cultura primária de tecido tumoral hipofisário, porém estas células deixaram de secretar hormônios após 8 semanas em meio de cultura. Assim, não temos um modelo apropriado *in vivo* para sustentar a relevância clínica dos achados encontrados nas linhagens hipofisárias imortalizadas.

Portanto, o emprego do cetoconazol pode ser uma estratégia clínica promissora no controle essencialmente do volume tumoral, e, secundariamente, hormonal, dos adenomas hipofisários funcionantes, e também, dos não funcionantes (gonadotropinomas silenciosos).

Além disso, estudos de farmacocinética e farmacodinâmica que avaliem o efeito do cetoconazol em concentrações séricas mais elevadas são necessários, porém o risco de efeitos adversos, como a hepatotoxicidade, seria um possível fator limitante.

Portanto, o conhecimento adquirido sobre os efeitos e mecanismos de ação do cetoconazol, como o aumento da expressão de genes pró-apoptóticos e inibidores da progressão do ciclo celular em células tumorais hipofisárias, pode contribuir para o desenvolvimento de novas medicações,

idealmente com menos efeitos colaterais, para o tratamento medicamentoso de pacientes portadores dos adenomas hipofisários funcionantes ou não-funcionantes.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O presente estudo se propôs a estudar o efeito do cetoconazol na viabilidade celular, e seu mecanismo de ação por meio da análise por RT-qPCR de genes relacionados à apoptose e a reguladores do ciclo celular nas células tumorais hipofisárias imortalizadas, e concluímos que:

- O cetoconazol reduziu a proliferação celular, de forma concentração-dependente, nas quatro linhagens tumorais hipofisárias estudadas;
- O efeito inibitório do cetoconazol foi parcialmente revertido após sua retirada do meio de cultura no período de tempo analisado;
- O cetoconazol aumentou a expressão de genes pró-apoptóticos, pertencentes às vias intrínseca e extrínseca da apoptose, independente do p53, nas quatro linhagens hipofisárias tumorais estudadas;
- O cetoconazol aumentou a expressão dos genes inibidores da progressão do ciclo celular (p21 e/ou p27) nas linhagens mamossomatotrófica, gonadotrófica e mamotrófica.

7 ANEXOS

ANEXO A – Artigo de apoptose celular e hipófise

Pituitary
DOI 10.1007/s11102-013-0481-5

Apoptosis: its role in pituitary development and neoplastic pituitary tissue

M. F. Guzzo · L. R. S. Carvalho · M. D. Bronstein

© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Apoptosis, also known as programmed cell death, is a phenomenon in which different stimuli trigger cellular mechanisms that culminate in death, in the absence of inflammatory cell response. Two different activation pathways are known, the intrinsic pathway (or mitochondrial) and extrinsic (or death-receptor pathway), both pathways trigger enzymatic reactions that lead cells to break up and be phagocytized by neighboring cells. This process is a common occurrence in physiological and pathological states, participating in the control of cell proliferation, differentiation and remodeling of organs. In the early steps of pituitary gland formation, numerous apoptotic cells are detected in the separation of Rathke's pouch from the roof of oral ectoderm. In the distal part of the gland, which will form the adenohypophysis, the ratio of apoptosis was significantly lower. However, there is evidence that neoplastic pituitary cells undergo unbalance in genes that control apoptosis leading to uncontrolled cell growth. No direct evidence of apoptosis was found in the drugs used for tumors producing prolactin and growth hormone. In conclusion, an unbalancing in the apoptosis process is the boundary between development and tumor growth.

Keywords Apoptosis · Pituitary gland · Caspase · Cell death

Introduction

Programmed cell death, named apoptosis, is an essential part of life for multicellular organisms that plays an important role in development and in tissue homeostasis. During development, many cells are produced in excess which eventually undergo programmed cell death and thereby contribute to sculpturing the organs and tissues. Apoptosis is highly regulated and balanced in a physiological states and failure in this regulation results in many pathological conditions such as developmental defects, autoimmune diseases, neurodegenerative disorders and cancer [1].

Apoptotic features include cell membrane blebbing, cell shrinkage, chromatin condensation and DNA fragmentation and finally ending with the engulfment by macrophages or neighboring cells, but avoiding an inflammatory response [1]. Important efforts have been made to explore the molecular mechanisms of apoptotic signaling pathways including initiation, mediation, execution, and regulation of apoptosis [1].

Molecular mechanisms of apoptosis

Caspases are the main protein family effectors of apoptosis. They are activated by different mechanisms that can be subdivided into two major categories: stimuli that act on membrane receptors (death receptor-mediated) or extrinsic pathway; and endogenous stimuli generated after different insults inside the cells, which mitochondria is a central regulator or intrinsic pathway (mitochondrial) [2].

M. F. Guzzo · L. R. S. Carvalho · M. D. Bronstein
Neuroendocrine Unit, Division of Endocrinology and Metabolism, Hospital das Clínicas, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

M. D. Bronstein (✉)
Av. Dr. Eneas de Carvalho, 255, 7º andar, sala 7037, Instituto Central, Cerqueira Cesar, São Paulo CEP 05403-000, Brazil
e-mail: mdbronstein@uol.com.br

Published online: 20 March 2013

Springer

Extrinsic pathway

The extrinsic pathway is activated by ligand-bound death receptor including mainly TNF-TNFR1, FasL-Fas, TRAIL-DR4 or-DR5 [1].

Specific ligand binding to the TNF-r complex induces a trimerization and consequent activation of specific death receptors. The downstream cascade is activated by the cytoplasmic tail that contains the “death domain”, which have the ability to recruit caspase-8 and activate caspase-3, leading to apoptosis (Fig. 1) [3].

Intrinsic pathway

This pathway is initiated by intra or extracellular factors, such as deprivation of growth factors, DNA damage, hypoxia or oxidative stress [3]. Bcl-2 family members mediate and control outer membrane permeabilization in the mitochondrial pathway [1].

Released cytochrome c from mitochondria to cytoplasm initiates caspases cascade. Cytosolic cytochrome c binds to apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) and pro-caspase-9, generating an intracellular complex known as “apoptosome”, then caspase-9 is activated, leading to processing of caspase-3 (Fig. 1) [3].

The two pathway of apoptosis, the extrinsic/death-receptor pathway and intrinsic/mitochondrial pathway, converge on caspases 3, which is the key effector caspase in apoptotic process, and subsequently on other proteases

and nucleases that drive the terminal events of programmed cell death [1, 2].

Bcl-2 family

The balance between the pro and anti-apoptotic Bcl-2 family members controls the mitochondrial pathway. They all contain at least one of four relative conserved Bcl-2 homology (BH) domains [1].

Bcl-2, which was originally identified as a chromosomal translocation t [14, 18] in follicular lymphoma B cell, inhibits apoptosis induced by hormones and cytokines, and thus prolongs cell survival [2, 4].

Anti-apoptotic Bcl-2 family members, including Bcl-2 and four relatives (Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1) promote cell survival [2].

Another two groups of pro-apoptotic members instead elicit cell death. The “multi-BH domain” Bax, Bak and Bok share three homologous domains with Bcl-2 [2]. Bcl-2/Bax ratio represents a cell death switch, which predetermines cell life or death response to an apoptotic stimulus [4].

Other pro-apoptotic proteins, such as Bid, Bad and Bim, has posses only Bcl-2 homologous domain 3 (BH3-only proteins). These proteins binds and inhibits anti-apoptotic Bcl-2 family-members, thereby releasing pro-apoptotic protein Bax and Bak, which appear to permeabilize the outer mitochondrial membrane, allowing efflux of apoptogenic proteins (Fig. 2) [1].

Fig. 1 The two pathways of apoptosis: the extrinsic/death-receptor pathway and intrinsic/mitochondrial pathway, converging on caspase-3, which subsequently end in the terminal events of programmed cell death

Pituitary

In response to DNA damage, p53 not only stimulates intrinsic apoptotic molecules such as Bax (Fig. 1), in order to enable mitochondrial pathway of apoptosis, but also stimulates genes involved in the extrinsic pathway of apoptosis, such as Fas [1].

Apoptosis role during pituitary development

The role of apoptosis and also genes involved during development of different organs in human embryo has been studied by several authors [5].

During the early stages of pituitary gland development, numerous apoptotic cells were detected in the region of the separation of Rathke's pouch from the primitive oral cavity. In the distal part of the gland, which will give rise to the adenohypophysis, the ratio of apoptosis was significantly lower. Thus, change in this clearly temporally defined apoptotic process could be associated with persistence of the remnant of Rathke's pouch or craniopharyngeal duct and their possible neoplastic transformation [5].

Several transcription factors act time-space in pituitary embryogenesis to promote the anterior pituitary determination and five cell line differentiation producing GH, LH, FSH, PRL, ACTH and TSH. Mutations in *PROP1*, *POU1F1* (*PIT1*), *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *GLI2*, *SOX2* and *SOX3* can lead to hypopituitarism in humans [6].

The dwarf mouse model Ames (*Prop1^{df/df}*) harbour a mutation in the transcription factor *PROP1* and its phenotype is characterized by multiple hormone deficiency, but ACTH. The analysis of pituitary primordium from *Prop1^{df/df}* mutants during embryonic and postnatal periods reveal

substantial hypoplasia and pituitary dysmorphology, which involves both reduced proliferation and increased apoptosis during the postnatal development, which results in a pituitary growth failure [7].

The dwarf mouse model Snell (*Pit1^{dw/dw}*), harbour a mutation in the factor *PIT1* and they lack GH, PRL and TSH and exhibit adult pituitary hypoplasia. The mutant *Pit1^{dw}* pituitary size at birth is similar to the wild type. For both mutants *Prop1^{df/df}* and *Pit1^{dw/dw}* pituitary hypoplasia becomes apparent around 2 week of age. The *Pit1^{dw/dw}* pituitaries showed a slight increase in apoptosis at P1, relative to the normal littermate, but the difference was not as profound as observed for *Prop1* mutants [8].

The inadequate vascularization and/or the failure of the cell migration to the anterior lobe in order to differentiate may contribute to the enhanced apoptosis in the *Prop1^{df/df}* pituitaries [8].

Apoptosis role in pituitary adenomas

Pituitary adenomas are common benign neoplasm accounting about 15 % of intracranial tumors and although they are usually benign, they can cause significant morbidity due to their critical location, size, and/or inappropriate hormonal secretion [9].

The genesis of pituitary adenomas is believed to be involved in cell transformation due to genetic mutations, followed by central, peripheral, and local signals that induce cell proliferation, thus stimulating tumor progression. Whereas cell harboring genetic alterations should be physiologically eliminated by apoptosis, defects in this process of cell death may play an important role in the tumoral genesis and growth [10].

Apoptosis and mitoses are both faces in the same coin. They are adverse and asynchronous events, maintaining the optical cell numbers, and thus, providing appropriate tissue homeostasis in physiologic conditions. Conceptually, in neoplastic conditions, the balance between mitoses and apoptosis is switched in favor of mitoses. Therefore, introduction of drugs reversing this process by inhibiting DNA synthesis and promoting apoptosis can control tumor growth [11].

Pituitary adenomas are neoplasms with low proliferation rate, and thus, like mitoses, apoptotic cells are absent or difficult to identify in routine stains [11].

The apoptotic events include cell shrinkage, loss of attachments with adjacent cells, margination of nuclear chromatin, and chromatin clumping leading to apoptotic body formation and, finally, activation of phagocytosis by professional cells such as folliculostellate cells [11].

In a pituitary corticotroph adenoma, the apoptotic cells represented approximately 2 % of adenoma cell population.

Fig. 2 Bcl-2 family: Pro-apoptotic and anti-apoptotic members. The ratio between them represents a cell death switch, which predetermines cell life or death response to an apoptotic stimulus. Dashed line negative effect, solid line positive effect

In electron microscopy, they showed an ovoid nuclei containing small to moderately developed nucleolus, whereas the Golgi complex were often prominent and rugous endoplasmic reticulum (RER) moderately developed [12].

Few studies have investigated apoptosis in pituitary adenomas, in experimental animals, in ACTH producing rat pituitary cell lines and in human pituitaries. According to *Kontogeorgos* [11], a significantly higher rate of apoptosis in functioning compared with nonfunctioning tumors was found. Higher apoptosis index was also found in microadenomas, particularly corticotrope adenomas, and in untreated adenomas, particularly prolactinomas.

High apoptotic activity was also observed in aggressive, atypical and drug resistant adenomas. Therefore, the presence of high apoptotic activity can be considered as a predictive marker of more aggressive behavior [13].

The protein Bcl-2 is expressed abnormally in approximately one-third of pituitary adenomas, which may suggests some contribution to the pathogenesis and/or tumor proliferation [4].

In 81 pituitary adenomas studied [4], 60 functioning and 21 clinically nonfunctioning, the Bcl-2 protein was expressed (immunocytochemistry) in 53.5 and 71.5 % respectively ($p = 0.026$), whereas Bax protein was detected in all functional tumors and 86 % of non-functioning adenomas ($p = 0.00085$). Functioning adenomas and microadenomas had a higher rate of apoptosis compared with non-functioning adenomas and macroadenomas, respectively, which is related to the lower Bcl/Bax ratio (<1).

Kulig et al. [14] analyzed apoptosis regulatory proteins Bcl-2, Bax, Bcl-X and Bad in 95 nontumorous and neoplastic pituitary tissue by immunohistochemistry and western blot. The apoptotic index was relatively low in all groups, but it was significantly higher in pituitary carcinoma compared with any other group, which was correlated with lower expression of Bcl-2 in this group. However, there was no significant difference in the rate of apoptosis between functioning and non-functioning adenomas.

During pregnancy and lactation, lactotrophs proliferate and account for 50 % of the total number of cells. After the end of lactation, the expanded cell population is then reduced, and the lactotrophs proportion returns to pre-pregnancy levels. Alhborn et al. [15] showed that after lactation, several features were noted that are consistent with apoptosis, including the pattern of high-molecular-weight DNA fragmentation, an increase in the proapoptotic factor Bax and a concomitant decrease in the survival factor Bcl-2, and an increased mRNA for Bax and p53.

Pituitary tumor immortalized cell lines ATT20, GH3, MMQ was not apparent difference of Fas mRNA expressions. The result of cell cycle and apoptosis analysis

assessed by flow cytometry, indicated that the apoptosis rate in these 3 cell lines is increased after treatment with RGD-FasL or FasL, which in a dose-dependent manner, could activated expression of caspase 8/9/3 and reduced expression of Bcl-2 [10].

Many molecular mechanisms of pituitary tumorigenesis had already been revealed, including the participation of oncogenes, tumor suppressor genes including loss of heterozygosis at 11q13, and growth factor, like EGF (Epidermal Growth Factor) and FGF (Fibroblastic Growth Factor) [16].

PTTG is overexpressed in several tumor types, including pituitary, thyroid, breast and colon, whereas in functioning pituitary tumor has a correlation between gene expression and tumor aggressiveness. PTTG stimulates expression of the FGF2, known mediator of mitogenesis and angiogenesis, and therefore the tumoral pathogenesis [9, 17].

Paradoxically, PTTG also causes p-53 dependent and independent apoptosis [9].

Tumor treatment and apoptosis

Contradictory results were found concerning the effects of dopamine agonists and somatostatin analogues in inducing cell apoptosis in pituitary tumor [14].

There are currently available two SS analogs (SA): octreotide (OCT) and lanreotide (LAN). As these SA bind with high affinity mainly to SS receptor (SSTR) 2, and to a lesser extent, to SSTR5 and SSTR3. SA inhibitory effects on GH secretion and tumor cell proliferation can occur together or be dissociated events, depending on the tumor expression of SSTR subtypes involved in each mechanism [18].

The antitumoral effect of OCT may occur independently of its hormonal control. The dissociation between the antihormonal and the antiproliferative effects of OCT was confirmed in vitro experiments, supporting the hypothesis that the reduction of SSTR2, compared with SSTR5, may determine a sort of resistance in reducing GH levels, moreover, the increased expression of SSTR5 may associate for the tumor shrinkage via cell cycle arrest [19].

Sharma et al. [20] showed that apoptosis is signaled uniquely through human SSTR3 and is associated with dephosphorylation-dependent conformational change in wild-type (wt) p53 which precedes the onset of apoptosis, and induction of Bax. These findings provide the first evidence for hormonal induction of wt p53-associated apoptosis via G protein-coupled receptor in a subtype-selective manner. Casarini et al. [21] described a clinical case which the tumor shrinkage after SA could be due to the apoptosis related to SSTR3 activation.

Kullig et al. [14] showed there was no difference in apoptosis rate of GH-secreting adenomas or the OCT

Pituitary

treated GH adenomas. Prolactin adenomas treated with dopamine agonist bromocriptine (BC) did not contain any detectable apoptotic cells.

Similarly, Losa et al. [22] showed no significant difference in apoptotic index among OCT-treated and untreated patient. The absence of consistent morphological features among treated tumors further supports the conclusion that the induction of apoptosis is not the principal mechanism by which drug exerts its antiproliferative activity in GH-secreting adenomas. However, invasive tumors, in addition to a higher index Ki-67, showed a higher apoptotic index than noninvasive tumors.

However, Ferrante et al. [23] described somatotroph in vitro treatment with OCT was able to induces apoptosis, thus it induced a dose-dependent increasing in caspase 3 activity. On the other hand, OCT did not induce any significant changes in p53, p63, p73, Bcl-2, Bax and Bid mRNA levels as demonstrated by real-time quantitative RT-PCR.

During pregnancy and lactation, lactotrophs proliferate and account for 50 % of the total number of cells. After the end of lactation, the expanded cell population is then reduced, and the proportion lactotrophs returns to pre-pregnancy levels.

After the end of estrogen exposition in rats, an increased apoptotic cells were showed in pituitary and consequently reduction of pituitary hyperplasia. The followed administration of BC for these animals resulted in an approximately two-fold increase in the number of apoptotic cells compared with untreated animals [24].

Yonezawa et al. [25] also showed that the effects of terguride and BC were similar in suppression of cell proliferation and induction of apoptosis in prolactinoma in rats.

However, Stefanescu et al. [26] demonstrated that mitotic indices are lower in treated adenomas with dopaminergic agonist, however no significant difference in apoptotic indices between BC-treated and untreated patient.

Gruszka et al. [27] found that both OCT and BC, alone or in combination, significantly reduced the rat prolactinoma weight, and they caused a significant (approximately ten-fold) increase in Bax expression.

Everolimus, mTOR inhibitor, has antiproliferative effect on a wide spectrum of tumors cell line and tumors both in vitro and in vivo, and this drug is effective in reducing cell viability of non-functioning pituitary adenomas by inducing apoptosis, whereas it induces caspases 3–7 activation in these tumors [28].

Conclusion

During human embryogenesis, apoptosis plays a fundamental role in order to separate the future adenohypophysis

of the primitive oral cavity, and defects in this process could be associated to cysts of Rathke's pouch or cranio-pharyngeal duct and even neoplastic processes, such as craniopharyngiomas.

Mutations in transcription factors Prop-1 and Pit-1 are associated with pituitary hypoplasia during postnatal development, with a higher rate of apoptotic cells observed in this period, although it is more profound in prop1 mutants.

The genesis of pituitary adenomas is believed to be involved in cell transformation due to genetic mutations, followed by central, peripheral, and local signals that induce cell proliferation, thus stimulating tumor progression. Considering that the cells bearing genetic alterations are physiologically eliminated by apoptosis, defects in cell death processes play an important role in tumor genesis and growth.

Although there are few studies regarding the role apoptosis in the genesis of pituitary adenomas, it seems that the high apoptotic activity in the tumor could be associated with more aggressive behavior and a less responsive tumor to clinical treatment.

Contradictory results concerning apoptosis in pituitary tumor after SA and D2-dopamine receptor agonist treatment in vivo and in vitro in functioning pituitary adenomas. However, the induction of apoptosis by OCT and/or BC has been reported in few studies, which could be associated with hormonal response and tumor shrinkage.

Therefore, further studies are needed to understand the apoptotic process in pituitary cells; as well as in the genesis of pituitary tumors, in order to produce drugs that act in this way, favoring apoptosis, providing better hormonal control and reduction of tumor.

Conflict of interest All authors stated no conflicts of interest.

References

1. Jin Z, El-deiry WS (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Therapy* 4(2):139–163
2. Hotchkiss R, Strasser A, McDunn J, Swanson P (2009) Cell death. *N Engl J Med* 361(16):1570–1583
3. Grivicich I, Regner A, Rocha AB (2007) Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia* 53(3):335–343
4. Sambaziotis D, Kapranos N, Kontogeorgos G (2003) Correlation of Bcl-2 and bax with apoptosis in human pituitary adenomas. *Pituitary* 5:127–133
5. Saraga-babic M, Bazina M, Vukojevic K, Bocina I, Stefanovic V (2008) Involvement of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in the early development of the human pituitary gland. *Histol Histopathol* 23:1259–1268
6. Davis SW, Castinetti F, Carvalho LR, Ellsworth BS, Potok MA, Lyons RH et al (2010) Molecular mechanisms of pituitary organogenesis: in search of novel regulatory genes. *Mol Cell Endocrinol* 323(1):4–19

7. Ward RD, Raetzman LT, Suh H, Stone BM, Nasonkin IO, Camper SA (2005) Role of PROP1 in pituitary gland growth. *Mol Endocrinol* 19(3):698–710
8. Ward RD, Stone BM, Raetzman LT, Camper SA (2006) Cell proliferation and vascularization in mouse models of pituitary hormone deficiency. *Mol Endocrinol* 20(6):1378–1390
9. Melmed S (2003) Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest* 112(11):1603–1618
10. Chen L, Zhuang G, Li W, Liu Y, Zhang J, Tian X (2008) RGD-FasL induces apoptosis of pituitary adenoma cells. *Cell Mol Immunol* 5(1):61–68
11. Kontogeorgos G (2006) Predictive markers of pituitary adenoma behavior. *Neuroendocrinology* 83:179–188
12. Messini I, Kontogeorgos G, Kovacs K, Horvath E, Smyth HS (2002) Pituitary corticotroph adenoma containing many apoptotic cells: a histologic, immunohistochemical. Ultrastructural and molecular study. *Ultrastruct Pathol* 26:27–32
13. Kontogeorgos G, Horvath E, Kovacs K, Coire C, Lloyd RV, Scheithauer BW et al (2006) Morphologic changes of prolactin-producing pituitary adenomas after short treatment with dopamine agonists. *Acta Neuropathol* 111(1):46–52
14. Kulig E, Jin L, Qian X, Horvath E, Kovacs K, Stefaneanu L et al (1999) Apoptosis in nontumorous and neoplastic human pituitaries. *Am J Pathol* 154:3767–3774
15. Ahlbom E, Grandison L, Zhivotovsky B, Ceccatelli S (1998) Termination of lactation induces apoptosis and alters the expression of the Bcl-2 family members in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* 139(5):2465–2471
16. Bronstein MD, Melmed S (2005) Tumorigênese Hipofisária. *Arq Bras Endocrinol Metab* 49(5):615–625
17. Pinto EM, Bronstein MD (2008) Aspectos Moleculares da Tumorigênese Hipofisária. *Arq Bras Endocrinol Metab* 52(4):599–610
18. Bronstein MD (2006) Acromegaly: molecular expression of somatostatin receptor subtypes and treatment outcome. *Front Horm Res* 35:129–135
19. Resmini E, Dadati P, Ravetti J-L, Zona G, Spaziante R, Saveanu A et al (2007) Rapid pituitary tumor shrinkage with dissociation between antiproliferative and antiseecretory effects of a long-acting octreotide in an acromegalic patient. *J Clin Endocrinol Metab* 92(5):1592–1599
20. Sharma K, Patel YC, Srikant CB (1996) Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol Endocrinol* 10(12):1688–1696
21. Casarini APM, Pinto EM, Jallad RS, Giorgi RR, Giannella_Neto D, Bronstein MD (2006) Dissociation between tumor shrinkage and hormonal response during somatostatin analog treatment in an acromegalic patient: preferential expression of somatostatin receptor subtype 3. *J Endocrinol Invest* 29:826–830
22. Losa M, Ciccarelli E, Mortini P, Barzaghi R, Gaia D, Faccani G et al (2001) Effects of octreotide treatment on the proliferation and apoptotic index of GH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5194–5200
23. Ferrante E, Pelegrini C, Bondioni S, Peverelli E, Locatelli M, Gelmini P et al (2006) Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2. *Endocr Relat Cancer* 13:955–962
24. Drewett N, Jacobi J, Willgoss D, Lloyd H (1993) Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine. *Neuroendocrinology* 57(1):89–95
25. Yonezawa K, Tamaki N, Kokunai T (1997) Effects of bromocriptine and terguride on cell proliferation and apoptosis in the estrogen-stimulated anterior pituitary gland of the rat. *Neurol Med Chir* 37(12):901–906
26. Stefaneanu L, Kovacs K, Scheithauer BW, Kontogeorgos G, Riehle DL, Sebo TJ et al (2000) Effect of dopamine agonists on lactotroph adenomas of the human pituitary. *Endocr Pathol* 11(04):341–352
27. Gruszka A, Kunert-radek J, Pawlikowski M (2004) The effect of octreotide and bromocriptine on expression of a pro-apoptotic Bax protein in rat prolactinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 42(1):35–39
28. Zatelli MC, Minoia M, Filieri C, Tagliati F, Buratto M, Ambrosio MR et al (2010) Effect of everolimus on cell viability in non-functioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 95(2):968–976

ANEXO B - Protocolo Ensaio de Viabilidade Celular: *CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega)*

- Semear as células em placas de 96 poços por 24h com densidade celular específica para cada linhagem;
- Descongelar o reagente por 90 minutos em temperatura ambiente ou 10 minutos no banho úmido a 37°C;
- Pipetar 20µl do reagente em cada poço da placa de 96 poços contendo amostras no volume de 100µl de meio de cultura
- Incubar a placa na estufa a 37°C por 2h numa atmosfera humidificada e 5% CO₂;
- Ler a absorbância usando leitor de Elisa num comprimento de onda de 492 nm

ANEXO C - Protocolo para Extração de RNA: *RNeasy Mini Kit (Qiagen)*

- Preparar: 1 ml de etanol 70%: 700 µl etanol 100% + 300 µl de água miliQ;
- Preparar *DNase*: 10 µl *DNase* + 70 µl do buffer RDD;
- Manter confluência entre 70-80% numa garrafa 25cm³
- Lisar diretamente; após aspirar o sobrenadante, adicionar buffer RLT- vol= 600 µl
- Homogeneizar lisado;
- Adicionar 1 volume (600 µl) de etanol 70% no eppendorf e “*up and down*”;
- Transferir 700µl da amostra para *RNeasy spin* coluna: centrifugar por 15 seg >10.000rpm
- Repetir o processo se o volume da garrafa for >700 µl;
- Descartar lisado

Etapas do *RNase free DNase set*

- Adicionar 350 µl buffer RW1 para *RNeasy spin* coluna: centrifugar por 15 seg >10.000rpm;
- Descartar lisado;
- Adicionar 80 µl do mix *DNase/RDD* (já feito o preparado) para *RNeasy spin* coluna, e deixar em temperatura ambiente (20-30°C) por 15 minutos
- Adicionar 350 µl buffer RW1 para *RNeasy spin* coluna: centrifugar por 15 seg >10.000rpm;
- Descartar lisado
- Adicionar 500µl do buffer RPE a *RNeasy spin* coluna: centrifugar por 15 seg em 10000 rpm
- Descartar lisado;

- Adicionar 500µl do buffer RPE a RNeasy spin coluna e centrifugar por 2 min em 10000 rpm;
- Descartar lisado;
- Desprezar o eppendorf antigo, e centrifugar por 1 min na velocidade máxima;
- Trocar eppendorf para 1,5 ml e adicionar 50 µl de água RNase-free a RNeasy spin coluna e centrifugar por 1 min a 10000rpm para eluir o RNA;
- Repetir o passo anterior com eluente desta centrifugação;
- Desprezar a *RNeasy spin* coluna e armazenar o eluente

ANEXO D - Protocolo para Síntese do cDNA: *2X Reverse Transcription Master Mix*

- Quantidade de RNA total: usar 5 µg do RNA total para volume total de 50 µl de reação;
- Kit com inibidor de RNase:

Componentes:	2 amostras	1 amostra
10x RT buffer-----	10 µl-----	5 µl
10x RT random primers-----	10 µl-----	5 µl
25x dNTP mix (100nm)-----	4 µl-----	2 µl
Multiscribe reverse transcriptase-----	5 µl-----	2,5 µl
H2O nuclease-free-----	21 µl-----	10,5 µl
Volume total-----	50 µl-----	25µl

Preparar a reação do cDNA RT

- Pipetar 25 µl de 2x RT master mix;
- Pipetar 25 µl da amostra de RNA diluído;
- Volume total= 50 µl/ Eppendorf;

Realizando a transcriptase reversa

- Programar as condições do termociclador:

-step 1- T=25°C; T=10 min;

-step 2- T=37°C; T=120 min;

-step 3- T=85°C; T=5 min

-step 4- T=4°C; T=∞

ANEXO E - Protocolo de Síntese do cDNA: *RT² first strand kit*

- Descongelar os reagentes do *first strand kit* e após centrifugar por 10-15 seg;
- Preparar o mix de eliminação de DNA genômico para cada amostra de RNA:

	1 amostra RNA
a. RNA -----	25 ng - 5 µg (2 µg)
b. Buffer GE -----	2 µl
c. Água RNAase-free -----	variável
d. Volume total -----	10 µl

- Incubar o mix por 5 min a 42°C e após por imediatamente no gelo por pelo menos 1 min;
- Preparar o mix de transcriptase reversa:

	1 amostra	2 amostras
a. Buffer BC3 -----	4 µl -----	8 µl
b. Control P2 -----	1 µl -----	2 µl
c. RE3 reverse transcriptase-----	2 µl -----	4 µl
d. RNase free water -----	3 µl -----	6 µl
e. Volume total -----	10 µl -----	20 µl

- Adicionar 10 µl do mix da transcriptase reversa em cada eppendorf contendo 10 µl do mix de eliminação de DNA genômico e fazer “*up and down*”;
- Incubar a 42°C por 15 min, e depois parar a reação imediatamente e incubar a 95°C por 5 min;

- Adicionar 91 µl de água RNase-free em cada reação e fazer “up and down”;
- Colocar as reações no gelo e prosseguir com o protocolo de RT-qPCR. Se for realizar o PCR em outro momento, estocar a -20°C.

ANEXO F - Protocolo PCR em tempo real

- “*Spin down*” todos reagentes po 10-15 seg;
- Fazer o mix dos componentes:

Placa 96 poços

2x SABbioscience RT² qPCR master mix----- 675 µl

Diluted first strand cDNA synthesis reaction----- 50 µl

H₂O----- 625 µl

Volume total-----1350 µl

- Fracionar o conteúdo em volumes de 160 µl;
- Utilizar o pipetador de 8 canais - volume de 25 µl/poço;
- Ligar o aparelho ABI 7000 e seguir programa específico

ANEXO G - Genes escolhidos para estudo de expressão de vias de apoptose e reguladores do ciclo celular na placa de RT-qPCR

Símbolo	GeneBank	Descrição
Casp1	<u>NM_009807</u> NM_012762	Mus musculus Caspase 1 Rattus norvegicus Caspase 1
Casp2	<u>NM_007610</u> NM_022522	Mus musculus Caspase 2 Rattus norvegicus Caspase 2
Casp3	<u>NM_009810</u> NM_012922	Mus musculus Caspase 3 Rattus norvegicus Caspase 3
Casp4	<u>NM_007609</u> NM_053736	Mus musculus Caspase 4 Rattus norvegicus Caspase 4
Casp6	<u>NM_009811</u> NM_031775	Mus musculus Caspase 6 Rattus norvegicus Caspase 6
Casp7	<u>NM_007611</u> NM_022260	Mus musculus Caspase 7 Rattus norvegicus Caspase 7
Casp8	<u>NM_009812</u> NM_022277	Mus musculus Caspase 8 Rattus norvegicus Caspase 8
Casp9	<u>NM_015733</u> NM_031632	Mus musculus Caspase 9 Rattus norvegicus Caspase 9
Casp12	<u>NM_009808</u> NM_130422	Mus musculus Caspase 12 Rattus norvegicus Caspase 12
Casp14	<u>NM_009809</u> XM_234878	Mus musculus Caspase 14 Rattus norvegicus Caspase 14
Bad	<u>NM_007522</u> NM_022698	Mus musculus BCL2-associated agonist of cell death Rattus norvegicus Bcl2-antagonist of cell death
Bax	<u>NM_007527</u> NM_017059	Mus musculus Bcl2-associated X protein Rattus norvegicus Bcl2-associated X protein
Bcl2	<u>NM_009741</u> , NM_016993	Mus musculus B-cell leukemia/lymphoma 2 Rattus norvegicus B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl2l1	<u>NM_009743</u> NM_031535	Mus musculus Bcl2-like 1 Rattus norvegicus Bcl2-like 1
Bcl2l2	<u>NM_007537</u> NM_021850	Mus musculus Bcl2-like 2 Rattus norvegicus Bcl2-like 2
Bcl2l11	<u>NM_009754</u> NM_022612	Mus musculus BCL2-like 11 Rattus norvegicus BCL2-like 11
Fas	<u>NM_007987</u> NM_139194	Mus musculus TNF receptor superfamily member 6 Rattus norvegicus Fas
Faf1	<u>NM_007983</u> NM_130406	Mus musculus Fas associated factor 1 Rattus norvegicus Fas (TNFRSF6) associated factor 1
Apaf1	<u>NM_009684</u> NM_023979	Mus musculus Apoptotic peptidase activating factor 1 Rattus norvegicus Apoptotic peptidase activating factor 1
Trp53 (p53)	<u>NM_011640</u> NM_030989	Mus musculus Transformation related protein 53 Rattus norvegicus Tumor protein p53

Trp63	<u>NM_011641</u> NM_019221	Mus musculus Transformation related protein 63 Rattus norvegicus Tumor protein p73-like
Trp73	<u>NM_011642</u> XM_342992	Mus musculus Transformation related protein 73 Rattus norvegicus Tumor protein p73
Mki67	<u>XM_001000692</u> XM_225460	Mus musculus Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 Rattus norvegicus Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
Ccna1	<u>NM_007628</u> NM_001011949	Mus musculus Cyclin A1 Rattus norvegicus Cyclin A1
ccnb1	<u>NM_172301</u> NM_171991	Mus musculus Cyclin B1 Rattus norvegicus Cyclin B1
Cdkn1a	<u>NM_007669</u> NM_080782	Mus musculus Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A Rattus norvegicus Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
Cdkn1b	<u>NM_009875</u> NM_031762	Mus musculus Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B Rattus norvegicus Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
Tnfrsf1b	<u>NM_011610</u> NM_130426	Mus musculus Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b Rattus norvegicus Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b
Tnfrsf1a	<u>NM_011609</u> NM_013091	Mus musculus Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a Rattus norvegicus Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
Tnf	<u>NM_013693</u> NM_012675	Mus musculus Tumor necrosis factor Rattus norvegicus Tumor necrosis factor
Bid	<u>NM_007544</u> NM_022684	Mus musculus BH3 interacting domain death agonist Rattus norvegicus BH3 interacting domain death agonist
Bnip1	<u>NM_172149</u> NM_080897	Mus musculus BCL2/adenovirus E1B interacting protein 1 Rattus norvegicus BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1
Bnip2	<u>NM_016787</u> XM_217191	Mus musculus BCL2/adenovirus E1B interacting protein 2 Rattus norvegicus BCL2/adenovirus E1B interacting protein 2
Bnip3	<u>NM_009760</u> NM_053420	Mus musculus BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3 Rattus norvegicus BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3
TSHB	<u>NM_009432</u> NM_013116	Mus musculus Thyroid stimulating hormone, beta Rattus norvegicus Thyroid stimulating hormone, beta
CGA	<u>NM_009889</u> NM_053918	Mus musculus Glycoprotein hormones, alpha subunit Rattus norvegicus Glycoprotein hormones, alpha subunit
GH1	<u>NM_008117</u> NM_001034848	Mus musculus Growth hormone 1 Rattus norvegicus Growth hormone 1
LHB	<u>NM_008497</u> NM_012858	Mus musculus Luteinizing hormone beta Rattus norvegicus Luteinizing hormone beta
FSHB	<u>NM_008045</u> NM_001007597	Mus musculus Follicle stimulating hormone, beta polypeptide Rattus norvegicus Follicle stimulating hormone, beta polypeptide
PRL	<u>NM_011164</u> NM_012629	Mus musculus Prolactin Rattus norvegicus Prolactin

POMC	<u>NM_008895</u> NM_139326	Mus musculus Proopiomelanocortin Rattus norvegicus Proopiomelanocortin
PPIA	<u>NM_008907</u> NM_017101	Mus musculus Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) Rattus norvegicus Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
B2M	<u>NM_009735</u> NM_012512	Mus musculus Beta-2 microglobulin Rattus norvegicus Beta-2 microglobulin
HPRT	<u>NM_013556</u> NM_012583	Mus musculus Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 Rattus norvegicus Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
GAPDH	<u>NM_008084</u> NM_017008	Mus musculus Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Rattus norvegicus Glyceraldehyde – 3 - phosphate dehydrogenase
MGDC* RGDC*	<u>SA_00106</u> U26919	Mus musculus Mouse Genomic DNA Contamination Rattus norvegicus Rat Genomic DNA Contamination
RTC*	SA_00104 SA_00104	Mus musculus Rattus norvegicus
PPC*	SA_00103 SA_00103	Mus musculus Rattus norvegicus

ANEXO H - Efeito do cetoconazol sobre a viabilidade celular nas linhagens tumorais hipofisárias

Concentração de KTC	Linhagem corticotrófica AtT-20	Linhagem mamossomatotrófica GH3	Linhagem gonadotrófica αT3.1	Linhagem mamotrófica MMQ
20μM	*6h:79,2±5,4% 12h:77,8±7,8% 24h:93±1,4%	**6h: 90±0,6% **12h:87,9±6,1% 24h:100±2,2%	**6h: 82±4,4% **12h:86±4,7% **24h:79,6±5,2%	6h:119,4±53,7% 12h: 98,1±5% 24h:115,6±48,3%
40μM	**6h:47,3±11,89% *12h:59,7±11,6% **24h:34±1,44%	**6h:51,2±3,1 **12h:51,2±0,7% **24h:53,7±2,5%	**6h:66,8±16,8% **12h: 50,3±2,3% **24h:28,7±1,3%	*6h:53,3±23,1% 12h:83,3±11 24h:123,6±46,5%
60μM	**6h:29,6±4,32% **12h:21,5±21,4% **24h:10,8±5,7%	**6h:43,4±0,3% **12h:38,7±0,3% **24h:17,2±3,6%	**6h:39±0,8% **12h:27,9±1,5% **24h:11,2±1,3%	**6h:38,8±22,1% *12h:74,6±14,2% *24h:51,7±12,9%

*p<0,05 vs. Controle em cada experimento; **p<0,001 vs. Controle em cada experimento;
KTC= cetoconazol

ANEXO I - Recuperação parcial da viabilidade celular nas linhagens tumorais hipofisárias após incubação com cetoconazol em diferentes concentrações e tempos de incubação

Concentração de KTC	Linhagem corticotrófica AtT-20	Linhagem mamossomatotrófica GH3	Linhagem gonadotrófica αT3.1
20μM	48h pós 6h: 64,3±0,9%	48h pós 6h: 89,2±1,9%	*48h pós 6h: 99,9±15,7%
	48h pós 12h: 94,9±0	48h pós 12h: 88,9±23,5%	*48h pós 12h: 97,1±14,9%
	*48h pós 24h: 78,9±3,4%	*48h pós 24h: 59,5±11%	**48h pós 24h: 121,9±9,9%
40μM	*48h pós 6h: 64,6±11,4%	**48h pós 6h: 72±18,8%	*48h pós 6h: 83,1± 26,5%
	**48h pós 12h: 78,4±18,5%	*48h pós 12h: 57,6±8,8%	**48h pós 12h: 69,4± 12,3%
	48h pós 24h: 42,7±13,7%	*48h pós 24h: 22,8±1,2%	**48h pós 24h: 59,6±7,1%
60μM	*48h pós 6h: 44,9±12,3%	**48h pós 6h: 78,1±18,1%	48h pós 6h: 39,3±6,3%
	**48h pós 12h: 58,8±0,7%	**48h pós 12h: 64,6±16,4%	*48h pós 12h: 47,3±11,5%
	*48h pós 24h: 21,3±3,4%	48h pós 24h: 16,4±0,6%	48h pós 24h: 9,5±3,1%

*p<0,05 vs. Controle em cada experimento; **p<0,001 vs. Controle em cada experimento; KTC= cetoconazol

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Molina P. Fisiologia Endócrina, 2 Ed. 2007. p. 45–68.
2. DeLellis RA, Lloyd R V, Heitz PU, Eng C. Tumours of the Pituitary. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. 2004. p. 9–45.
3. Molitch ME, Russell EJ. The pituitary “Incidentaloma.” *Ann Inter Med*. 1990;112(12):925–31.
4. Arafah BM, Nasrallah MP. Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocr Rel Cancer*. 2001 Dec;8(4):287–305.
5. Biller BMK, Grossman a B, Stewart PM, Melmed S, Bertagna X, Bertherat J, et al. Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing’s syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Jul;93(7):2454–62.
6. Freda PU, Wardlaw SL. Clinical review 110: Diagnosis and treatment of pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Nov;84(11):3859–66.
7. Katzung BG. *Farmacologia Básica & Clínica*, 10 edição. 2010. p. 869–80.
8. Feelders RA, Hofland LJ, de Herder WW. Medical treatment of Cushing’s syndrome: adrenal-blocking drugs and ketaconazole. *Neuroendocrinology*. 2010 Jan;92(suppl 1):111–5.
9. Dang CN, Trainer P. Pharmacological management of Cushing’s syndrome: An Update. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2007 Nov;51(8):1339–48.
10. Castinetti F, Morange I, Jaquet P, Conte-Devolx B, Brue T. Ketoconazole revisited: a preoperative or postoperative treatment in Cushing’s disease. *Eur J Endocrinol*. 2008 Jan;158(1):91–9.
11. Sonino N, Boscaro M, Paoletta A, Mantero F, Ziliotto D. Ketoconazole treatment in Cushing’s syndrome: experience in 34 patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1991;35(4):347–52.
12. Loli P, Berselli ME, Tagliaferri M. Use of Ketoconazole in the Treatment of Cushing’s Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986;63:1365–71.

13. Cerdas S, Billaud L, Guilhaume B, Laudat M, Bartagna X, Luton J. Short term effects of ketoconazole in Cushing's syndrome. *Ann Endocrinol.* 1989;50(6):489–96.
14. Mortimer L, Cannell G, Thew C, Galligan J. Ketoconazole and plasma and urine steroid levels in Cushing's disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1991;18(8):663–9.
15. McCance D, Hadden D, Kennedy L, Sheridan B, Atkinson A. Clinical experience with ketoconazole as a therapy for patients with Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1987;27(5):593–9.
16. Engelhardt D, Weber M. Therapy of Cushing's syndrome with steroid biosynthesis inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994;49(4-6):261–7.
17. Castinetti F, Guignat L, Giraud P, Muller M, Kamenicky P, Drui D, et al. Ketoconazole in Cushing's disease: is it worth a try? *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 May;99(5):1623–30.
18. Terzolo M, Panarelli M, Piovesan A, Torta M, Paccotti P, Angeli A. Ketoconazole treatment in Cushing's disease. Effect on the circadian profile of plasma ACTH and cortisol. *J Endocrinol Invest.* 1988;11(10):717–21.
19. Sonino N, Boscaro M, Merola G, Mantero F. Prolonged treatment of Cushing's disease by ketoconazole. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;61(4):718–22.
20. Burrin J, Yeo T, Ashby M, Bloom S. Effect of ketoconazole on adrenocorticotrophic hormone secretion in vitro and in vivo. *J Endocrinol.* 1986;101(1):37–41.
21. Stalla G, Stalla J, Huber M, Loeffler J, Höllt V, von Werder K, et al. Ketoconazole inhibits corticotropic cell function in vitro. *Endocrinology.* 1988;122(2):618–23.
22. Stalla G, Stalla J, von Werder K, Müller O, Gerzer R, Höllt V, et al. Nitroimidazole derivatives inhibit anterior pituitary cell function apparently by a direct effect on the catalytic subunit of the adenylate cyclase holoenzyme. *Endocrinology.* 1989;125(1):699–706.
23. Jimenez Reina L, Leal-Cerro A, Garcia J, Garcia-Luna P, Astorga R, Bernal G. In vitro effects of ketoconazole on corticotrope cell morphology and ACTH secretion of two pituitary adenomas removed from patients with Nelson's syndrome. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1989;121(2):185–90.

24. Drouhault R, Vacher P, David J, Courtes A, Vilayleck N, Dufy B. Differential effects of ketoconazole on prolactin and growth hormone release by normal and tumoral rat anterior pituitary cells in vitro. *Neuroendocrinology*. 1989;50(5):513–8.
25. Drouhault R, Vacher P, Darret D, Larrue J, Vacher A-M, Vilayleck N. Effets induits à long terme par un seul traitement de kétoconazole sur des cellules tumorales hypophysaires de rat (lignée GH3/B6). *C R Acad Sci Paris*. 1991;312(3):615–22.
26. Rodriguez RJ, Acosta Jr D. Comparison of ketoconazole- and fluconazole-induced hepatotoxicity in a primary culture system of rat hepatocytes. *Toxicology*. 1995;96:83–92.
27. Eichenberger T, Trachtenberger J, Toor P, Keating A. Ketoconazole: a possible direct cytotoxic effect on prostate carcinoma cells. *J Urol*. 1989;141(1):190–1.
28. Ho Y, Tsai P, Yu C, Liu H, Chen R, Lin J. Ketoconazole-Induced Apoptosis through P53-Dependent Pathway in Human Colorectal and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998;153:39–47.
29. Lin K, Huang C, Cheng J, Tsai J, Lu Y, Chang H, et al. Ketoconazole-induced JNK phosphorylation and subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells. *Toxicol Vitro*. Elsevier Ltd; 2009;23:1268–76.
30. Jin Z, El-deiry WS. Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biol Ther*. 2005;4(2):139–63.
31. Thompson C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* (80-). 1995;267(5203):1456–62.
32. Grivicich I, Regner A, Rocha AB da. Morte Celular por Apoptose. *Rev Bras Cancerol*. 2007;53(3):335–43.
33. Hotchkiss R, Strasser A, McDunn J, Swanson P. Cell Death. *N Engl J Med*. 2009;361(16):1570–83.
34. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001;11(9):372–7.
35. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, et al. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1996 Mar 1;271(9):4961–5.
36. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death : Critical Control Points Review. *Cell*. 2004;116(2):205–19.

37. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2005 Nov;37(11):719–27.
38. Guzzo MF, Carvalho LRS, Bronstein MD. Apoptosis: Its role in pituitary development and neoplastic pituitary tissue. *Pituitary*. 2014;17(2):157–62.
39. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):594–604.
40. Irwin MS, Kaelin WG. P53 Family Update: P73 and P63 Develop Their Own Identities. *Cell Growth Differ*. 2001 Jul;12(7):337–49.
41. Musat M, Vax V, Borboli N, Gueorquiev M, Bonner S, Korbonits M, et al. Cell cycle dysregulation in pituitary oncogenesis. *Front Horm Res*. 2004;32:34–62.
42. Malumbres M. Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol Rev*. 2011 Jul;91(3):973–1007.
43. Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors : three families united by a common cause. *Gene*. 2000;247:1–15.
44. Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene*. 1999 Sep 20;18(38):5311–7.
45. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein : From the Known and the Unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182:311–22.
46. Zambon AC. Use of the Ki67 Promoter to Label Cell Cycle Entry in Living Cells. *Cytom A*. 2010;77(6):564–70.
47. Oyama Y, Sakai H, Arata T, Okano Y, Akaike N, Sakai K, et al. Cytotoxic effects of methanol, formaldehyde, and formate on dissociated rat thymocytes : A possibility of aspartame toxicity. *Cell Biol Toxicol*. 2002;18:43–50.
48. Schafer-Korting M, Korting H, Dorn M, Mutschler E. Ketoconazole concentrations in human skin blister fluid and plasma. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1984;22(7):371–4.
49. Alton K. Determination of the antifungal agent, ketoconazole, in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1980;221(2):337–44.
50. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.

51. Weber M, Luppa P, Engelhardt D. Inhibition of human adrenal androgen secretion by ketoconazole. *Klin wochenschr.* 1989;67(14):707–12.
52. Loose DS, Stover EP, Feldman D. Ketoconazole Binds to Glucocorticoid Receptors and Exhibits Glucocorticoid Antagonist Activity in Cultured Cells. *J Clin Invest.* 1983;72:404–8.
53. Janssen T, Darro F, Petein M, Raviv G, Pasteels J, Kiss L, et al. In vitro characterization of prolactin-induced effects on proliferation in the neoplastic LNCaP, DU145, and PC3 models of the human prostate. *Cancer.* 1996;77(1):144–9.
54. Crépin A, Bidaux G, Vanden-Abeelee F, Dewailly E, Goffin V, Prevarskaya N, et al. Prolactin stimulates prostate cell proliferation by increasing endoplasmic reticulum content due to SERCA 2b over-expression. *Biochem J.* 2007 Jan 1;401(1):49–55.
55. Fernandez I, Touraine P, Goffin V. Prolactin and Human Tumourogenesis. *J Neuroendocr.* 2010;22:771–7.
56. Ferraris J, Boutillon F, Bernadet M, Seilicovich A, Goffin V, Pisera D. Prolactin receptor antagonism in mouse anterior pituitary : effects on cell turnover and prolactin receptor expression. *Am J Physiol endocrinol Metab.* 2012;302:356–64.
57. Ferraris J, Zárata S, Jaita G, Boutillon F, Bernadet M, Auffret J, et al. Prolactin Induces Apoptosis of Lactotropes in Female Rodents. *PLoS One.* 2014;9(5):1–14.
58. Hosojima H, Wyche J. Prolactin control of growth and prolactin autoregulation in cultured human pituitary cells. *Horm Res.* 1985;21(4):240–5.
59. Krown K, Wang Y, Ho T, Kelly P, Walker A. Prolactin isoform 2 as an autocrine growth factor for GH3 cells. *Endocrinology.* 1992;131(2):595–602.
60. Ahmed A, Furqan S, Islam N. Disappearance of pituitary macro adenoma with combination of ketoconazole and cabergoline treatment: an unusual case of Cushing's syndrome with interesting findings. *BMJ Case Rep.* 2012 Jan;3–6.
61. Vilar L, Naves LA, Azevedo MF, Arruda MJ, Arahata CM, Moura E Silva L, et al. Effectiveness of cabergoline in monotherapy and combined with ketoconazole in the management of Cushing's disease. *Pituitary.* 2010 Jun;13:123–9.

62. Feelders RA, Bruin christiaan de, Pereira AM, Romijn JA, Netea-Maier RT, Hermus AR, et al. Pasireotide Alone or with Cabergoline and Ketoconazole in Cushing ' s Disease. *N Engl J Med*. 2010;362(19):1846–8.
63. Van den Bosch O, Stades A, Zelissen P. Increased long-term remission after adequate medical cortisol suppression therapy as presurgical treatment in Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;80(2):184-90.
64. Fleseriu M, Petersenn S. Medical management of Cushing's disease: what is the future? *Pituitary*. 2012 Sep;15(3):330–41.
65. Sugar AM, Alsip SG, Galgiani JN, Graybill JR, Dismukes WE, Cloud GA, et al. Pharmacology and Toxicity of High-Dose Ketoconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987;31(12):1874–8.
66. Ren SG, Melmed S. Pyridoxal phosphate inhibits pituitary cell proliferation and hormone secretion. *Endocrinology*. 2006 Aug;147(8):3936–42.
67. Kontogeorgos G. Predictive Markers of Pituitary Adenoma Behavior. *Neuroendocrinology*. 2006;83:179–88.
68. Sambaziotis D, Kapranos N, Kontogeorgos G. Correlation of Bcl-2 and Bax with Apoptosis in Human Pituitary Adenomas. *Pituitary*. 2003;5:127–33.
69. Ryu SW, Lee SJ, Park MY, Jun J II, Jung YK, Kim E. Fas-associated factor 1, FAF1, is a member of Fas death-inducing signaling complex. *J Biol*. 2003 Jun 27;278(26):24003–10.
70. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ*. 2004 Apr;11(4):372–80.
71. Ferrante E, Pelegrini C, Bondioni S, Peverelli E, Locatelli M, Gelmini P, et al. Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13:955–62.
72. Casarini APM, Pinto EM, Jallad RS, Giorgi RR, Giannella_Neto D, Bronstein MD. Dissociation between tumor shrinkage and hormonal response during somatostatin analog treatment in an acromegalic patient: Preferential expression of somatostatin receptor subtype 3. *J Endocrinol Invest*. 2006;29:826–30.
73. Losa M, Ciccarelli E, Mortini P, Barzaghi R, Gaia D, Faccani G, et al. Effects of Octreotide Treatment on the Proliferation and Apoptotic

- Index of GH-Secreting Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5194–200.
74. Radl DB, Ferraris J, Boti V, Seilicovich A, Sarkar DK, Pisera D. Dopamine-induced apoptosis of lactotropes is mediated by the short isoform of D2 receptor. *PLoS One.* 2011 Jan;6(3):1–7.
75. Stefaneanu L, Kovacs K, Scheithauer BW, Kontogeorgos G, Riehle DL, Sebo TJ, et al. Effect of Dopamine Agonists on Lactotroph Adenomas of the Human Pituitary. *Endocr Pathol.* 2000;11(04):341–52.
76. Pinto EM, Bronstein MD. Aspectos Moleculares da Tumorigênese Hipofisária. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008;52(4):599–610.
77. Cuevas-ramos D, Fleseriu M. Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol.* 2014;52(3):223–40.
78. Ben-Schlomo A, Melmed S. Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(3):123–33.
79. Schaaf C, Shan B, Onofri C, Stalla GK, Arzt E, Schilling T, et al. Curcumin Inhibits the Growth , Induces Apoptosis and Modulates the Function of pituitary Folliculostellate Cells. *Neuroendocrinology.* 2010;91:200–10.
80. Schaaf C, Shan B, Buchfelder M, Losa M, Kreutzer J, Rachinger W, et al. Curcumin acts as anti-tumorigenic and hormone-suppressive agent in murine and human pituitary tumour cells in vitro and in vivo. *Endocrine-Related Cancer.* 2009;16:1339–50.
81. Van Oijen M, Medema R, Slootweg P, Rijksen G. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol.* 1998;110(1):24–31.

APÊNDICES

APÊNDICE

Apêndica A

Artigo submetido sobre o presente estudo

1 **Ketoconazole decreases the cell viability of immortalized pituitary cell lines due to an**
2 **increase in the expression of apoptosis-related genes and cell cycle inhibitors**

3 Abbreviated title: Effects of ketoconazole on pituitary cells

4 Mariana Furieri Guzzo¹, Luciani Renata Silveira de Carvalho², Marcello Delano Bronstein¹

5 1- Neuroendocrine Unit, Division of Endocrinology and Metabolism, Hospital das
6 Clínicas, University of Sao Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

7 2- Development Endocrinology Unit, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular-
8 LIM 42, Hospital das Clínicas, University of Sao Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

9 Correspondence to:

10 Prof. Marcello D Bronstein, MD, PhD

11 Neuroendocrine Unit, Division of Endocrinology and Metabolism, Hospital das Clínicas,
12 University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil.

13 Av. Dr. Eneas de Carvalho, 255, 7º andar, sala 7037, Instituto Central, Cerqueira Cesar, São
14 Paulo, CEP 05403-000, Brazil. Phone: +55 11 2661 6293; Fax: +55 11 2661 7694

15 E-mail: mdbronstein@uol.com.br

16 Keywords: ketoconazole, apoptosis, cell cycle, pituitary tumor

17

18 This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo –
19 FAPESP (2011-10582-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
20 Tecnológico- CNPQ

21

22 Disclosure: M.F.G., L.R.S.C. and M.D.B. have nothing to declare.

23

24

25

26

28 **Abstract**

29 Ketoconazole, which was initially described as an antifungal agent, is a potent inhibitor of
30 adrenal steroidogenesis and has therefore been used in the management of Cushing's disease.
31 Surprisingly, the reduction of cortisol levels during ketoconazole treatment is not accompanied
32 by an elevation in plasmatic ACTH, suggesting that ketoconazole has a direct effect on
33 corticotropic cells. To characterize the direct effects of ketoconazole, we evaluated its in vitro
34 effect on cell viability using the pituitary tumoral cell lines AtT-20 (which secretes ACTH),
35 GH3 (which secretes GH and prolactin) and α T3.1 (which secretes alpha-subunit), and we
36 determined the expression levels of genes involved in apoptosis and DNA replication by RT-
37 qPCR. We also evaluated ACTH levels in AtT-20 cells during ketoconazole treatment. We
38 observed a ketoconazole concentration-dependent decrease in pituitary cell viability and
39 reduced ACTH levels in AtT-20 cells after removal of the drug. We also observed increased
40 expression of cell death receptors (e.g., Fas, TNFR) and caspases (e.g., caspase-6, caspase-7,
41 caspase-9), suggesting activation of the apoptosis pathway. In addition, we observed increased
42 gene expression of the cell cycle inhibitors p21 and p27 in GH3 cells and increased expression
43 of p21 in α T3.1 cells. In conclusion, our findings suggest that ketoconazole has the potential to
44 reduce cell viability and increase the expression of genes related to apoptosis and cell cycle
45 regulation in pituitary cell lines.

46 **Introduction**

47 Cushing's disease (CD) is defined as a pituitary adenoma leading to hypercortisolism and can
48 result in other serious clinical consequences if left untreated. Tumors vary in size;
49 approximately 40-50% are not detected preoperatively by MRI, yet up to 15-20% of
50 corticotrophinomas extend beyond the sella turcica, complicating complete resection of the
51 tumor (1). Pituitary tumor removal by transsphenoidal surgery is the preferred therapy and is
52 associated with remission rates of 65 to 90% for microadenomas and lower rates for
53 macroadenomas(2). Therefore, complementary therapies are frequently needed to control
54 hypercortisolism and/or tumor growth(3). One of the pharmacological agents used in the
55 treatment of CD is ketoconazole (KTC), a broad-spectrum antifungal agent that reduces cortisol
56 and sex steroid levels via inhibition of cytochrome P450 enzymes (side-chain cleavage
57 complex; 17, 20-lyase; 11- β -hydroxylase; and 17- α -hydroxylase)(4). There are conflicting
58 results in the literature regarding ACTH levels during KTC treatment in patients with CD, with
59 some reports indicating unchanged ACTH levels after stimulus with CRH(5) and other reports
60 indicating both decreased(6) and increased levels(7) during KTC treatment. Previous in vitro
61 studies have revealed decreased POMC mRNA and AMPc levels in normal pituitary tissue(8),
62 implying direct inhibition of the adenyl cyclase system. These findings suggest that KTC

63 induces a decrease in intra-cytoplasmic secretory granules and reduces ACTH release in the
64 media in human pituitary adenoma cells from patients with Nelson's syndrome(9).

65 In addition, anti-tumoral activity of KTC was previously reported in prostate cancer, which
66 suggests that KTC has a direct cytotoxic effect on cancer cells that is not related to its anti-
67 androgen effect(10). KTC can also induce a concentration-dependent reduction of cell viability
68 by stimulation of apoptosis in human hepatocellular, colorectal carcinoma, and osteosarcoma
69 cell lineages as well as cultured primary rat liver cells (11,12).

70 The characterization of genes involved in apoptosis and cell cycle regulation is an important
71 step toward understanding the paradoxical effect of KTC in ACTH secretion by pituitary cells.
72 Based on data for Cushing's disease, we decided to extrapolate the analysis to GH/prolactin-
73 producing and nonfunctioning pituitary (silent gonadotropin cell adenomas) cell lineages. In
74 vitro studies revealed that pharmacological concentrations of KTC inhibit rodent pituitary cell
75 growth and hormone secretion through increased expression of apoptosis and cell cycle
76 inhibition markers, results that have potential therapeutic implications.

77 **Materials and Methods**

78 *Cell culture*

79 The pituitary tumoral corticotropic AtT-20 cell line (courtesy of Dr. Audrey F. Seasholtz,
80 University of Michigan, USA), gonadotrophic α T3.1 cell line (courtesy of Dr. Pamela Melon,
81 University of California, San Diego, USA), and mammosomatotrophic GH3 cell line (courtesy
82 of Dr. Sally Camper, University of Michigan, USA) were maintained at 37°C with 5% CO₂ in
83 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies, Foster City, CA, USA)
84 containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and 1%
85 streptomycin/penicillin (Life Technologies, Foster City, CA, USA) without antifungals.

86 Pituitary cells were incubated in maintenance medium for 24 h prior to treatment with KTC
87 (Purifarma, São Paulo, SP, Brazil) at varying doses for the times indicated. Stock solutions of
88 KTC (1 mM) were prepared in 1:1 dilutions of methanol:water. According to the manufacturer,
89 KTC must be diluted in methanol, and previous study have shown that methanol in the range of
90 30-100 mmol/l does not affect the viability of rat cells (13). Also, our experiments were based
91 on previously published studies in which KTC was used at different concentrations in pituitary
92 and non-pituitary cells (8,11,12). The doses of KTC (final concentrations of 20 to 100 μ M) were
93 prepared by dilution of the stock solution in DMEM with 10% FBS. In the viability
94 experiments, we used a maximum of 3% methanol (which is equivalent to 74.1 mmol/l) when
95 the cells were treated with 60 μ M KTC.

96 The concentrations of KTC were based on the therapeutic concentration of KTC in human
97 plasma, which ranges from 3.3 to 9.6 μM after oral administration of 200 mg of KTC (14,15);
98 thus, the theoretical plasma concentration should be approximately 60 μM after taking the
99 maximum dose of 1200 mg/day used to treat CD. The controls were treated with DMEM
100 containing 10% FBS.

101 *Cell proliferation assays*

102 CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, Madison, WI, USA) is a colorimetric method
103 for determining the number of viable cells in proliferation or cytotoxicity assays based on
104 cellular conversion of a tetrazolium salt into a blue formazan product (MTT test) (16). We used
105 this assay only to infer cell viability because we did not count the cells directly. In brief, the
106 cells were maintained in a flask under the conditions previously described. On the day before
107 KTC treatment, the cells were detached from the bottom of the flask with 0.25% trypsin-EDTA
108 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), collected, and counted using a Neubauer
109 chamber. The cells were plated in 96-well culture plates at a density of 0.7×10^3 cells/well for
110 AtT-20 cells and 1.5×10^3 cells/well for GH3 and $\alpha\text{T3.1}$ cells. On the following day, the cells
111 were treated with varying concentrations of KTC for 6 h, 12 h, and 24 h. KTC was then
112 removed, and 48 h later, recovery studies were performed. During the last 2 h of all treatments,
113 the cells were incubated with CellTiter 96® AQueous One Solution, and the absorbance was
114 measured in an ELISA reader at 490 nm. The experiments were performed in triplicate and
115 repeated twice.

116 *Hormone assay*

117 AtT-20 cells were plated and treated with KTC (25, 50, and 100 μM) in 12-well culture plates at
118 10^5 cells/well. After adding KTC to the cells, an aliquot of the supernatant was collected after 30
119 min and 3 h. After 3 h, the medium containing KTC was removed, the cells were washed 1x
120 with PBS, and fresh medium was added. Three hours after KTC removal, the supernatant was
121 collected. The media collected at different endpoints were stored at -20°C until hormone
122 measurement. ACTH concentrations in the supernatants were measured using a commercial
123 immunoassay (AutoDELFIA; PerkinElmer®, Waltham, MA) with an analytical sensitivity of 5
124 pg/ml and inter- and intra-assay variabilities of 4.4% and <6%, respectively.

125 *Apoptosis and cell cycle analysis by RT-qPCR*

126 The cells were treated with 40 μM KTC in DMEM for 6 h in 25 cm^2 culture stock. We chose
127 this time and concentration of KTC because it causes an approximate 50% reduction in cell
128 viability in the pituitary lineages studied. After 6 h in KTC media, total RNA was extracted
129 from the cells using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), and genomic DNA

130 was removed with the RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Valencia, CA, USA) according to the
131 manufacturer's instructions.

132 Total RNA (5 µg) was used to synthesize cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse
133 Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a final volume of 50 µl
134 according to the manufacturer's instructions.

135 RT-qPCR reactions were performed using an RT² Profiler™ PCR Array (CAPM11120A for
136 mouse or CAPR11121A for rat) with SYBR Green I (SYBR® Green PCR MasterMix,
137 SABiosciences, Qiagen, Valencia, CA, USA) as a DNA binding dye. First-strand cDNA (15 µl)
138 and 675 µl of 2x SABiosciences master mix in a total volume of 1350 µl were divided among
139 48 wells, and PCR was performed under the following conditions: 95°C for 10 min, 40
140 amplification cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min, followed by melting curve analysis
141 using the ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA
142 USA). Relative expression levels compared to non-treated cells (controls) were calculated by
143 the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using the Ct geometric means of four housekeeping genes(17) (Supplemental
144 Table 1). Quantitative measurements were performed in triplicate in individualized experiments.

145 *Statistical analysis*

146 The results are presented as the mean ± SD. Student's t-test was used to determine differences
147 between groups in the RT-qPCR analysis. To analyze the cell viability and hormone assay data,
148 we used a one-way ANOVA with a Bonferroni correction using SigmaStat 3.5 (Systat Software,
149 Inc., San Jose, CA, USA) and Biostat 5.0 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brazil) software.

150 **Results**

151 *KTC reduces ACTH levels in AtT-20 cells*

152 In the hormone assay, cellular ACTH levels were at the upper limit of detection after treatment
153 with KTC for 3 h. We determined that ACTH levels were significantly reduced in a dose-
154 dependent manner at 3 h after KTC removal (50 µM and 100 µM KTC reduced ACTH by 30.2
155 and 91.1% compared to the control, respectively; $p < 0.05$), suggesting corticotropic cell death
156 leading to hormone level reduction (Figure 1).

157

158

159

160

Figure 1: Effects of KTC on hormone secretion in AtT-20 cells. Cells were treated with varying doses of KTC (25, 50, and 100 μ M) for 3 h. Samples were collected after 30 min and 3 h of incubation with KTC and at 3h after withdrawal of KTC. ACTH was measured by immunoassay. The results are presented as percentages of the hormone levels of the control. Each point represents the mean of 3 wells in two experiments. * $p < 0.05$ vs. control

KTC inhibits AtT-20, GH3, and α T3.1 cell proliferation

KTC significantly inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner in AtT-20, GH3, and α T3.1 cells. Exposure of pituitary cell lines to 40 μ M and 60 μ M KTC resulted in lower proliferation rates, while cells exposed to a concentration of 20 μ M grew at a rate similar to that of controls. Maximal inhibition of proliferation was achieved after 24 h of cell exposure to 40 and 60 μ M KTC; AtT-20 cell viability (Figure 2, panel C) was reduced by 66% by 40 μ M KTC and up to 89.1% by 60 μ M KTC ($p < 0.001$ for 40 μ M and 60 μ M KTC). GH3 cell viability (Figure 2, panel F) was reduced by 46.2% and 82.8% after treatment with 40 μ M and 60 μ M KTC, respectively ($p < 0.001$ for all), and α T3.1 cell viability (Figure 2, panel I) was reduced by 20.4%, 71.2%, and 88.8% at doses of 20, 40, and 60 μ M KTC, respectively ($p < 0.001$ for all). The degree of cell toxicity was concentration- and time-dependent, particularly for α T3.1 and GH3 cells.

Partial recovery of cell proliferation after KTC withdrawal

To rule out an idiosyncratic effect of KTC, we performed recovery studies. After withdrawal of KTC, cells regained partial growth (Figure 2). Maximal recovery of proliferation was achieved after 12 h of cell exposure to 40 and 60 μ M KTC (Figure 2, panel B). AtT-20 cell viability recovered by 21.5% after treatment at 40 μ M and by up to 45.1% after treatment at 60 μ M ($p < 0.001$ vs. treated cells). GH3 cells recovered by 42.4% and 39.2% after treatment with 40 and 60 μ M KTC ($p < 0.05$ and 0.001, respectively, Figure 2 panel E), and α T3.1 cells recovered by 5%, 29%, and 63.8% after treatment with 20, 40, and 60 μ M KTC, respectively ($p < 0.001$ for 40 μ M and $p < 0.05$ for 20 μ M and 60 μ M, Figure 2, panel H).

* Solid bars: treated with KTC, Hatched bars: after KTC withdrawal

Figure 2: Cell growth rates. Effects of KTC on cell proliferation and recovery of cell proliferation after withdrawal of KTC in AtT-20 (A, B, and C), GH3 (D, E, and F) and αT3.1 (G, H, and I) cells. The cells were treated with KTC and subsequently exposed to maintenance medium without KTC for 48 h. The results are presented as percentages of the control groups. Each bar is the mean±SD of at least 6 wells/experiment. NS: non-significant. *p<0.05 and **p<0.001: comparison between the treated group and the withdrawal group.

KTC increases apoptosis gene expression in pituitary cells

Genetic analysis revealed that AtT-20 cells treated with 40 μM KTC for 6 h exhibited significantly increased expression of Bim, Bid, and caspase-9 pro-apoptotic genes (Figure 3, panel A). In GH3 cells, the expression of Bnip2, Bnip3, caspase-6, caspase-7, Faf1, Fas, and TNFR1b was significantly increased (Figure 3, panel B). In the αT3.1 cell line, the expression of Bim, Bid, Bnip1, caspase-12, Fas, Faf1, TNF, Mki67 (ki67), TNFR1a, and TNFR1b was significantly increased compared with KTC withdrawal (Figure 3, panel C). KTC also reduced the expression of p63 in AtT-20 cells and p73 in GH3 cells (Figure 3, panels A and B).

Figure 3: KTC induces the extrinsic pathway of apoptosis. KTC increased the expression of proapoptotic genes such as B Bim, and caspase-9 in AtT-20 cells (A). KTC increased the gene expression of Bnip-2, Bnip-3, caspase-6, caspase-7, Faf1, Fas, a TNFR1b in GH3 cells (B) and increased Bim, Bid, Bnip-1, Faf1, Fas, Mki67, TNFR1a, and TNFR1b gene expression in αT3.1 cc (C). Each bar represents the mean±SD of three independent experiments (normalized to four housekeeping genes and non-treated cells). Black bars: treated with KTC; gray bars: after withdrawal of KTC. * $p<0.05$ and ** $p<0.001$ between the two described groups. The genes that did not display expression changes between groups are not represented in the figures (treated and after removal of KTC)

KTC increases the expression of cell cycle inhibitors in pituitary cells

Treatment with 40 μ M KTC for 6 h increased the expression of the cell cycle inhibitor p21 in GH3 and αT3.1 cells ($p<0.001$) (Figure 4, panels A and B) and increased p27 expression in GH3 cells ($p<0.05$) (Figure 4, panel A).

Figure 4: KTC increases the expression of cell cycle inhibitors. KTC increased the expression of p21 and p27 in GH3 cells (A) and p21 in αT3.1 cells (B). Each bar is the mean±SD of three independent experiments (normalized to four housekeeping genes and non-treated cells). Black bars: treated with KTC; gray bars: after KTC withdrawal. * $p<0.05$ and ** $p<0.001$ between the two described groups.

242 *KTC reduces hormone expression in pituitary cells*

243 GH3 cells exposed to 40 μ M KTC for 6 h exhibited significantly reduced prolactin gene
 244 expression, which persisted even after removal of the drug (Figure 5, panel A). However, KTC
 245 did not alter the gene expression of GH (in GH3 cells) or POMC (in AtT-20 cells) (data not
 246 shown). Moreover, KTC induced a sustained reduction in gene expression of the alpha-subunit
 247 in α T3.1 cells (Figure 5, panel B). The expression of housekeeping genes (B2M, GAPDH,
 248 HPRT, and PPIA) did not vary between KTC-treated cells and non-treated cells (controls) (data
 249 not shown)

250

251

252

253

254

255

256

257 **Figure 5: KTC reduces the expression of hormonal genes.** KTC reduced the gene expression of prolactin in GH3
 258 cells (A) and alpha-subunit in α T3.1 cells (B). Each bar is the mean $\pm$ SD of three independent experiments
 (normalized to four housekeeping genes and non-treated cells). Black bars: treated with KTC; gray bars: after KTC
 withdrawal. *p<0.05 and **p<0.001 between the two described groups.

259

260 **Discussion**

261 KTC is an antifungal agent that inhibits steroidogenesis. It is often used to treat CD at a starting
 262 dose of 400 mg/day and a maximal dose of 1200 mg/day (4). A recent retrospective analysis
 263 revealed normalization of urinary free cortisol in 45% of patients with CD (mean follow-up of
 264 23 months) with clinical regression of hypercortisolism signs (18).

265 In addition to inhibiting steroidogenesis, KTC has putative extra-adrenal actions. At higher
 266 concentrations, KTC is an antagonist of the glucocorticoid receptor in cultured hepatoma cells
 267 (19). In addition, KTC has a direct effect on hormonal secretion by pituitary cells; while lower
 268 concentrations of KTC do not affect ACTH levels(20), higher concentrations of the drug result
 269 in decreased basal ACTH levels, even after stimulus with CRH, suggesting direct inhibition of
 270 the adenylate cyclase system (8,21)

271 To understand the mechanism of action by which KTC decreases viability, we conducted an in
272 vitro study of apoptosis and cell cycle markers in pituitary immortalized tumoral cell lines
273 exposed to KTC, as previous studies have indicated that these pathways are involved in the
274 response to KTC treatment in non-pituitary cells (14,15).

275 We observed partial recovery of cell viability after KTC withdrawal, suggesting that the toxic
276 effect of KTC was not a non-specific or idiosyncratic effect. The inhibitory effects of KTC are
277 likely due to extrinsic apoptosis pathway activation, leading to higher expression of death
278 receptors such as Fas and TNFR (in GH3 and α T3.1 cells). Although we did not observe
279 increased death receptor expression in AtT-20 cells, we did observe increased expression of the
280 Bid gene together with a lack of variation in p53 gene expression (not shown), indirectly
281 indicating activation of the extrinsic apoptosis pathway in a p53-independent manner.

282 Furthermore, we are the first to report that KTC can lead to cell cycle arrest, as suggested by our
283 observations that KTC increased the gene expression of the cell cycle inhibitors p21 and p27 in
284 pituitary cells.

285 KTC reduced the gene expression of prolactin but not GH in GH3 cells, and it reduced the
286 expression of the alpha-subunit gene in α T3.1 cells; however, no changes in POMC expression
287 were observed in AtT-20 cells. This discrepancy was first suggested by Stalla et al (20), who
288 demonstrated that KTC significantly reduces ACTH levels mainly after CRH stimulus in
289 corticotropic cells.

290 We also observed increased expression of Ki67, an important marker of proliferation, in α T3.1
291 cells in the presence of KTC. This result is in contrast to the observed reduction in cell viability,
292 suggesting that Ki67 could have a different role in this context. This possibility is supported by
293 the results of Van Oijen et al (22) who demonstrated Ki67 positivity despite cell cycle arrest
294 caused by increased p21 in human osteosarcoma cells, indicating that not all Ki67-expressing
295 cells are proliferating cells. However, the presence of Ki67 may represent potential proliferation
296 after cell cycle arrest is overcome.

297 The aim of the present study was to analyze the role of KTC in corticotropic cells based on
298 clinical evidence indicating decreased ACTH secretion in vivo and in vitro. However, our
299 results revealed increased expression of genes involved in apoptosis and DNA replication in
300 response to KTC treatment in corticotroph cells as well as in other lineages, with the highest
301 expression in α T3-1 cells. These results indicate that KTC has potential therapeutic implications
302 in patients with functioning and non-functioning pituitary adenomas.

303 Therefore, at high concentrations, KTC appears to be a potential antitumor drug and may serve
304 as an adjunct medical therapy for pituitary adenomas. The adverse effects of KTC (17), such as

305 hepatotoxicity may be a major limiting factor for its use at higher doses. Thus, knowledge of the
306 mechanism of action of KTC could improve therapeutic strategies by enabling the discovery of
307 new drugs targeting specific pathways for the treatment of pituitary adenomas. However, the
308 limitation of our study was not to test the effect of KTC directly in pituitary tumor, nevertheless
309 we tried to establish primary pituitary cell culture, but the cells ceased hormone secretion after 8
310 weeks. Thus, we do not have access to an appropriate *in vivo* model to support the clinical
311 relevance of our currently findings in immortalized cells.

312 In conclusion, our findings suggest that KTC has the potential to reduce cell viability and
313 increase the expression of genes related to apoptosis and cell cycle regulation in pituitary cell
314 lineages.

315 **Acknowledgments**

316 We thank Dr. Madson Queiroz de Almeida for valuable discussions that helped to improve the
317 manuscript, also CNPQ for MFG fellowship grant and FAPESP for project financial support.
318 The author contributions were as follows: MFG, LRC, and MDB conceived the work, and MFG
319 performed the experiments and data analysis.

320 **References**

- 321 1. Freda PU, Wardlaw SL. Clinical review 110: Diagnosis and treatment of pituitary
322 tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Nov;84(11):3859–66.
- 323 2. Biller BMK, Grossman a B, Stewart PM, Melmed S, Bertagna X, Bertherat J, et al.
324 Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus
325 statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jul;93(7):2454–62.
- 326 3. Arafah BM, Nasrallah MP. Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations
327 and management. *Endocr Rel Cancer.* 2001 Dec;8(4):287–305.
- 328 4. Fleseriu M, Petersenn S. Medical management of Cushing's disease: what is the future?
329 *Pituitary.* 2012 Sep;15(3):330–41.
- 330 5. Loli P, Berselli ME, Tagliaferri M. Use of Ketoconazole in the Treatment of Cushing's
331 Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;63:1365–71.
- 332 6. Terzolo M, Panarelli M, Piovesan A, Torta M, Paccotti P, Angeli A. Ketoconazole
333 treatment in Cushing's disease. Effect on the circadian profile of plasma ACTH and
334 cortisol. *J Endocrinol Invest.* 1988;11(10):717–21.
- 335 7. Boscaro M, Sonino N, Rampazzo A, Mantero F. Response of pituitary-adrenal axis to
336 corticotrophin releasing hormone in patients with Cushing's disease before and after
337 ketoconazole treatment. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1987;27(4):461–7.
- 338 8. Stalla G, Stalla J, Huber M, Loeffler J, Höllt V, von Werder K, et al. Ketoconazole
339 inhibits corticotropic cell function in vitro. *Endocrinology.* 1988;122(2):618–23.

- 340 9. Jimenez Reina L, Leal-Cerro A, Garcia J, Garcia-Luna P, Astorga R, Bernal G. In vitro
341 effects of ketoconazole on corticotrope cell morphology and ACTH secretion of two
342 pituitary adenomas removed from patients with Nelson's syndrome. *Acta Endocrinol*
343 (Copenh). 1989;121(2):185–90.
- 344 10. Eichenberger T, Trachtenberger J, Toor P, Keating A. Ketoconazole: a possible direct
345 cytotoxic effect on prostate carcinoma cells. *J Urol*. 1989;141(1):190–1.
- 346 11. Ho Y, Tsai P, Yu C, Liu H, Chen R, Lin J. Ketoconazole-Induced Apoptosis through
347 P53-Dependent Pathway in Human Colorectal and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines.
348 *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998;153:39–47.
- 349 12. Lin K, Huang C, Cheng J, Tsai J, Lu Y, Chang H, et al. Ketoconazole-induced JNK
350 phosphorylation and subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells.
351 *Toxicol Vitro*. Elsevier Ltd; 2009;23:1268–76.
- 352 13. Oyama Y, Sakai H, Arata T, Okano Y, Akaike N, Sakai K, et al. Cytotoxic effects of
353 methanol, formaldehyde, and formate on dissociated rat thymocytes : A possibility of
354 aspartame toxicity. *Cell Biol Toxicol*. 2002;18:43–50.
- 355 14. Schafer-Korting M, Korting H, Dorn M, Mutschler E. Ketoconazole concentrations in
356 human skin blister fluid and plasma. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*.
357 1984;22(7):371–4.
- 358 15. Alton K. Determination of the antifungal agent, ketoconazole, in human plasma by high-
359 performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1980;221(2):337–44.
- 360 16. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The Angiotensin
361 AT2-Receptor Mediates Inhibition of Cell Proliferation in Coronary Endothelial Cells. *J*
362 *Clin Invest*. 1995;95:651–7.
- 363 17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time
364 quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
- 365 18. Castinetti F, Morange I, Jaquet P, Conte-Devolx B, Brue T. Ketoconazole revisited: a
366 preoperative or postoperative treatment in Cushing's disease. *Eur J Endocrinol*. 2008
367 Jan;158(1):91–9.
- 368 19. Loose DS, Stover EP, Feldman D. Ketoconazole Binds to Glucocorticoid Receptors and
369 Exhibits Glucocorticoid Antagonist Activity in Cultured Cells. *J Clin Invest*.
370 1983;72:404–8.
- 371 20. Burrin J, Yeo T, Ashby M, Bloom S. Effect of ketoconazole on adrenocorticotrophic
372 hormone secretion in vitro and in vivo. *J Endocrinol*. 1986;101(1):37–41.
- 373 21. Stalla G, Stalla J, von Werder K, Müller O, Gerzer R, Höllt V, et al. Nitroimidazole
374 derivatives inhibit anterior pituitary cell function apparently by a direct effect on the
375 catalytic subunit of the adenylate cyclase holoenzyme. *Endocrinology*. 1989;125(1):699–
376 706.
- 377 22. Van Oijen M, Medema R, Slootweg P, Rijksen G. Positivity of the proliferation marker
378 Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol*. 1998;110(1):24–31.