



JOÃO KLEBER NOVAIS PEREIRA

***Caracterização dos efeitos celulares e
moleculares de NVP-BKM120, um inibidor de
PI3K de classe I, em linhagens de leucemia
linfoide e linfoma***

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JOÃO KLEBER NOVAIS PEREIRA

***Caracterização dos efeitos celulares e moleculares de
NVP-BKM120, um inibidor de PI3K de classe I, em
linhagens de leucemia linfoide e linfoma***

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Patrícia Maria Bergamo Favaro

Co-orientadora: Dra Sara Teresinha Olalla Saad

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO JOÃO KLEBER NOVAIS PEREIRA
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. PATRÍCIA MARIA BERGAMO FAVARO**

Assinatura do Orientador

Campinas

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P414c Pereira, João Kleber Novais, 1980-
Caracterização dos efeitos celulares e moleculares
de NVP-BKM120, um inibidor de PI3K de classe I, em
linhagens de leucemia linfóide e linfoma / João Kleber
Novais Pereira. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Patrícia Maria Bergamo Favaro.
Coorientador : Sara Teresinha Olalla Saad.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. NVP-BKM120. 2. Leucemia linfóide. 3. Linhagem
celular. 4. Transdução de sinal. I. Favaro, Patrícia Maria
Bergamo. II. Saad, Sara Teresinha Olalla, 1956-. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Cellular and molecular characterization of NVP-BKM120, a class I
PI3K inhibitor in lymphoma and lymphoid cell lines

Palavras-chave em inglês:

NVP-BKM12

Leukemia, Lymphoid

Cell line

Signal transduction

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Patrícia Maria Bergamo Favaro [Orientador]

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Fernando Luiz Affonso Fonseca

Data da defesa: 30-10-2014

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

JOÃO KLEBER NOVAIS PEREIRA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). PATRÍCIA MARIA BERGAMO FAVARO

Coorientador (a) PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD

MEMBROS:

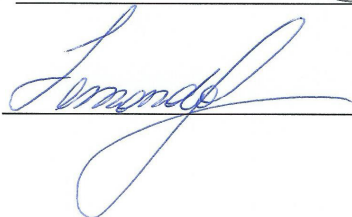
1. PROF(A). DR(A). PATRÍCIA MARIA BERGAMO FAVARO



2. PROF(A). DR(A). NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO



3. PROF(A). DR(A). FERNANDO LUIZ AFFONSO FONSECA



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 30 de outubro de 2014

RESUMO

As neoplasias linfoides constituem um grupo heterogêneo de doenças originadas por alterações genéticas das células progenitoras hematopoéticas de origem linfóide, levando à proliferação clonal desordenada de células B ou T, e ao desenvolvimento de leucemias linfoides e linfomas. É notória a participação de diferentes vias de sinalização envolvidas tanto no desenvolvimento como na manutenção das neoplasias hematológicas. A ativação constitutiva da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR é bem descrita na leucemia linfóide aguda de células T (LLA-T) e recentemente identificou-se, em modelos animais, que a atividade da PI3K coopera com o desenvolvimento do linfoma de Burkitt (LB). Deste modo, o papel da via PI3K/AKT/mTOR no crescimento e sobrevivência celular, duas características importantes da leucemogênese, transformou-a em um potencial alvo farmacológico. Seguindo essa perspectiva, o presente trabalho procurou avaliar o potencial terapêutico de NVP-BKM120, um pan-inibidor de PI3K de classe I, em linhagens celulares de LLA-T (Jurkat e MOLT-4) e LB (Daudi e NAMALWA). NVP-BKM120 foi capaz de diminuir a viabilidade celular e capacidade clonogênica dessas células. Foi observada uma parada na fase G₂/M do ciclo celular, com subsequente diminuição de Ciclina B1 e aumento da apoptose pelas vias intrínseca e extrínseca, nas linhagens Jurkat, MOLT-4 e NAMALWA. Também foi observada diminuição da fosforilação da AKT e dos alvos *downstream* ao mTORC1, P70S6K e 4EBP1, e aumento da razão BAX:BCL2. Houve um aumento da produção de AVOs nas linhagens celulares após o tratamento com a droga, o que sugere ativação da autofagia.

Portanto, este estudo demonstra a capacidade antitumoral de NVP-BKM120 contra linhagens celulares de LLA-T e LB. Nossos resultados sugerem que a diminuição da proliferação celular, após o tratamento com a droga, seja devido à redução da Ciclina B1 e que o aumento da razão BAX:BCL2 seja um dos mecanismos envolvidos na indução da apoptose.

Palavras chaves: NVP-BKM120. Sinalização. Leucemia linfoide. Linhagem celular

ABSTRACT

The lymphoid neoplasms are a heterogeneous group of diseases caused by genetic alterations that were originated from hematopoietic progenitor cells of lymphoid origin, leading to uncontrolled clonal proliferation of B or T cells, and to the development of lymphoid leukemias and lymphomas. These findings emphasize the involvement of different signaling pathways involved in both the development and the maintenance of hematological malignancies. Constitutive activation of the PI3K /AKT/mTOR signaling pathway is well described for acute lymphoblastic leukemia T cells (T-ALL), recently been identified in animal models, that the activity of PI3K cooperates with the development of Burkitt's lymphoma (LB). Thus, the role of the PI3K / AKT / mTOR pathway in cell growth and survival, two important features of leukemogenesis, morphed into a potential drug target. Following this perspective, the present study aimed to evaluate the therapeutic potential of NVP-BKM120, a pan-PI3K inhibitor class I in cell lines of T-ALL (Jurkat and MOLT-4) and LB (Daudi and NAMALWA). NVP-BKM120 was able to decrease cell viability and clonogenic capacity of these cells. A blocked phase was observed in G₂/M phase of the cell cycle with subsequent reduction of Cyclin B1 and increased apoptosis by the intrinsic and extrinsic pathways in the lines Jurkat and MOLT-4 NAMALWA. It was also observed, decreased phosphorylation of AKT and of the downstream targets mTORC1, p70S6K and 4EBP1, and an increase of BAX:BCL2 ratio. There was an increase in AVOs production in the cell lines after treatment with the drug, suggesting activation of autophagy. Therefore, this study demonstrates the antitumor ability of NVP-BKM120 against cell lines of T-ALL and LB. Our results suggest that the decrease in cell proliferation after treatment with the drug, is

due to the reduction of Cyclin B1 and the increase of the BAX:BCL2 ratio is one of the mechanisms that are involved in the induction of apoptosis.

Key words: NVP-BKM120. Signalling. Leukemia, Lymphoid. Cell line

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
SUMÁRIO	xi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xxi
LISTA DE TABELAS	xxv
LISTA DE FIGURAS	xxvii
<i>INTRODUÇÃO</i>	<i>1</i>
Leucemia linfoblástica aguda de células T.....	1
Linfoma não Hodgkin.....	2
Via da PI3K/AKT/mTOR.....	3
Sobrevivência.....	6
Proliferação	7
Crescimento	7
Autofagia e via PI3K/AKT/mTOR.....	8
Inibidores de PI3K na leucemia.....	9
Inibidores seletivos de p110 δ da PI3K.....	12
Inibidores duplos de PI3K	13
Pan-inibidores de PI3K.....	15
<i>OBJETIVOS</i>	<i>17</i>
Objetivos Gerais	17
Objetivos Específicos.....	17
<i>MÉTODOS</i>	<i>18</i>
MATERIAL e MÉTODOS	18
Cultura celular e reagentes.....	18
Ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT)	18
Cálculo da concentração inibitória para 50% das células (IC ₅₀)	19
Ensaio de formação de colônia	19
Avaliação de apoptose por marcação com anexina-V e PI	19
Ensaio de atividade de caspases	20
Western blot	20
Organelas Acídicas Vacuolares	22
Análise do ciclo celular	22

Análise estatística.....	23
RESULTADOS	24
O tratamento com NVP-BKM120 diminui a viabilidade das células LLA-T e LB.....	24
NVP-BKM120 diminui o crescimento clonal.....	25
O tratamento com NVP-BKM120 resulta em apoptose com ativação das vias extrínseca e intrínseca.....	26
NVP-BKM120 induz parada na fase G ₂ /M do ciclo celular	28
NVP-BKM120 na via de sinalização PI3K/AKT/mTOR	31
NVP-BKM120 aumenta a formação de organelas acídicas vacuolares	33
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIA	43

Dedicatória

Dedico esse trabalho a todos que me apoiaram em especial minha mãe Isabel, meu pai Benedito e minhas irmãs Kelly e Célia.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me guiar nos momentos mais difíceis, por me dar forças para enfrentar as dificuldades e sempre me demonstrando os melhores caminhos mesmo quando não os via.

Agradeço minha mãe e meu pai pelo apoio e carinho incondicional, compreensão, incentivo e respeito, mesmos quando não entendiam minhas escolhas estando todos os dias ao meu lado.

Agradeço a toda minha família pelo carinho e compreensão.

À minha orientadora Profa. Dra. Patrícia Favaro, pela sua fantástica orientação, confiança e apoio para a realização deste trabalho, um exemplo de pessoa e profissional que irei seguir e levarei por toda minha vida, obrigado pelos ensinamentos.

À Profa. Dra Sara Saad, por abrir as portas de seu laboratório, pelo acompanhamento do trabalho, apoiando-o com sua extrema competência científica, contribuindo com suas sugestões relevantes, demonstrando sua grande generosidade, liderança e conhecimento.

Aos amigos Matheus Lopes, João Agostinho, que sempre me ajudaram e me apoiaram nos experimentos sempre dividindo seus conhecimentos.

Aos meus amigos Sylvia Carolina, Natacha, Lucas Camargo, Giselle Kimura, Matheus Lopes, Fabiana Fantinatti, Fernanda Niemman, pelo apoio, alegrias, tristezas, aventuras, conversas, companhia e paciência nessa etapa da minha vida.

À Tereza Sueko, pela ajuda, amizade, ensinamentos e conselhos essenciais.

A toda equipe, colegas e funcionários de laboratório que sempre me ajudaram em diferentes momentos na realização desse trabalho: Victor, Andrana, Juares, Renata, Aline, Mariana Lazarini, Fernando, Fernanda Roversi, Letícia, Fabíola, Marisa, Anamika, Bruna, Rita, Flavia, Juliana, Laure, Vanessa, Ada, Renata

Scopin, Isabella, Karla Ferro, Ana Leda, Irene, Simone Sene, Rafaela, Paula, Bruno, Mariana Barati pelo apoio, carinho e auxílio em todos esses anos.

À Nicola Conran pelo auxílio na correção do inglês.

Aos funcionários do apoio didático pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

À secretária Patrícia e à analista administrativa Raquel pela disponibilidade em ajudar e pela amizade.

À secretária da pós-graduação Regina pela disponibilidade no serviço burocrático.

Aos membros da banca examinadora da minha defesa, por aceitarem fazer parte desta grande etapa da minha vida.

Ao Serviço de Estatística da Câmara de Pesquisa- FCM- Unicamp.

Às agências financiadoras, FAPESP, CNPq e INCT do sangue.

Epílogo

“Todo mundo quer viver em cima da montanha, sem saber que a verdadeira felicidade esta na forma de subir a escarpada...”

Gabriel Garcia Marquez

“Viva hoje! Arrisque hoje! Faça hoje! Não se deixe morrer lentamente! Não esqueça de ser feliz! Feliz... Feliz... Arriscar à fazer, para viver feliz!!!”

Pablo Neruda

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vence com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”

Charles Chaplin

LISTA DE ABREVIACÕES

4E-BP1 - Fator 4E de iniciação eucariótica de ligação proteica

AKT - v-akt murine thymoma viral oncogene homolog

AVO - Organelas acídicas vacuolares

BAD - BCL2-associated agonist of cell death

BCL2 - Proteína 2 de linfoma de células B (B-cell CLL/lymphoma 2)

BAX- BCL2-associated X protein

c-MYC - Proteína similar ao oncogene viral de mielocitomatoce (v-MYC)

DMSO - Dimetilsulfóxido

FKHR (FOXO1) – Forkhead Box O1

GDP - Guanosina difosfato

GSK3 β - Glicogênio sintase quinase 3 β

GTP - Guanosina trifosfato

HIF-1 α - Indutor de hypoxia 1-alfa

IC₅₀ - Concentração inibitória de 50%

LB - Linfoma de Burkitt

LLA - Leucemia linfoblástica aguda

LLA-B - Leucemia linfoblástica aguda de células B

LLA-T - Leucemia linfoblástica aguda de células T

LLC - Leucemia linfoblástica crônica

LMA - Leucemia mieloide aguda

LMC - Leucemia mieloide crônica

LNH - Linfoma não Hodgkin

mTOR - Alvo da rapamicina em mamíferos

mTORC1- Complexo alvo da rapamicina em mamíferos 1

mTORC2 - Complexo alvo da rapamicina em mamíferos 2

MTT - Methylthiazoletetrazolium

NF κ B - Fator nuclear kappa B

OMS - Organização Mundial da Saúde

p70S6K - Proteína ribossômica 70 kDa quinase

PDK1- Proteína quinase 1 dependente de fosfoinositol

PH - Domínio amino-terminal homólogo a pleckstrina

PI3K - Proteína Fosfatidilinositol 3 quinase

PIP2 - Fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato

PIP3 - Fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato

PTEN – Fosfatase homóloga a tensina

RTK – Receptor tirosina quinase

SFB – Soro fetal bovino

VEGF- Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de IC₅₀ (nM) dos inibidores de PI3K nas classes I, II e III..... 12

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da via PI3K/AKT e sua associação com funções celulares. A primeira e principal molécula efetora na cascata de sinalização é a AKT/proteína quinase B. Esta pode ser ativada por receptores tirosino quinases (RTKs), que incluem o receptor de fator de crescimento epidérmico, de fator de crescimento semelhante à insulina e acoplado à proteína G [38]. Quando PI3K é ativada, é gerado o segundo mensageiro fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PIP3) a partir do fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PIP2). PIP3 recruta na membrana celular várias proteínas com domínio PH, incluindo AKT [39, 40]. AKT é negativamente regulada pela fosfatase homóloga à tensina (PTEN) através da desfosforilação de PIP3 [41, 42]. O recrutamento de AKT para a membrana plasmática resulta na sua mudança conformacional, permitindo que a proteína quinase 1 dependente de fosfoinositol (PDK1), constitutivamente ativa, fosforile AKT no sítio de treonina 308 [43]. Para sua ativação total, AKT também precisa ser fosforilada no sítio serina 473; entretanto, não se sabe ao certo a proteína responsável por esta ativação (a proteína alvo da rapamicina em mamíferos - Complexo 2, mTORC2, é uma das candidatas) [44]. Após sua ativação, AKT transloca-se do citoplasma para o núcleo e fosforila vários substratos da via, incluindo mTORC1, envolvido no controle da tradução de diversas proteínas. A ativação de AKT regula diversas funções celulares, como demonstrado na figura (adaptado de [45, 46]). Linhas com seta representam a ativação e com barra no final representam a inibição. 5

Figura 2. As classes de PI3K. Existem três classes de PI3K, de acordo com suas características estruturais e especificidade de substrato. PI3K Classe IA são heterodímeros constituídos por uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). Em mamíferos, existem três genes, *PI3KCA*, *PI3KCB* e *PI3KCD*, que codificam as isoformas catalíticas p110: p110 α , p110 β e p110 δ , respectivamente. A expressão de p110 δ é geralmente restrita ao sistema imune, enquanto a expressão de p110 α e p110 β ocorre sem restrições [43, 73]. As isoformas catalíticas p110 são altamente homólogas e possuem cinco domínios distintos: um domínio de ligação p85 N-terminal (p85BD), que interage com a subunidade regulatória p85; um domínio de ligação com Ras (RasBD), que medeia a ativação dos membros da família Ras das GTPases; um domínio de ligação na membrana C2; um domínio helicoidal; e um domínio catalítico quinase C-terminal. Há também três genes, *PIK3R1*, *PIK3R2* e *PIK3R3*, que codificam as isoformas das subunidades regulatórias p85: p85 α (e seus *splicings* p55 α e p50 α), p85 β e p55 γ , respectivamente. Essas subunidades regulatórias apresentam três domínios que incluem um domínio de ligação a P110 (inter-SH2 ou iSH2), ladeado por dois domínios SH2 (N-terminal ou sSH2 e C-terminal ou cSH2). As duas isoformas mais longas, p85 α e p85 β , têm um domínio SH3 e um domínio BH localizados em suas regiões N-terminais. No estado basal, p85 liga-se à subunidade N-terminal do p110 via domínio iSH2, inibindo a atividade catalítica [73, 74]. PI3K Classe IB é um heterodímero composto por uma subunidade catalítica p110 γ e uma subunidade regulatória p101. p110 γ é expressa principalmente em leucócitos e pode ser ativada diretamente pelos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) [73]. PI3K Classe II são monômeros com uma única subunidade catalítica. Existem três isoformas de PI3K classe II, PI3KC2 α , PI3KC2 β e PI3KC2 γ , cada uma delas com um específico N-terminal seguido de um domínio RasBD, um domínio C2, um domínio

helicoidal e um domínio catalítico com domínios PX e C2 no C-terminal [43, 75]. PI3K Classe III consiste em uma única subunidade catalítica, homóloga a leveduras, Vps34 adaptado de [33]. 10

Figura 3. O composto NVP-BKM120. (A) Estrutura química de NVPBKM120. (B) Modelo de ligação, proposto pela Novartis®, de NVP-BKM120 com a isoforma p110 α da PI3K classe I [94]. 16

Figura 4. Determinação da IC₅₀ após o tratamento com a NVP-BKM120. O ensaio de MTT foi realizado após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de NVP-BKM120 (1, 10 e 50 μ M). Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. 24

Figura 5. NVP-BKM120 inibe a formação de colônia nas células Jurkat, MOLT-4, Daudi e NAMALWA. Colônias contendo células viáveis foram detectadas pela adição de MTT após 8 dias de incubação de células tratadas ou não com a droga (1, 10 e 50 μ M). A porcentagem do crescimento clonal foi normalizada pelas células sem tratamento (somente veículo-DMSO). Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$; teste t. 26

Figura 6: NVP-BKM120 tem efeito positivo na indução da apoptose celular. As células apoptóticas foram detectadas por citometria de fluxo nas linhagens celulares, incubadas na ausência ou presença da NVP-BKM120 (1, 10 e 50 μ M) por 6 horas, utilizando a marcação com anexina-V e PI. (A) Os gráficos são representativos de 3 experimentos independentes. O quadrante inferior direito contém a população de células apoptóticas (anexina-V+/PI-). O quadrante superior direito contém a população de células em estágio de necrose (anexina-V+/PI+). (B) Representação da média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$; teste t. 27

Figura 7: O tratamento com NVP-BKM120 por 3 horas resulta em maior atividade das caspases 3, 8 e 9. As linhagens foram tratadas por 1, 3 ou 6 horas com diferentes concentrações de NVP-BKM120 como indicado na figura. A % da atividade das caspases foi determinada através de citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ teste t. 28

Figura 8: O tratamento com NVP-BKM120 resulta numa parada do ciclo celular em G₂/M. As linhagens celulares foram tratadas por 12 ou 24 horas com diferentes concentrações da droga (1, 2 e 5 μ M) e marcadas com PI para avaliação das fases do ciclo em citômetro de fluxo. (A) Gráficos da análise do ciclo celular após 24 horas de tratamento com as doses da droga indicadas na figura; representativo de 3 experimentos independentes. (B) Representação da média de 3 experimentos independentes. (C) Western blot de extrato total proteico. Lisados celulares foram blotados com anticorpos Ciclina B1 e anti p-Stathmin 1 (Ser38). Em seguida, as membranas foram reblotadas com o anticorpo específico para a proteína total correspondente e também para actina. 31

Figura 9: Análise de western blot nas linhagens de LLA-T e LB tratadas com NVP-BKM120. Western blot de extrato total proteico das linhagens celulares tratadas com diferentes concentrações de NVP-BKM120 (1, 10 e 50µM). Lisados celulares foram blotados com anticorpos anti (A) p-AKT (Ser473),p-mTOR (Ser2448), anti p-p70S6K (Thr421/Ser424), anti p-4EBP1 (Thr70), (B) anti p-BAD (Ser136), anti-BAX e anti-BCL2. Em seguida as membranas foram reblotadas com os anticorpos específicos para as proteínas totais correspondentes e também para actina. (C) Representação gráfica da relação BAX:BCL2..... 32

Figura 10: NVP-BKM120 tem efeito positivo na formação de AVOs. A formação de AVOs foi detectada por citometria de fluxo nas linhagens celulares incubadas na ausência ou presença da NVP-BKM120 (1, 2 e 5 µM) por 24 horas, utilizando a marcação com laranja. (A) Os gráficos são representativos de 3 experimentos independentes. O quadrante inferior esquerdo contém a população de células sem AVOs (FL1). O quadrante superior esquerdo contém a população de células com AVOs (FL3). (B) Representação da média±DP de 3 experimentos independentes. ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$; teste t..... 34

INTRODUÇÃO

Leucemia linfoblástica aguda de células T

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é caracterizada por importantes alterações genéticas nos progenitores das células comprometidas na diferenciação em células T ou células B, dando origem respectivamente à LLA de células T (LLA-T) ou à LLA de células B (LLA-B) [1]. Nesta última década, o desenvolvimento de tecnologias moleculares avançadas, como o sequenciamento de nova geração, permitiu um avanço no entendimento das bases moleculares da LLA, da heterogeneidade biológica da doença e de seus fatores de risco [2].

A leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) é uma neoplasia agressiva caracterizada por proliferação e acúmulo de progenitores de células T na medula óssea e em tecidos linfoides [3]. É uma doença heterogênea, caracterizada por alterações sequenciais em proto-oncogenes, genes supressores de tumor, microRNAs e genes de vias de sinalização tanto das células-tronco hematopoéticas como de seus progenitores [1, 4, 5]. De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde, as LLA são caracterizadas pela presença de 20% ou mais linfoblastos na medula óssea [6].

A LLA é a neoplasia pediátrica mais comum, compreendendo 25% de todos os casos de câncer que ocorrem em crianças antes dos 15 anos e 19% dos casos naqueles com menos de 20 anos. O pico de prevalência de LLA em crianças está entre 2 e 5 anos de idade e corresponde a 80% de todas as leucemias que ocorrem até a idade de 15 anos [3, 7]. Atualmente, com o tratamento convencional, a sobrevida livre de eventos em 5 anos da LLA em

crianças está acima de 80% em centros especializados[8-10]. Entretanto, a LLA ainda é uma importante causa de morte por câncer na infância [11].

Embora a LLA seja a leucemia aguda mais comum em crianças, esta corresponde a apenas cerca de 20% dos casos de leucemia agudas em adultos [3], com pico de incidência acima dos 50 anos [12]. As taxas de sucesso no tratamento de LLA em adultos estão em torno de 40% na maioria dos estudos, com elevada morbimortalidade [8].

Recentemente, a ativação constitutiva da via PI3K/AKT/mTOR tem sido descrita na LLA-T, com consequente aumento de proliferação e sobrevivência celular e resistência às drogas. Aproximadamente 85% dos pacientes com LLA-T apresentam aumento da ativação de PI3K/AKT/mTOR ao diagnóstico [13, 14].

Linfoma não Hodgkin

O Linfoma não Hodgkin (LNH) é a neoplasia hematológica mais comum em adultos, caracterizado por um crescimento clonal e descontrolado de precursores linfoides B (85%)[15] ou T (15%) [16]. Dentro os LNH de linfócitos B, encontra-se o linfoma de Burkitt (LB), altamente agressivo, com alta taxa de proliferação celular e apoptose. O LB é caracterizado pela translocação cromossômica do proto-oncogene *c-MYC* no locus do gene da imunoglobulina, com consequente perda de sua regulação [17]. A proteína MYC é um fator de transcrição multifuncional que regula genes envolvidos em múltiplos processos celulares, incluindo crescimento celular, proliferação, ciclo celular, metabolismo e apoptose [18-20].

A desregulação de MYC no LB é uma potente promotora de transcrição de genes, síntese proteica, aumento da atividade metabólica e proliferação linfocitária [21-23]. Entretanto, a desregulação do *c-MYC* isoladamente não é suficiente para o desenvolvimento do linfoma. Uma questão crítica é **entender** como os linfomas se desenvolvem a partir da translocação do *c-MYC* e quais as outras alterações genéticas e mutações associadas que permitem que a célula seja capaz de tolerar o estresse induzido pela ativação do *c-MYC*. Dessa forma, determinar as alterações que ocorrem em paralelo à translocação do *c-MYC* nos linfomas pode ajudar na identificação de alvos terapêuticos mais específicos.

A correlação entre MYC e a atividade de PI3K já foi demonstrada em diferentes modelos celulares [24-28]. Na década de 90, Curnock e Knox demonstraram a importância da via PI3K na proliferação e sobrevivência do LB [29]. Schmitz e colaboradores, usando as tecnologias de sequenciamento de RNA e RNA de interferência, também sugeriram que a via PI3K coopera com MYC no LB [30]. Em 2012, através do estabelecimento de modelo animal, foi comprovada a cooperação entre *c-MYC* e a sinalização da via PI3K no desenvolvimento do LB [31]. Atualmente, a via PI3K é apontada como um promissor alvo terapêutico no LB.

Via da PI3K/AKT/mTOR

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR possui um importante papel em várias funções celulares, incluindo crescimento, diferenciação, sobrevivência, apoptose e síntese proteica [32, 33]. Essa via de sinalização consiste em uma cascata complexa de eventos que inclui quinases específicas, fosfatases, proteínas

trocadoras de GTP por GDP, proteínas adaptadoras e âncoras [34]. Um resumo desta via de sinalização é apresentado na Figura 1. A primeira e principal molécula efetora na cascata de sinalização da via PI3K é a AKT/proteína quinase B [35, 36]. A ativação da AKT inicia-se na ligação do domínio amino-terminal homólogo a pleckstrina (domínio PH) à membrana plasmática [35]. Em seguida, a AKT é ativada via fosforilação de dois resíduos: treonina 308 e serina 473 [36]. Após sua completa ativação, a AKT é translocada para o núcleo celular, onde é capaz de modular a atividade de reguladores de transcrição e outras moléculas [37]. Estes são substratos diretos ou indiretos da AKT e podem promover tanto a proliferação como a sobrevivência celular. A regulação negativa da via é feita primariamente através da ação da fosfatase homóloga à tensina (PTEN) [37].

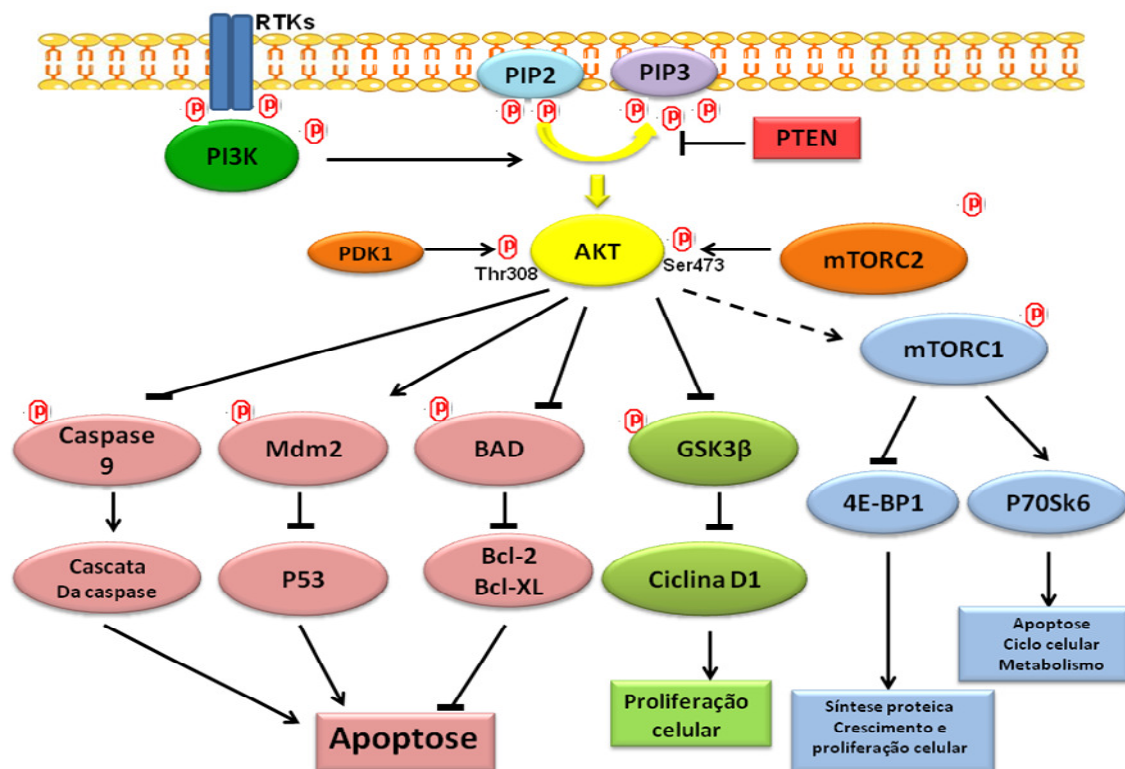


Figura 1. Representação esquemática da via PI3K/AKT e sua associação com funções celulares. A primeira e principal molécula efetora na cascata de sinalização é a AKT/proteína quinase B. Esta pode ser ativada por receptores tirosino quinases (RTKs), que incluem o receptor de fator de crescimento epidérmico, de fator de crescimento semelhante à insulina e acoplado à proteína G [38]. Quando PI3K é ativada, é gerado o segundo mensageiro fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PIP3) a partir do fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PIP2). PIP3 recruta na membrana celular várias proteínas com domínio PH, incluindo AKT [39, 40]. AKT é negativamente regulada pela fosfatase homóloga à tensina (PTEN) através da desfosforilação de PIP3 [41, 42]. O recrutamento de AKT para a membrana plasmática resulta na sua mudança conformacional, permitindo que a proteína quinase 1 dependente de fosfoinositol (PDK1), constitutivamente ativa, fosforile AKT no sítio de treonina 308 [43]. Para sua ativação total, AKT também precisa ser fosforilada no sítio serina 473; entretanto, não se sabe ao certo a proteína responsável por esta ativação (a proteína alvo da rapamicina em mamíferos - Complexo 2, mTORC2, é uma das candidatas) [44]. Após sua ativação, AKT transloca-se do citoplasma para o núcleo e fosforila vários substratos da via, incluindo mTORC1, envolvido no controle da tradução de diversas proteínas. A ativação de AKT regula diversas funções celulares, como demonstrado na figura (adaptado de [45, 46]). Linhas com seta representam a ativação e com barra no final representam a inibição.

A desregulação da via PI3K tem sido associada à oncogênese e à progressão de doença em tumores sólidos e neoplasias hematológicas, e resulta em aumento da resistência à terapia antineoplásica e pior prognóstico [32, 33, 47, 48]. Alterações na ativação da PI3K/AKT foram descritas em leucemias mieloides crônicas (LMC), 50 a 80% das leucemias mieloides agudas (LMA) e em até 88% das LLA-T [13, 49, 50]. As principais consequências da ativação de AKT relevantes para o crescimento neoplásico podem ser classificadas em 3 categorias: sobrevivência, proliferação (aumento do número de células) e crescimento (aumento do tamanho celular). Outro efeito adicional da ativação de AKT consiste na indução da angiogênese tumoral via fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) [51].

Sobrevivência

É sabido que a célula neoplásica possui mecanismos que inibem a apoptose, com consequente sobrevida prolongada. A ativação de AKT protege a célula da morte celular de forma multifatorial, uma vez que AKT fosforila diretamente vários componentes que participam deste processo. Por exemplo, BAD é um membro pró-apoptótico da família BCL2, que promove a morte celular ao se ligar ao BCL-XL, mas esta interação é inibida pela fosforilação de BAD via AKT [52]. Do mesmo modo, AKT inibe a atividade catalítica da caspase 9 através da sua fosforilação [53]. AKT também fosforila um dos fatores de transcrição da família Forkhead, FKHR, impedindo sua translocação nuclear e a síntese de várias proteínas pró-apoptóticas, como o ligante de FAS e o mediador de morte celular que interage com BCL-2 (BIM) [54]. AKT também

possui efeitos indiretos na indução da sobrevivência celular através de dois reguladores centrais de morte celular: fator nuclear kappa B (NFκB) e p53 [55-58]. NFκB é um promotor de sobrevivência celular e AKT exerce um efeito positivo em sua função. AKT fosforila e ativa a quinase que induz a degradação do inibidor de NFκB, IκB [55]. AKT também fosforila MDM2, facilitando sua translocação nuclear e ligação ao supressor de tumor pró-apoptótico, p53, resultando na sua degradação [57, 58].

Proliferação

AKT trabalha em paralelo com a via RAS-MAPK, resultando em proliferação celular, e interage com proteínas que participam do ciclo celular [59, 60]. AKT previne a degradação e conseqüentemente o acúmulo de ciclina D1, uma importante quinase para a transição G1/S, através da fosforilação de glicogênio sintase quinase 3β (GSK3β) [61].

Crescimento

Embora os termos proliferação e crescimento celular pareçam sinônimos, é importante esclarecer que a proliferação refere-se à divisão celular, e resulta no aumento do número de células. Já o crescimento refere-se à síntese de macromoléculas que levam ao aumento da massa celular [62]. Em geral, as células neoplásicas apresentam esse aumento na sua massa para suportar melhor a proliferação exacerbada. A proteína central reguladora do crescimento celular é o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), ativada diretamente pela AKT [63]. mTOR ativa a quinase p70S6 e inibe 4E-BP1, resultando no aumento de síntese proteica [51].

Autofagia e via PI3K/AKT/mTOR

A autofagia é um processo catabólico que envolve o engolfamento de proteínas e organelas inteiras dentro de vesículas (autofagossoma). Em seguida, os autofagossomas fundem-se com os lisossomas, onde ocorre degradação e reciclagem do conteúdo [64]. Ela atua como um mecanismo de sobrevivência, quando a célula está sob estresse, para a manutenção da integridade celular [65]. Contrariamente, sob algumas circunstâncias, as células autofágicas podem desencadear um modo específico de morte celular, denominado morte celular de tipo II ou morte celular autofágica (ACD), que é morfologicamente e bioquimicamente diferente da apoptose [64]. Um dos principais reguladores negativos da autofagia é o mTOR. A presença de fator de crescimento semelhante à insulina e de outros fatores de crescimento resulta na ativação de componentes da via PI3K/AKT, incluindo mTOR. Sua ativação, que culmina na produção de fatores de crescimento e nutrientes, inibe a autofagia [66].

A hipótese emergente é de que a autofagia tem uma função anticarcinogênica em células primárias, pois resulta em proteção contra o estresse metabólico, através do equilíbrio na remoção de agregados proteicos e renovação mitocondrial [65, 67]. Já em tumores estabelecidos, pelo contrário, acredita-se que o processo autofágico possa contribuir para a sobrevivência das células tumorais, que estão em contínuo estresse metabólico devido às altas taxas de proliferação e exposição a condições de hipóxia [67]. A autofagia provavelmente exerce uma influência multifatorial tanto na iniciação e progressão do câncer, como também na resposta às intervenções terapêuticas. A indução da autofagia tem sido apontada como um potencial terapêutico para

contornar a resistência à apoptose, principalmente em neoplasias hematológicas. Embora os agentes quimioterápicos possam induzir apoptose e autofagia ao mesmo tempo, é importante ressaltar que células leucêmicas insensíveis à indução de apoptose geralmente respondem ao estímulo que ativa a ACD, considerada um mecanismo adicional de morte celular [68, 69]. Um exemplo é o uso de glicocorticoides no tratamento de leucemias linfoides. Além de induzir morte celular, sabe-se que estas drogas induzem autofagia, processo que antecede a morte celular [70, 71]. Já foi descrito que, em células de LLA, a inibição da autofagia resulta no comprometimento de apoptose induzida pela dexametasona [71].

Inibidores de PI3K na leucemia

Existem três classes de PI3Ks agrupadas de acordo com sua estrutura e função. PI3K Classe I é a mais relacionada com o câncer humano [72]. A Figura 2 explica resumidamente as classes de PI3K.

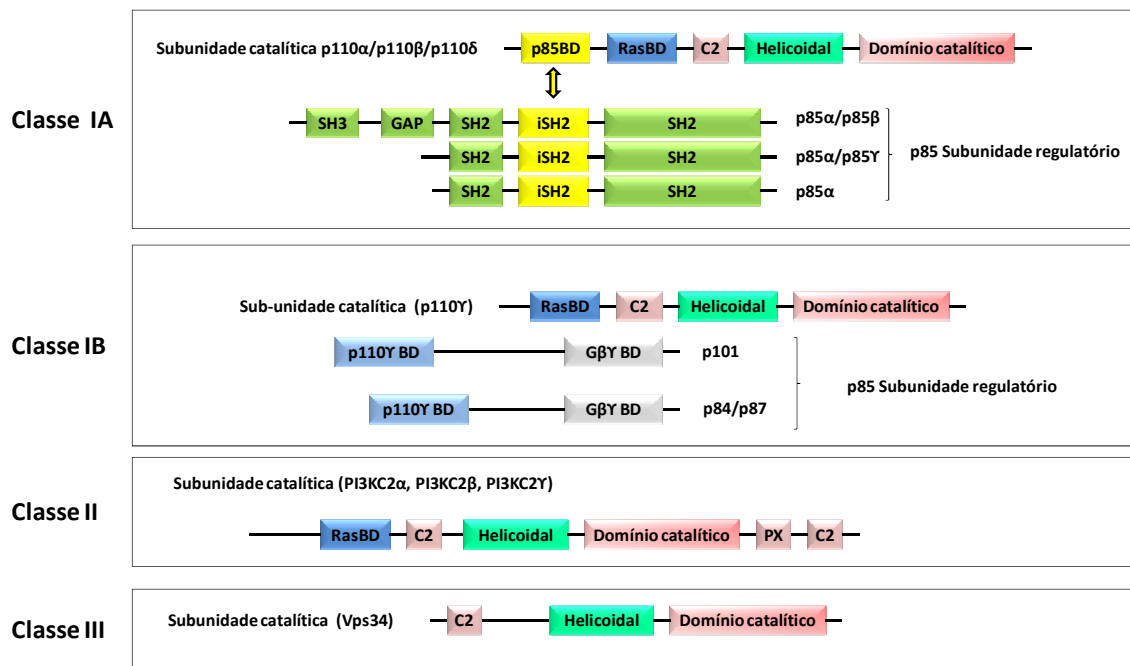


Figura 2. As classes de PI3K. Existem três classes de PI3K, de acordo com suas características estruturais e especificidade de substrato. PI3K Classe IA são heterodímeros constituídos por uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). Em mamíferos, existem três genes, *PI3KCA*, *PI3KCB* e *PI3KCD*, que codificam as isoformas catalíticas p110: p110α, p110β e p110δ, respectivamente. A expressão de p110δ é geralmente restrita ao sistema imune, enquanto a expressão de p110α e p110β ocorre sem restrições [43, 73]. As isoformas catalíticas p110 são altamente homólogas e possuem cinco domínios distintos: um domínio de ligação p85 N-terminal (p85BD), que interage com a subunidade regulatória p85; um domínio de ligação com Ras (RasBD), que medeia a ativação dos membros da família Ras das GTPases; um domínio de ligação na membrana C2; um domínio helicoidal; e um domínio catalítico quinase C-terminal. Há também três genes, *PIK3R1*, *PIK3R2* e *PIK3R3*, que codificam as isoformas das subunidades regulatórias p85: p85α (e seus *splicings* p55α e p50α), p85β e p55γ, respectivamente. Essas subunidades regulatórias apresentam três domínios que incluem um domínio de ligação a P110 (inter-SH2 ou iSH2), ladeado por dois domínios SH2 (N-terminal ou sSH2 e C-terminal ou cSH2). As duas isoformas mais longas, p85α e p85β, têm um domínio SH3 e um domínio BH localizados em suas regiões N-terminais. No estado basal, p85 liga-se à subunidade N-terminal do p110 via domínio iSH2, inibindo a atividade catalítica [73, 74]. PI3K Classe IB é um heterodímero composto por uma subunidade catalítica p110γ e uma subunidade regulatória p101. p110γ é expressa principalmente em leucócitos e pode ser ativada diretamente pelos receptores acoplados à proteína G

(GPCRs) [73]. PI3K Classe II são monômeros com uma única subunidade catalítica. Existem três isoformas de PI3K classe II, PI3KC2 α , PI3KC2 β e PI3KC2 γ , cada uma delas com um específico N-terminal seguido de um domínio RasBD, um domínio C2, um domínio helicoidal e um domínio catalítico com domínios PX e C2 no C-terminal [43, 75]. PI3K Classe III consiste em uma única subunidade catalítica, homóloga a leveduras, Vps34 adaptado de [33].

A isoforma p110 δ da PI3K é um alvo terapêutico importante nas leucemias, uma vez que esta isoforma é a mais expressa em leucócitos [76]. Vários estudos mostram a maior ativação da isoforma p110 δ em comparação com as isoformas p110 α e p110 β em pacientes com leucemia [77, 78]. Atualmente, além dos inibidores seletivos de p110 δ da PI3K, estão disponíveis os inibidores duplos e os pan-inibidores de PI3K (Tabela 1) [79].

Tabela 1: Valores de IC50 (nM) dos inibidores de PI3K nas classes I, II e III

Inibidor	Classe I				Classe II	Classe III
	P110 α	P110 β	P110 γ	P110 δ		
Idelalisib	820	565	89	2,5	>10 ³	978
AMG319	—	—	—	<10	—	—
IC87114	1.820	>1.000	1.240	70	—	—
BEZ235	4	75	5	7	—	—
BAG956	56	446	117	35	—	—
BGT226	4	63	—	38	—	—
PI-103	2	3	15	3	—	—
IPI-145	1.602	85	27	2,5	—	—
BKM120	52	166	262	116	—	2.410

Nota: o traçado indica dado não disponível (adaptado de [79])

Inibidores seletivos de p110 δ da PI3K

Idelasilinib

O idelalisib, inibidor altamente específico da isoforma p110 δ da PI3K, já foi estudado em leucemias, linfomas e mieloma múltiplo. Atualmente, estudos em fase I/II estão em andamento, focados principalmente em pacientes com recaída de doença [79]. *In vitro*, já foi demonstrada, a capacidade do idelalisib

em induzir apoptose, inibir a resposta aos sinais de sobrevivência e sensibilizar as células leucêmicas à quimioterapia [76, 77, 80]. Também foi observado efeito benéfico da associação com lenalidomida [81] em LLC e com bortezomib em mieloma múltiplo [82].

AMG319

Um inibidor da isoforma p110 δ , apresenta apenas um estudo clínico para neoplasia hematológica em andamento especificamente para pacientes com LLC/linfoma [79]. Embora seja um potente inibidor da ativação de AKT, com redução efetiva do número de células viáveis, há uma variação de resposta entre diferentes linhagens celulares [83].

IC87114

Outro inibidor específico de p110 δ , IC87114, ainda está na fase de estudos pré-clínicos. IC87114 inibe seletivamente, *in vitro*, a proliferação de blastos de LMA sem toxicidade às células hematopoiéticas normais [78, 84].

Inibidores duplos de PI3K

Os domínios catalíticos das subunidades p110 da PI3K e mTOR são estruturalmente semelhantes, pois todos pertencem à mesma família de quinases. Assim, os inibidores duplos de PI3K resultam na inibição de todas as isoformas catalíticas de PI3K e também de mTORC1 e mTORC2.

BEZ235

Estudos pré-clínicos mostram que BEZ235 tem a capacidade de induzir apoptose e reduzir a sobrevivência de células de LMA sem toxicidade significativa às células CD34⁺ [85]. Também já foi mostrado um efeito aditivo de BEZ235 com dexametasona, doxorubicina e bortezomib [86]. BEZ235 inibe com sucesso a ativação de AKT, mTOR e S6K em linhagens de linfoma [87].

Atualmente há um estudo para pacientes com leucemia aguda (LLA, LMA e LCM com crise blástica), tanto com recaída ou refratários aos tratamentos.

BAG596

BAG596 tem capacidade de inibir a fosforilação de AKT sem alterar os níveis totais da proteína em linhagens celulares de LMA com mutação em FLT3 e de LMC, sendo demonstrado efeito sinérgico com imatinib, nilotinib e rapamicina [79, 88].

BGT226

BGT226 já foi testado em linhagens e células de pacientes com mieloma múltiplo e em células de pacientes com leucemia aguda. Esta droga induz apoptose (mediada pela clivagem da pró-caspase 3) e inibe a proliferação celular [89, 90].

PI-103

Embora PI-103 seja mais seletivo para a isoforma p110 α , este ainda possui algum efeito inibitório para a subunidade P110 δ [91]. Em células de LMA, o tratamento com PI-103 resulta em parada do ciclo celular em G1. O tratamento com PI-103 resulta em morte celular tanto de células de LLC como de células mononucleares de sangue periférico [92]. Além disso, PI-103 sensibiliza as células de LLC para o tratamento com fludarabina [93].

IPI-145

IPI-145 é um potente inibidor das isoformas p110 δ e P110 γ da PI3K. Quando comparado diretamente com o idelalisib, IPI-145 é 14 vezes mais potente para inibir a isoforma p110 δ da PI3K. Atualmente, há três estudos clínicos para pacientes com linfoma (www.clinicaltrial.gov).

Pan-inibidores de PI3K

NVP-BKM120 (BKM120)

Também conhecido como buparlisib (Figura 3), é um potente inibidor de todas as isoformas da PI3K classe I. BKM120 também inibe as formas mais comuns de mutação somática das isoformas p110 α , β , γ e δ de PI3K [94]. Estudos mostram que NVP-BKM120 possui um grande efeito antiproliferativo e pró-apoptótico em linhagens celulares e modelos animais de tumor sólido através da inibição específica da função biológica da AKT [95-98]. Em um estudo clínico de fase I, em pacientes com tumores sólidos avançados, BKM120 foi bem tolerado e seguro [96]. Atualmente, este composto está em mais de 77 estudos clínicos de fases I a III, sozinho ou em combinação com outras drogas, para pacientes com tumores sólidos avançados, linfomas e leucemias avançadas (www.clinicaltrials.gov). BKM120 já foi testado em linhagens celulares de linfoma, LLC e LLA, resultando em efeitos pró-apoptóticos [97-100]. Em linhagens celulares e células de pacientes com mieloma múltiplo, BKM120 resultou em inibição do crescimento celular e apoptose, com citotoxicidade menor aos linfócitos normais [95]. Em um estudo de fase I de escalonamento de dose, em pacientes com tumores sólidos avançados, BKM120 foi seguro e bem tolerado na dose máxima diária de 100mg [96]. Os efeitos adversos relatados foram exantema, hiperglicemia, diarreia, anorexia, alteração de humor, náusea, fadiga, prurido e mucosite, o que provavelmente seja um reflexo dos efeitos da inibição de PI3K em tecidos normais [96].

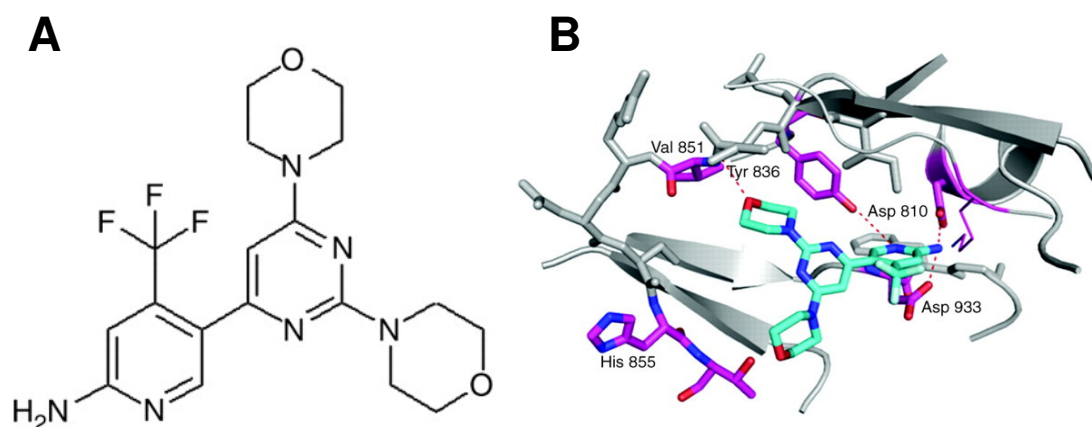


Figura 3. O composto NVP-BKM120. (A) Estrutura química de NVPBKM120. (B) Modelo de ligação, proposto pela Novartis®, de NVP-BKM120 com a isoforma p110 α da PI3K classe I [94].

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Estudar os efeitos celulares e moleculares de BKM120 em linhagens celulares de leucemia linfóide de célula T (Jurkat e MOLT-4) e de célula B (Daudi e NAMALWA).

Objetivos Específicos

1. Estudar a viabilidade celular para determinação da concentração inibitória para 50% das células (IC_{50}) de BKM120 nas linhagens celulares Jurkat, MOLT-4, Daudi e NAMALWA;
2. Nas mesmas linhagens celulares, avaliar o efeito de BKM120 em:
 - a. Indução da apoptose;
 - b. Ciclo celular;
 - c. Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR;
 - d. Formação de organelas acídicas vacuolares.

MÉTODOS

MATERIAL e MÉTODOS

Cultura celular e reagentes

As linhagens celulares de LLA-T, Jurkat e MOLT-4, e as linhagens celulares de Linfoma de Burkitt, NAMALWA e Daudi, foram obtidas da ATCC (Philadelphia, PA, USA). As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina e anfotericina B, e mantidas a 37°C, 5% CO₂. À droga NVP-BKM120, fornecida pela Novartis®, foi preparada uma solução estoque de 10 mM diluída em DMSO (veículo) e diferentes concentrações foram utilizadas (0µM, 1µM, 2 µM, 5µM, 10µM e 50µM). Como controle negativo em todos os experimentos, utilizamos o veículo no mesmo volume de diluição da droga.

Ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT)

A viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT; Sigma, MO, EUA). As células controle e tratadas com NVP-BKM120 foram submetidas à privação total de soro fetal bovino (SFB) por 16 horas. Um total de 5×10^4 células por poços foram semeadas em placa de 96 poços em meio RPMI 10% SFB na ausência ou presença de diferentes concentrações de BKM120 (0, 1, 10 e 50 µM) por 48 horas. Em resumo, 10 µL de uma solução a 5mg/mL de MTT foi adicionada aos poços e incubada a 37°C por 4 horas. A reação foi parada pela adição de 100 µL de 0,1N HCl em isopropanol. O crescimento celular foi avaliado pela

mensuração da absorbância a 570 nm, utilizando um leitor automático de placas. Todas as condições foram testadas em quintuplicadas.

Cálculo da concentração inibitória para 50% das células (IC₅₀)

Para o cálculo da IC₅₀ foi utilizado o modelo de regressão não linear hiperbólico [101].

Ensaio de formação de colônia

A formação de colônia foi realizada em meio semissólido de metilcelulose (3x10³ células/mL; MethoCut 4230; StemCell Technologies Inc., BC, Canadá). As colônias foram detectadas após 8 dias de cultura pela adição de 1mg/mL de reagente MTT e as contagens foram realizadas com o auxílio do *Image J quantification software* (U.S. National Institutes of Health, MD, USA). As células foram submetidas aos ensaios de formação de colônia na ausência ou presença de BKM120 (0, 1, 10 e 50µM). Todas as condições foram testadas em triplicatas.

Avaliação de apoptose por marcação com anexina-V e PI

As células foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com diferentes concentrações de NVP-BKM120 (0, 1, 10 e 50µM) por 6 horas. As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em tampão de ligação contendo 1µg/mL de PI e 1µg/mL APC anexina-V (Becton-Dickinson, CA, USA). Após incubação no escuro durante 15 minutos em temperatura ambiente, todas as amostras foram analisadas em um citômetro FACSCalibur. Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

Ensaio de atividade de caspases

A atividade de caspases foi medida conforme as instruções recomendadas pelo fabricante (Calbiochem, CA, EUA). As células foram semeadas em placas de 12 poços em meio RPMI e tratadas com diferentes concentrações de NVP-BKM120 (0, 1, 10, e 50 μ M) por 1, 3 e 6 horas. Em seguida, as células foram incubadas com Red-IETD-FMK para caspase 8, Red-LEHD-FMK para caspase 9 e FITC-DEVD-FMK para caspase 3 (1:500) durante 40 minutos a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. As células foram então lavadas duas vezes em tampão gelado, ressuspensas em 300 μ L e analisadas por citometria de fluxo.

Western blot

Ao precipitado celular contendo de 5x10⁶ a 1x10⁷ células foi adicionado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7,6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/mL, 10 mM Na₃VO₄, 100 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas e incubadas por 40 minutos no gelo e então centrifugadas na mesma temperatura durante 20 minutos, para remoção dos restos celulares. Ao extrato total proteico, adicionou-se tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aqueceu-se em água fervente por 5 minutos. Após isso, as amostras foram submetidas à eletroforese ou armazenadas a -80°C. As proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10-15% - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). A eletrotransferência das proteínas do gel foi realizada por 90 minutos a 120V

(constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% de leite em pó magro, 10mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0,02% Tween 20) . A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (3% de leite em pó magro, 10mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0,02% Tween 20) durante a noite, a 4°C, e então lavadas três vezes com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20). Os anticorpos primários obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) foram: p-AKT (Ser473; sc-7985-R), AKT1/2 (sc-8312), p-P70S6K (Thr421/Ser424; sc-7984), P70S6K (sc-8418), p-BAD (Ser136; sc-7999), BAD (sc-943), BAX (sc-20067), BCL2 (sc-492), stathmin (sc55531), p-stathmin (Ser38, sc10810), mTOR (sc1550R) e actina (sc-1616). Os anticorpos primários obtidos da Cell Signaling Technology (Cell Signaling, MA, USA) foram: p-mTOR (Ser2448;2971), p-4EBP1(Thr70; 9455) e 4EBP1 (9452). O sistema de revelação usado foi baseado em quimioluminescência e realizado de acordo com orientações do fabricante, ECL TM Western Bolt Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Em resumo, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado a HRP (Horseradish peroxidase), lavadas novamente e submetidas ao substrato da enzima, resultando em um produto luminescente, detectados por autoradiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, NY, USA). A detecção da quimioluminescência foi realizada também através do aparelho fotodocumentador Uvitec Cambridge (UVItec Limited, UK). Análises quantitativas da intensidade das bandas de proteínas foram determinadas utilizando o

programa Scion Image Software (ScionCorp, Frederick, MD USA). A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão de actina e a intensidade da fosforilação proteica foi normalizada pela expressão da proteína correspondente.

Organelas Acídicas Vacuolares

As organelas acídicas vacuolares (AVO; acidic vesicular organelles) foram mensuradas pela marcação com corante laranja de acridina e analisadas por citometria de fluxo. As linhagens celulares foram semeadas em placas de 6 poços e tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de NVP-BKM120 (0, 1, 2, e 5 μ M). Em seguida, as células foram coletadas, lavadas com solução PBS e incubadas com meio contendo 0,1 μ g/mL de laranja de acridina, no escuro, por 15 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas e analisadas para quantificação de AVOs em FACSCalibur (Becton-Dickinson, CA, USA).

Análise do ciclo celular

As células foram fixadas em etanol 70% gelado, por pelo menos 2 horas a 4°C antes das análises e incubadas com 20 μ g/mL de iodeto de propídio (propidium iodide; PI) contendo 10 μ g/mL de RNase A por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. As análises da fluorescência celular foram realizadas com um FACSCalibur (Becton-Dickison, CA, USA). Os resultados das distribuições do DNA foram analisados pelo Modifit (Verify Software House Inc., ME, USA) para determinar as proporções de células nas diferentes fases do ciclo celular.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando software GraphPad 5 (GraphPad Software, Inc, CA, USA). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). As comparações entre os grupos controle e tratados (comparações entre dois grupos) foram feitas usando o teste t [102]. Valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

O tratamento com NVP-BKM120 diminui a viabilidade das células LLA-T e LB

As linhagens celulares Jurkat, Molt-4, Daudi e Namalwa foram tratadas com diferentes concentrações (1, 10 e 50 μ M) de NVP-BKM120 e após 48 horas a viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT. Em todas as células testadas, o tratamento com NVP-BKM120 resultou na diminuição dose-dependente da viabilidade celular. A IC₅₀, ou seja, a dose necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular, foi de 4,3 μ M para as células Jurkat, 9,1 μ M para MOLT-4, 7,1 μ M para Daudi e 8,6 μ M para NAMALWA (Figura 4).

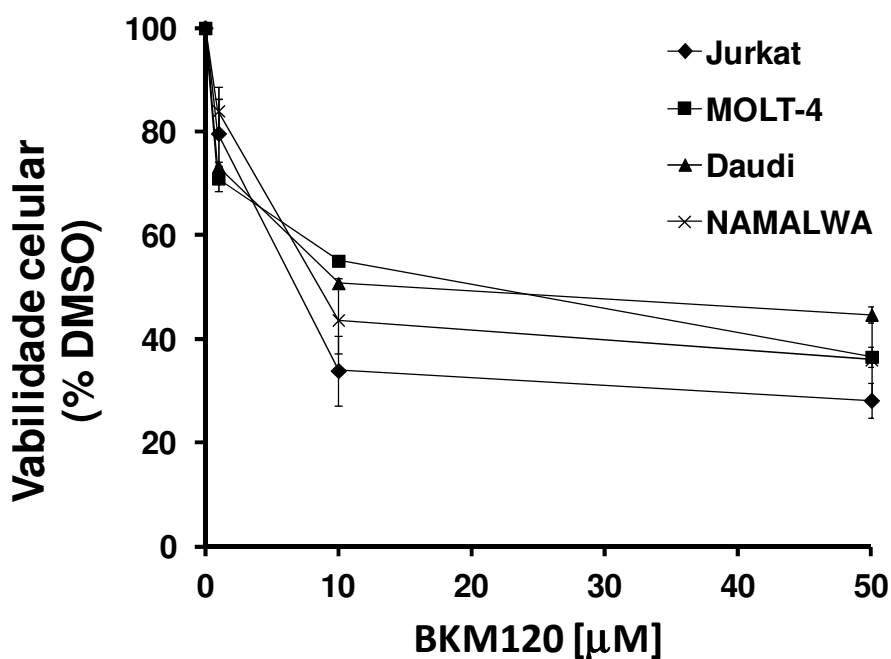


Figura 4. Determinação da IC₅₀ após o tratamento com a NVP-BKM120. O ensaio de MTT foi realizado após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de NVP-BKM120 (1, 10 e 50 μ M). Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

NVP-BKM120 diminui o crescimento clonal

O efeito de NVP-BKM120 nas linhagens celulares também foi determinado através do ensaio de clonogenicidade, uma vez que somente uma fração das células semeadas retém a capacidade de produzir colônias [103]. As células foram cultivadas em meio de metilcelulose com diferentes concentrações (1, 10 e 50 μ M) da droga, e as colônias foram detectadas após 8 dias de cultura. Para todas as células testadas, houve uma diminuição significativa no número de colônias já na concentração de 1 μ M e ausência total de colônias a partir da concentração de 10 μ M (Figura 5).

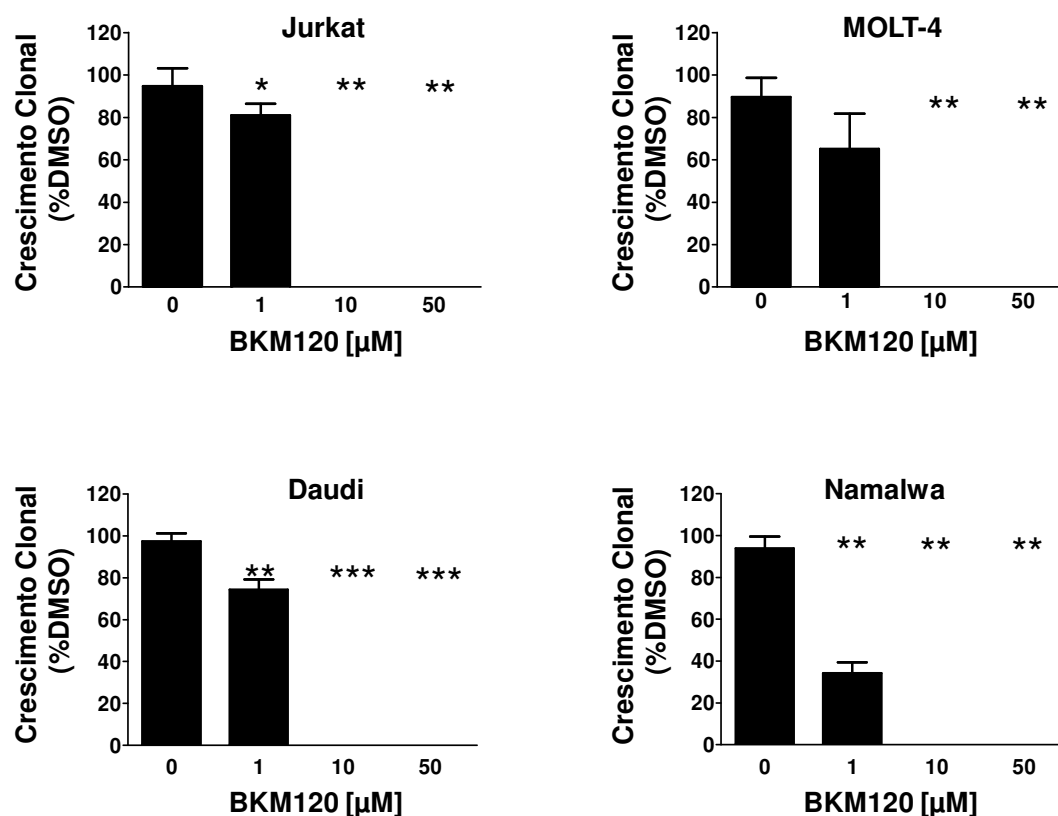


Figura 5. NVP-BKM120 inibe a formação de colônia nas células Jurkat, MOLT-4, Daudi e NAMALWA. Colônias contendo células viáveis foram detectadas pela adição de MTT após 8 dias de incubação de células tratadas ou não com a droga (1, 10 e 50μM). A porcentagem do crescimento clonal foi normalizada pelas células sem tratamento (somente veículo-DMSO). Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$; teste t.

O tratamento com NVP-BKM120 resulta em apoptose com ativação das vias extrínseca e intrínseca

Os efeitos de NVP-BKM120 foram testados na indução da apoptose. Para tanto, as linhagens celulares foram tratadas com diferentes concentrações de NVP-BKM120 por 6 horas e subsequentemente marcadas com anexina V-APC/PI. A Figura 6 mostra um aumento significativo de células Anexina-V+/PI-,

ou seja, um aumento da taxa de apoptose, para as células Jurkat, MOLT-4 e NAMALWA.

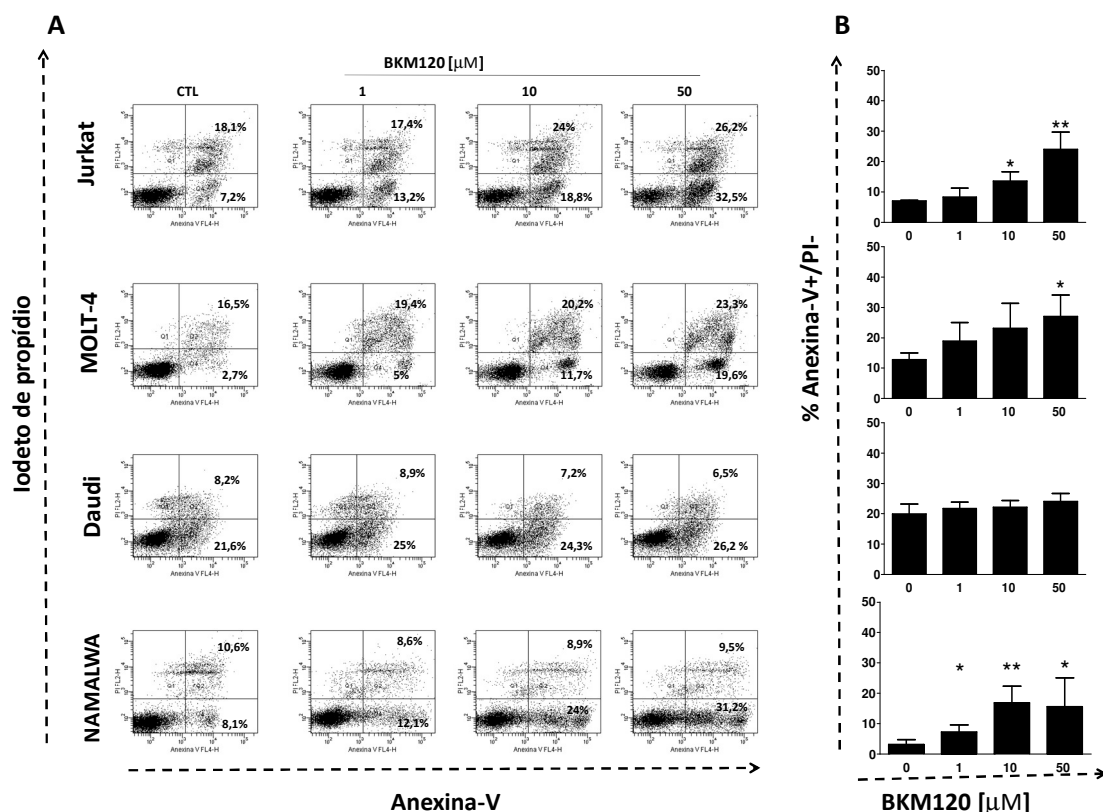


Figura 6: NVP-BKM120 tem efeito positivo na indução da apoptose celular. As células apoptóticas foram detectadas por citometria de fluxo nas linhagens celulares, incubadas na ausência ou presença da NVP-BKM120 (1, 10 e 50 μ M) por 6 horas, utilizando a marcação com anexina-V e PI. (A) Os gráficos são representativos de 3 experimentos independentes. O quadrante inferior direito contém a população de células apoptóticas (anexina-V+/PI-). O quadrante superior direito contém a população de células em estágio de necrose (anexina-V+/PI+). (B) Representação da média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$; teste t.

A taxa de apoptose também foi determinada através da porcentagem da atividade das caspases 3, 8 e 9. As linhagens foram tratadas com NVP-BKM120 por 1, 3 ou 6 horas, e a partir de 3 horas de tratamento com a droga já foi possível visualizar um aumento dose-dependente da clivagem das pró-

caspases testadas para as células Jurkat, MOLT-4 e NAMALWA (Figura 7). O tratamento com BKM120 não induziu apoptose na linhagem Daudi.

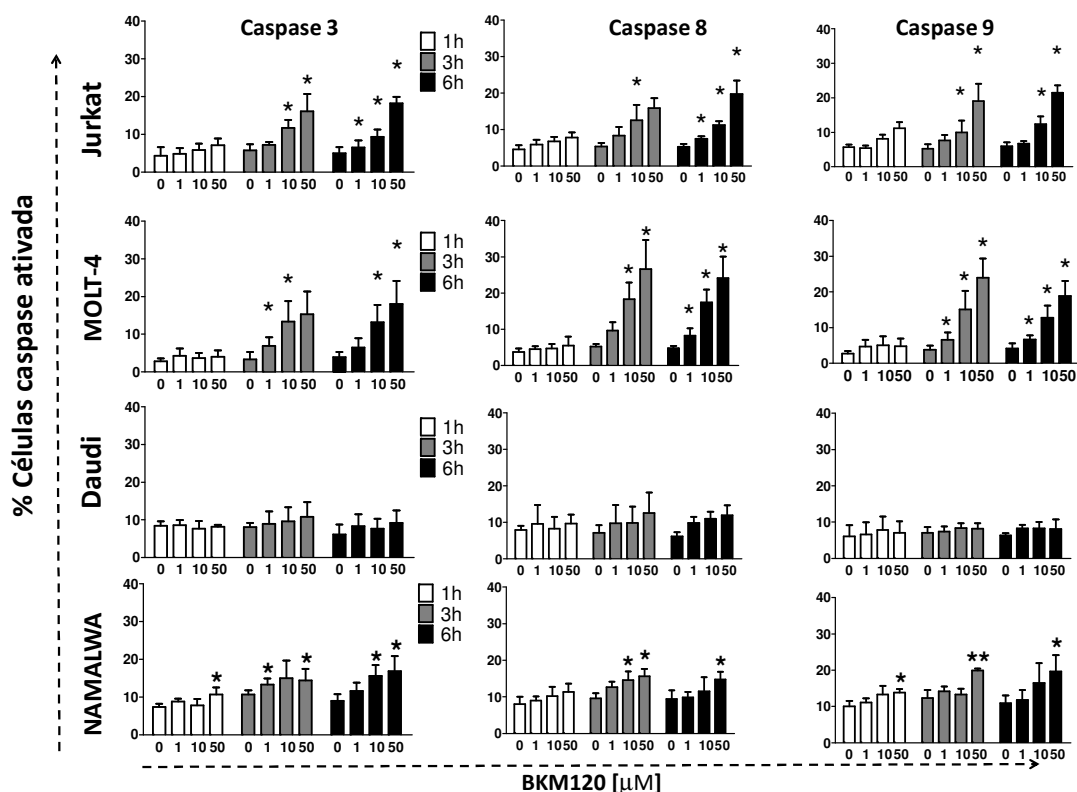


Figura 7: O tratamento com NVP-BKM120 por 3 horas resulta em maior atividade das caspases 3, 8 e 9. As linhagens foram tratadas por 1, 3 ou 6 horas com diferentes concentrações de NVP-BKM120 como indicado na figura. A % da atividade das caspases foi determinada através de citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ teste t.

NVP-BKM120 induz parada na fase G₂/M do ciclo celular

Avaliamos o efeito de diferentes concentrações de NVP-BKM120 (1, 2, e 5 μ M) sobre a progressão do ciclo celular, através da marcação com PI em todas as linhagens tratadas por 12 e 24 horas. Foi observada uma parada na fase G₂/M com consequente diminuição das fases G₀/G₁ e S em todas as linhagens testadas após o tratamento de 24 horas (Figuras 8A-B). Também avaliamos alguns marcadores de progressão da fase G₂/M. O tratamento com

NVP-BKM120 resultou na diminuição da proteína ciclina B1 e aumento da fosforilação de Stathmin 1 de maneira dose-dependente (Figura 8C).

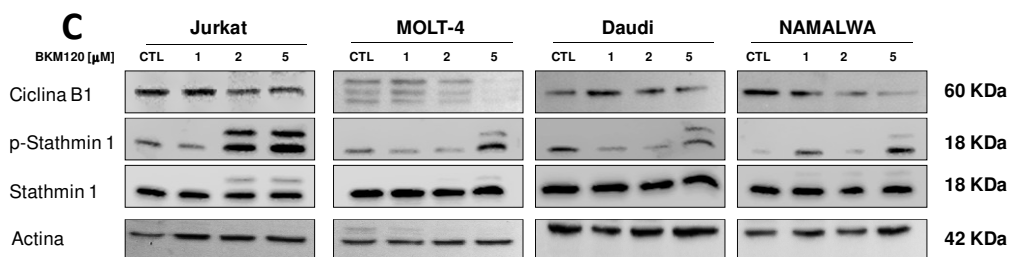
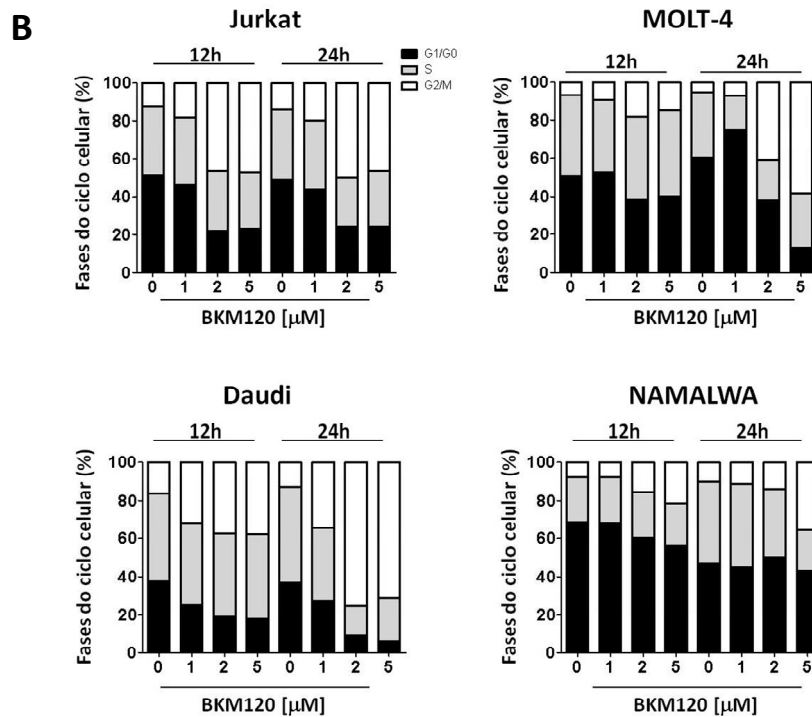
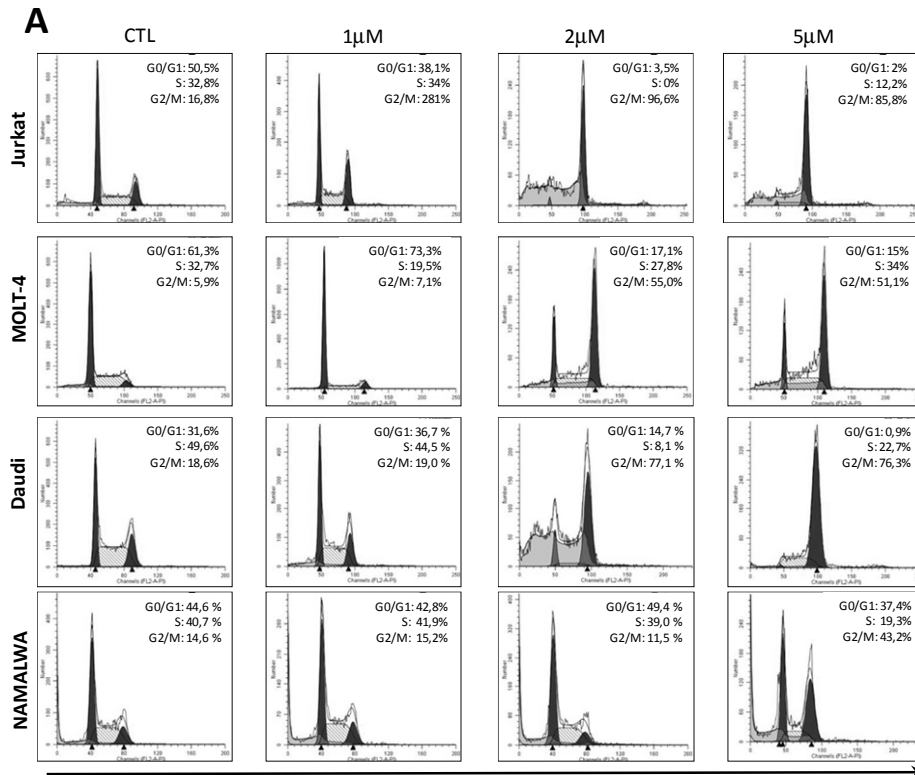


Figura 8: O tratamento com NVP-BKM120 resulta numa parada do ciclo celular em G₂/M. As linhagens celulares foram tratadas por 12 ou 24 horas com diferentes concentrações da droga (1, 2 e 5µM) e marcadas com PI para avaliação das fases do ciclo em citômetro de fluxo. (A) Gráficos da análise do ciclo celular após 24 horas de tratamento com as doses da droga indicadas na figura; representativo de 3 experimentos independentes. (B) Representação da média de 3 experimentos independentes. (C) Western blot de extrato total proteico. Lisados celulares foram blotados com anticorpos Ciclina B1 e anti p-Stathmin 1 (Ser38). Em seguida, as membranas foram reblotadas com o anticorpo específico para a proteína total correspondente e também para actina.

NVP-BKM120 na via de sinalização PI3K/AKT/mTOR

Para avaliarmos os efeitos de NVP-BKM120, na via PI3K/AKT/mTOR, foi analisada a expressão e ativação de várias proteínas *downstream* a PI3K. Foi observada uma diminuição, dose-dependente nos níveis de fosforilação em AKT, mTOR e 4EBP1 em todas as linhagens. Entretanto, enquanto a diminuição da fosforilação de P70S6 foi dose-dependente para as células Jurkat, MOLT-4 e NAMALWA, houve um aumento de sua fosforilação na linhagem Daudi, após o tratamento da droga (Figura 9A). Os níveis totais das proteínas não foram afetados com o tratamento da droga, a actina foi utilizada como controle endógeno. O tratamento com NVP-BKM120 também resultou na diminuição da fosforilação de BAD sem alterações nos níveis totais da proteína. Houve um aumento nos níveis da proteína BAX, com uma leve diminuição nos níveis de BCL2, resultando no aumento na relação BAX:BCL2 nas linhagens Jurkat, MOLT-4 e NAMALWA (Figura 9B-C).

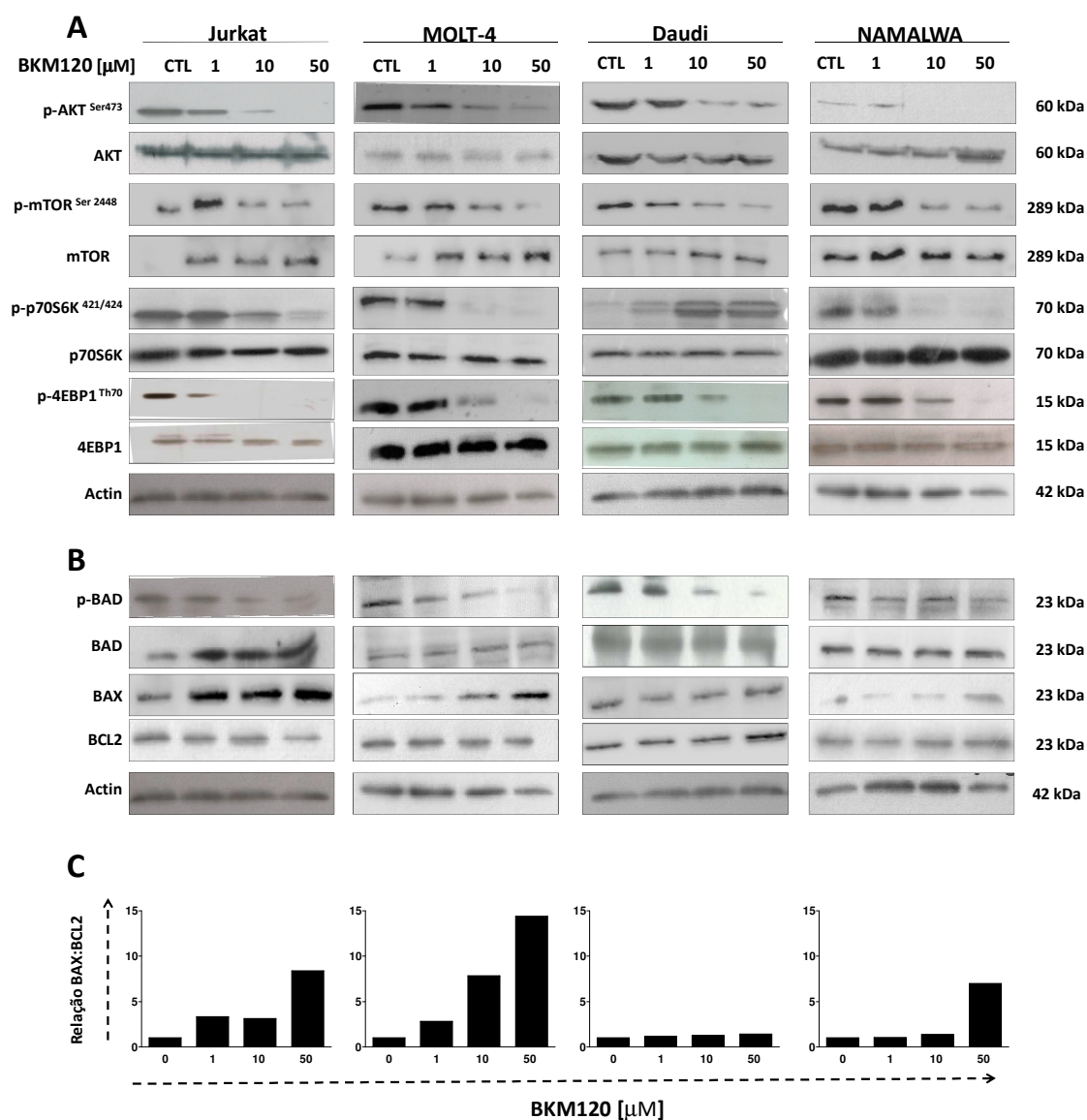


Figura 9: Análise da expressão de proteínas em linhagens de LLA-T e LB tratadas com NVP-BKM120. Western blot de extrato total proteico das linhagens celulares tratadas com diferentes concentrações de NVP-BKM120 (1, 10 e 50 μ M). Lisados celulares foram blotados com anticorpos anti (A) p-AKT (Ser473), p-mTOR (Ser2448), anti p-p70S6K (Thr421/Ser424), anti p-4EBP1 (Thr70), (B) anti p-BAD (Ser136), anti-BAX e anti-BCL2. Em seguida as membranas foram reblotadas com os anticorpos específicos para as proteínas totais correspondentes e também para actina. (C) Representação gráfica da relação BAX:BCL2.

NVP-BKM120 aumenta a formação de organelas acídicas vacuolares

O desenvolvimento de organelas acídicas vacuolares (AVOs) faz parte do processo de autofagia [104]. Laranja de acridina é um marcador acidotrópico, que emite fluorescência verde ao ser incorporado pela célula (citoplasma e núcleo). Entretanto, ao ser retido em compartimentos ácidos, como nas AVOs, este é protonado e passa a emitir fluorescência vermelha brilhante, sendo proporcional ao grau de acidez da célula [105, 106],. O tratamento com NVP-BKM120 resultou num aumento dose-dependente de AVOs, e a partir de 1 μ M da droga já foi observado um aumento de AVOs em todas as linhagens testadas (Figura 10).

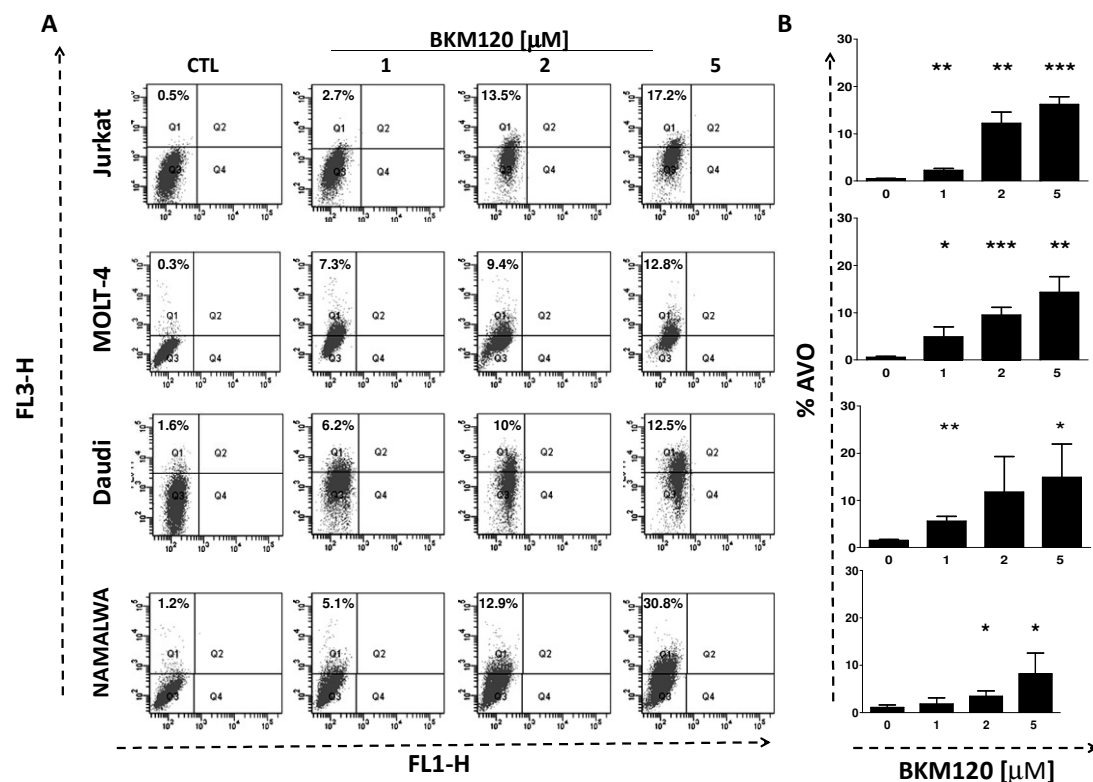


Figura 10: NVP-BKM120 tem efeito positivo na formação de AVOs. A formação de AVOs foi detectada por citometria de fluxo nas linhagens celulares incubadas na ausência ou presença da NVP-BKM120 (1, 2 e 5 μ M) por 24 horas, utilizando a marcação com laranja. (A) Os gráficos são representativos de 3 experimentos independentes. O quadrante inferior esquerdo contém a população de células sem AVOs (FL1). O quadrante superior esquerdo contém a população de células com AVOs (FL3). (B) Representação da média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$; teste t.

DISCUSSÃO

As terapias atuais para o tratamento das leucemias têm como objetivo não só aumentar as taxas de sucesso, mas também melhorar a qualidade de vida dos pacientes em relação à diminuição da morbidade e de sequelas a longo prazo. A era da terapia personalizada para leucemia linfoblástica, ou seja, tratamento baseado na farmacodinâmica e em alvos moleculares únicos do paciente individual depende do avanço no entendimento do papel da transformação leucêmica, influências genéticas e de desenvolvimento de resistência de drogas na resposta dos pacientes à quimioterapia [1].

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR está frequentemente ativada em diversos tumores e atua na manutenção do fenótipo tumoral, progressão do tumor e resistência à terapia antineoplásica [33, 107-110]. Devido ao papel fundamental da via PI3K na homeostase tumoral, é de grande interesse o desenvolvimento de inibidores seletivos para os alvos dessa via. Alguns desses compostos encontram-se em fase de ensaios clínicos [111, 112]. Assim, no presente trabalho, avaliamos o potencial antileucêmico do composto NVP-BKM120, produzido pela Novartis®, em linhagens de LLA-T (Jurkat e MOLT-4) e LB (NAMALWA e Daudi). Nossos estudos foram realizados *in vitro*.

NVP-BKM120 reduziu de maneira dose-dependente a viabilidade celular em todas as linhagens testadas. A IC₅₀ variou de 4,3μM (para células Jurkat) a 9,1μM (para células MOLT-4). Em linhagens celulares de mieloma múltiplo, a IC₅₀ de BKM120 variou entre 1 e 10μM [95]; já em linhagens de linfoma difuso de grandes células B, a IC₅₀ ficou em torno de 1μM, variando de 1 a 5μM [98]. Em um trabalho recentemente publicado, a IC₅₀ em linhagens de LLA-T variou

de 0,9 a 5,5 μ M [102]. Nossos resultados corroboram os ensaios com a droga em células primárias de neoplasia hematológica: NVP-BKM120 induziu toxicidade em 60% das células de leucemia linfóide crônica de células B (LLC-B) na dose de 10 μ M [100] e foi citotóxico em 78% das células de LLC-B abaixo da concentração máxima de 20 μ M [97]. Nós também observamos que a dose de 1 μ M de BKM120 reduziu significativamente a formação de colônia nas linhagens testadas. De acordo com um estudo clínico de fase I, a dose máxima tolerada em pacientes foi de 100 mg/dia, que corresponde a um pico em torno de 2 μ M da droga no plasma após o primeiro dia de tratamento, e concentração sérica máxima (C_{max}) de 5 μ M [96]. É importante ressaltar que BKM120 apresentou baixa toxicidade em células mononucleares de sangue periférico de doadores saudáveis [95, 100].

Como a diminuição de viabilidade celular nos ensaios de MTT pode implicar tanto parada do ciclo celular quanto apoptose, analisamos o impacto do tratamento de NVP-BKM120 na morte celular e na progressão do ciclo celular. Os efeitos de NVP-BKM120 foram determinados na indução de apoptose. Após 6 horas de tratamento, houve um aumento dose-dependente das células apoptóticas e da clivagem das pró-caspases 3, 8 e 9 nas células Jurkat, MOLT-4 e NAMALWA. Nossos resultados sugerem que tanto a via extrínseca quanto a intrínseca de apoptose foram ativadas após exposição à droga. Em relação ao eixo que regula morte celular na via PI3K/AKT/mTOR, observamos que, após o tratamento de 24 horas com a droga, houve uma diminuição dose-dependente da fosforilação de BAD e aumento de BAX, com consequente aumento da relação BAX:BCL2. O aumento da relação BAX:BCL2

sabidamente aumenta o potencial apoptótico de uma célula [113, 114]. Juntos, esses resultados reforçam a ocorrência de clivagem das pró-caspases 9 e 3, uma vez que a modulação da via PI3K é geralmente associada à ativação da via mitocondrial de morte celular [115]. A ativação da caspase 8, por sua vez, já foi descrita após o tratamento de linhagens celulares de glioma com BKM120 [116]. Num estudo dos efeitos de BKM120 em linhagens celulares de LLA-T, foi sugerido que a droga ativa a via intrínseca de apoptose; porém, a clivagem da pró-caspase 8 não foi analisada [102]. Embora seja sabido que o tratamento com BKM120 resulta em morte celular caspase-dependente [98], em nossos experimentos BKM120 teve um efeito principalmente citostático na linhagem Daudi.

Na análise da progressão do ciclo celular, nossos resultados mostraram que o tratamento com BKM120 resulta numa parada na fase G₂/M, dose e tempo-dependente, sugerindo uma alteração nos mecanismos que regulam a progressão do ciclo celular e a mitose. Esse padrão de resultado já foi demonstrado após o tratamento com BKM120 em linhagens de LLA-T, glioma e de câncer gastrointestinal [102, 117, 118]. Ao abordarmos uma visão molecular do ciclo, observamos que o tratamento com BKM120 resultou na diminuição de expressão de Ciclina B1. Células em acúmulo na fase G2 apresentam baixos níveis de expressão de Ciclina B1 [119]. A transição G₂/M é regulada com uma sequência de ativação e desativação de proteínas da família CDC (tirosina quinases e fosfatases) e de complexos de ciclinas [120]. Assim, Ciclina B1 participa do complexo CDC2/p34 para indução da passagem da fase G2 para M [121]. Além disso, observamos um aumento da fosforilação de Stathmin 1

em Serina 38 (um sítio inibitório), o que resulta na maior estabilização dos microtúbulos e na parada do ciclo celular na fase G₂/M [122].

Para determinarmos se os efeitos citotóxicos de BKM120 observados nas nossas linhagens celulares estão relacionados diretamente com a inibição da PI3K, nós investigamos o perfil de fosforilação da AKT, a principal molécula efetora na cascata de sinalização da via PI3K, bem como alguns de seus alvos *downstream*. O tratamento com BKM120 resultou na diminuição da fosforilação em Ser473 da AKT, bem como na diminuição da ativação de mTOR e seus alvos *downstream* 4EBP1 e P70S6K, os dois mais bem caracterizados substratos de mTORC1 [123]. mTOR é um dos mais importantes componentes da via PI3K/AKT relacionados com carcinogênese [124-127]. A fosforilação de 4EBP1 é um passo importante para síntese de proteínas oncogênicas [128, 129]. Portanto, drogas que inibem 4EBP1 são consideradas mais efetivas na terapia anti-tumoral do que moléculas como a rapamicina e seus análogos, que não possuem esse efeito [129]. Essa limitação do uso da rapamicina e seus análogos resulta na hiperativação da AKT devido a uma alça de resposta entre mTORC, PI3K e AKT [130]. A fosforilação de P70S6K por mTORC1 também resulta na ativação de eventos relacionados à biossíntese de proteínas e lipídeos [123]. Ou seja, o tratamento com NVP-BKM120 resulta numa inibição global de síntese proteica e, portanto, em uma diminuição da expressão de proteínas oncogênicas. Por outro lado, nas células Daudi, observamos que o tratamento com NVP-BKM120 resultou num aumento dose-dependente da fosforilação no sítio Thr421/Ser424 de P70S6K, o que sugere a participação de outra via *upstream* na manutenção da fosforilação deste sítio. Já foi demonstrado em linhagens de mieloma múltiplo, que o tratamento com IL6

resulta na ativação de várias vias de sinalização, sendo que a fosforilação do sítio Thr421/Ser424 de P70S6K foi independente da ativação de AKT, enquanto que fosforilação de 4EBP1 foi totalmente dependente de AKT [131]. Esse perfil de ativação de 4EBP1 e de P70S6K foi muito similar os nossos resultados na linhagem Daudi. Em nossos resultados, a fosforilação no sítio Thr421/Ser424 de P70S6K não foi capaz de alterar os efeitos da droga na parada do ciclo celular na fase G₂/M, mas talvez possa estar envolvida na resistência da célula aos efeitos citorredutores de NVP-BKM120. É importante ressaltar que alguns tipos celulares são resistentes ao efeito citotóxico da rapamicina, por razões ainda não elucidadas [132].

Outro alvo insensível à rapamicina e seus análogos é mTORC2, de particular relevância no câncer por ser o responsável pela fosforilação de AKT em Ser473 [123]. Como mencionado acima, o tratamento com NVP-BKM120 resultou na inibição da fosforilação de AKT em Ser473. Embora os nossos resultados de citotoxicidade estejam consistentes com a regulação negativa da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, não podemos excluir que as concentrações da droga usadas em nossos estudos *in vitro* possam também levar a um efeito fora do alvo (*off target*), como, por exemplo, a inibição da dinâmica de microtúbulos[112]. Nós observamos que a autofagia é ativada em resposta ao tratamento com NVP-BKM120 através da formação de AVOs em todas as linhagens testadas. Esses resultados são importantes, pois estudos recentes apontam que a tumorigênese estimulada pela ativação constitutiva da via PI3K/AKT/mTOR está relacionada à inibição da autofagia, mas não da apoptose [68]. Entretanto, em um estudo com BKM120 e linhagens celulares de linfoma difuso de grandes células B, o tratamento com NVP-BKM120, junto

com inibidor de autofagia, resultou na diminuição da proliferação e no aumento de morte celular. Neste modelo, é claro que a autofagia serve como um mecanismo protetor da citotoxicidade induzida pela droga [98].

Uma série de evidências baseadas em estudos experimentais sugerem que a ativação da via PI3K/AKT/mTOR é um fator crítico no processo de oncogênese [33, 72]. Atualmente, esta via é considerada um potencial alvo terapêutico para a maioria das neoplasias hematológicas: neoplasias mieloproliferativas [133], leucemias mieloides [134, 135], leucemias linfoides e linfomas, incluindo as LLA-T e LB [30]. Apesar dos avanços nos protocolos quimioterápicos para as LLA, as taxas de recidiva e a morbimortalidade ainda são elevadas, sobretudo em adultos. [136, 137]. Ainda, o uso de quimioterapias intensivas limita seu uso em pacientes idosos e com comorbidades significativas, como ocorre no LB [138]. Dessa forma, o estudo de novas drogas antileucêmicas alvo-específicas contribui para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e mais bem tolerados. Nossos resultados pré-clínicos sugerem novas evidências sobre a eficácia de NVP-BKM120 na LLA-T e LB.

CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

1. As linhagens de LLA-T e LB tratadas com NVP-BKM120 demonstraram uma diminuição da viabilidade celular de maneira dose-dependente e a IC_{50} foi de 4,3 μ M para as células Jurkat, 9,1 μ M para MOLT-4, 7,1 μ M para Daudi e 8,6 μ M para NAMALWA.
2. O tratamento com NVP-BKM120 na concentração de 10 μ M resultou na inibição total da formação de colônia em todas as linhagens testadas.
3. NVP-BKM120 resultou na indução da apoptose das células Jurkat, MOLT-4 e NAMALWA, determinada pelo aumento da porcentagem de células anexina-V+/PI- e através do aumento da porcentagem da ativação das caspases 3, 8 e 9. Nas células Daudi, a droga não induziu um efeito citorredutor, apenas citostático.
4. O tratamento com a droga resultou em uma parada na fase G₂/M do ciclo celular, diminuição da Ciclina B1 e aumento da fosforilação da proteína Stathmin 1 de maneira dose e tempo-dependente em todas as linhagens estudadas.
5. O tratamento com NVP-BKM120 resultou na diminuição da fosforilação de AKT, mTOR e seus alvos *downstream* P70S6K e 4EBP1 nas células Jurkat, MOLT-4 e NAMALWA. Nas células Daudi os efeitos foram similares, exceto o aumento da fosforilação no sítio Thr421/Ser424, dose-dependente, após o tratamento com a droga.

6. O tratamento com NVP-BKM120 resultou na inibição da fosforilação de BAD e aumento da relação BAX:BCL2, apenas nas linhagens Jurkat, MOLT-4 e NAMALWA.
7. O tratamento com a droga resultou no aumento de AVOs, uma característica do processo autofágico, em todas as linhagens testadas.

Esses resultados deram origem a um manuscrito que está em fase final de submissão.

REFERÊNCIA

1. Pui CH, Relling MV, Downing JR: Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004, 350(15):1535-1548.
2. Iacobucci I, Papayannidis C, Lonetti A, Ferrari A, Baccarani M, Martinelli G: Cytogenetic and molecular predictors of outcome in acute lymphocytic leukemia: recent developments. *Curr Hematol Malig Rep* 2012, 7(2):133-143.
3. Pui CH, Robison LL, Look AT: Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008, 371(9617):1030-1043.
4. Frohling S, Dohner H: Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med* 2008, 359(7):722-734.
5. Lhermitte L, Ben Abdelali R, Villarese P, Bedjaoui N, Guillemot V, Trinquand A, Libura M, Bedin AS, Petit A, Dombret H *et al*: Receptor kinase profiles identify a rationale for multitarget kinase inhibition in immature T-ALL. *Leukemia* 2013, 27(2):305-314.
6. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES: The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011, 117(19):5019-5032.
7. Stock W: Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010, 2010:21-29.
8. Pui CH, Evans WE: Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006, 354(2):166-178.
9. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA *et al*: Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 2001, 97(5):1211-1218.
10. Pui CH: Toward optimal central nervous system-directed treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2003, 21(2):179-181.
11. Burkhardt B, Woessmann W, Zimmermann M, Kontny U, Vormoor J, Doerffel W, Mann G, Henze G, Niggli F, Ludwig WD *et al*: Impact of cranial radiotherapy on central nervous system prophylaxis in children and adolescents with central nervous system-negative stage III or IV lymphoblastic lymphoma. *J Clin Oncol* 2006, 24(3):491-499.
12. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ: Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006, 56(2):106-130.
13. Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, Martins LR, Jotta PY, Abecasis M, Nowill AE, Leslie NR, Cardoso AA, Barata JT: PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest* 2008, 118(11):3762-3774.
14. Zhao WL: Targeted therapy in T-cell malignancies: dysregulation of the cellular signaling pathways. *Leukemia* 2010, 24(1):13-21.
15. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ: Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008, 58(2):71-96.
16. Armitage JO, Weisenburger DD: New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes.

- Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 1998, 16(8):2780-2795.
17. Gromminger S, Mautner J, Bornkamm GW: Burkitt lymphoma: the role of Epstein-Barr virus revisited. *Br J Haematol* 2012, 156(6):719-729.
 18. Cole MD: The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet* 1986, 20:361-384.
 19. Dang CV: MYC on the path to cancer. *Cell* 2012, 149(1):22-35.
 20. Prendergast GC: Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 1999, 18(19):2967-2987.
 21. Spender LC, Inman GJ: Developments in Burkitt's lymphoma: novel cooperations in oncogenic MYC signaling. *Cancer Manag Res* 2014, 6:27-38.
 22. Ji H, Wu G, Zhan X, Nolan A, Koh C, De Marzo A, Doan HM, Fan J, Cheadle C, Fallahi M *et al*: Cell-type independent MYC target genes reveal a primordial signature involved in biomass accumulation. *PLoS One* 2011, 6(10):e26057.
 23. Gregory MA, Hann SR: c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Biol* 2000, 20(7):2423-2435.
 24. Rohn JL, Hueber AO, McCarthy NJ, Lyon D, Navarro P, Burgering BM, Evan GI: The opposing roles of the Akt and c-Myc signalling pathways in survival from CD95-mediated apoptosis. *Oncogene* 1998, 17(22):2811-2818.
 25. Zhao JJ, Gjoerup OV, Subramanian RR, Cheng Y, Chen W, Roberts TM, Hahn WC: Human mammary epithelial cell transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Cell* 2003, 3(5):483-495.
 26. Kumar A, Marques M, Carrera AC: Phosphoinositide 3-kinase activation in late G1 is required for c-Myc stabilization and S phase entry. *Mol Cell Biol* 2006, 26(23):9116-9125.
 27. Han SS, Yun H, Son DJ, Tompkins VS, Peng L, Chung ST, Kim JS, Park ES, Janz S: NF-kappaB/STAT3/PI3K signaling crosstalk in iMyc E mu B lymphoma. *Mol Cancer* 2010, 9:97.
 28. Bouchard C, Marquardt J, Bras A, Medema RH, Eilers M: Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J* 2004, 23(14):2830-2840.
 29. Curnock AP, Knox KA: LY294002-mediated inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity triggers growth inhibition and apoptosis in CD40-triggered Ramos-Burkitt lymphoma B cells. *Cell Immunol* 1998, 187(2):77-87.
 30. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M, Wright G, Shaffer AL, Hodson DJ, Buras E *et al*: Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 2012, 490(7418):116-120.
 31. Sander S, Calado DP, Srinivasan L, Kochert K, Zhang B, Rosolowski M, Rodig SJ, Holzmann K, Stilgenbauer S, Siebert R *et al*: Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2012, 22(2):167-179.

32. Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M: Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol Sci* 2003, 24(7):366-376.
33. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ: Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009, 8(8):627-644.
34. Martelli AM, Evangelisti C, Chappell W, Abrams SL, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Nicoletti F, Libra M *et al*: Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. *Leukemia* 2011, 25(7):1064-1079.
35. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A: Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 1997, 275(5300):665-668.
36. Coffey PJ, Woodgett JR: Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* 1991, 201(2):475-481.
37. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Manzoli L, McCubrey JA: Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia. *Expert Opin Investig Drugs* 2009, 18(9):1333-1349.
38. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB: Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4(12):988-1004.
39. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA: Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997, 272(50):31515-31524.
40. Frech M, Andjelkovic M, Ingley E, Reddy KK, Falck JR, Hemmings BA: High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J Biol Chem* 1997, 272(13):8474-8481.
41. Maehama T, Dixon JE: The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998, 273(22):13375-13378.
42. Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK: The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(23):13513-13518.
43. Engelman JA, Luo J, Cantley LC: The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006, 7(8):606-619.
44. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM: Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005, 307(5712):1098-1101.
45. Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P: Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol* 2008, 8(4):393-412.
46. Rodon J, Dienstmann R, Serra V, Tabernero J: Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* 2013, 10(3):143-153.

47. Kharas MG, Fruman DA: ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res* 2005, 65(6):2047-2053.
48. Martelli AM, Nyakern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, Cocco L: Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006, 20(6):911-928.
49. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO *et al*: Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* 1997, 16(20):6151-6161.
50. Min YH, Eom JI, Cheong JW, Maeng HO, Kim JY, Jeung HK, Lee ST, Lee MH, Hahn JS, Ko YW: Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia* 2003, 17(5):995-997.
51. Vivanco I, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002, 2(7):489-501.
52. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997, 91(2):231-241.
53. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC: Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998, 282(5392):1318-1321.
54. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME: Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999, 96(6):857-868.
55. Romashkova JA, Makarov SS: NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999, 401(6748):86-90.
56. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A: Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999, 9(11):601-604.
57. Mayo LD, Donner DB: A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(20):11598-11603.
58. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC: HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2001, 3(11):973-982.
59. Vemuri GS, Rittenhouse SE: Wortmannin inhibits serum-induced activation of phosphoinositide 3-kinase and proliferation of CHRF-288 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 202(3):1619-1623.
60. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F: PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 2001, 20(21):6050-6059.
61. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ: Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 1998, 12(22):3499-3511.
62. Schmelzle T, Hall MN: TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000, 103(2):253-262.

63. Nave BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR: Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 1999, 344 Pt 2:427-431.
64. Levine B, Kroemer G: Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008, 132(1):27-42.
65. Choi AM, Ryter SW, Levine B: Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 2013, 368(7):651-662.
66. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB: Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005, 120(2):237-248.
67. White E: Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012, 12(6):401-410.
68. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G: Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1793(9):1524-1532.
69. Puissant A, Robert G, Auberger P: Targeting autophagy to fight hematopoietic malignancies. *Cell Cycle* 2010, 9(17):3470-3478.
70. Grander D, Kharaziha P, Laane E, Pokrovskaja K, Panaretakis T: Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. *Autophagy* 2009, 5(8):1198-1200.
71. Laane E, Tamm KP, Buentke E, Ito K, Kharaziha P, Oscarsson J, Corcoran M, Bjorklund AC, Hultenby K, Lundin J *et al*: Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ* 2009, 16(7):1018-1029.
72. Yuan TL, Cantley LC: PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008, 27(41):5497-5510.
73. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD: Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001, 17:615-675.
74. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC: Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 1998, 67:481-507.
75. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK: Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005, 5(12):921-929.
76. Chantry D, Vojtek A, Kashishian A, Holtzman DA, Wood C, Gray PW, Cooper JA, Hoekstra MF: p110delta, a novel phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit that associates with p85 and is expressed predominantly in leukocytes. *J Biol Chem* 1997, 272(31):19236-19241.
77. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, Jones J, Andritsos L, Puri KD, Lannutti BJ *et al*: Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 2010, 116(12):2078-2088.
78. Sujobert P, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Hayflick JS, Prie N, Verdier F, Vanhaesebroeck B, Muller O, Pesce F, Ifrah N *et al*: Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005, 106(3):1063-1066.

79. Castillo JJ, Iyengar M, Kuritzky B, Bishop KD: Isotype-specific inhibition of the phosphatidylinositol-3-kinase pathway in hematologic malignancies. *Onco Targets Ther* 2014, 7:333-342.
80. Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE, Kashishian A, Steiner B, Johnson AJ, Byrd JC, Tyner JW, Loriaux MM, Deininger M *et al*: CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* 2011, 117(2):591-594.
81. Chanan-Khan AA, Chitta K, Ersing N, Paulus A, Masood A, Sher T, Swaika A, Wallace PK, Mashtare TL, Jr., Wilding G *et al*: Biological effects and clinical significance of lenalidomide-induced tumour flare reaction in patients with chronic lymphocytic leukaemia: in vivo evidence of immune activation and antitumour response. *Br J Haematol* 2011, 155(4):457-467.
82. Ikeda H, Hideshima T, Fulciniti M, Perrone G, Miura N, Yasui H, Okawa Y, Kiziltepe T, Santo L, Vallet S *et al*: PI3K/p110{delta} is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Blood* 2010, 116(9):1460-1468.
83. Sinclair A, Metz D, Cushing T, Liu L, Brake R, Starnes C, Means G, Henne K, Archibeque I, Mattson B *et al*: Phosphatidylinositol-3 Kinase Delta (PI3K{delta}) Inhibitor AMG 319 Is a Potent, Selective and Orally Bioavailable Small Molecule Inhibitor That Suppresses PI3K-Mediated Signaling and Viability in Neoplastic B Cells. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2011, 118(21):#4964.
84. Billottet C, Grandage VL, Gale RE, Quattropiani A, Rommel C, Vanhaesebroeck B, Khwaja A: A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene* 2006, 25(50):6648-6659.
85. Chapuis N, Tamburini J, Green AS, Vignon C, Bardet V, Neyret A, Pannetier M, Willems L, Park S, Macone A *et al*: Dual inhibition of PI3K and mTORC1/2 signaling by NVP-BEZ235 as a new therapeutic strategy for acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2010, 16(22):5424-5435.
86. Limia CH: [Approach to retained teeth]. *Circ Odontol San Martin Tres Febr* 1991(30):12-13.
87. Bhende PM, Park SI, Lim MS, Dittmer DP, Damania B: The dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, is efficacious against follicular lymphoma. *Leukemia* 2010, 24(10):1781-1784.
88. Weisberg E, Banerji L, Wright RD, Barrett R, Ray A, Moreno D, Catley L, Jiang J, Hall-Meyers E, Sauveur-Michel M *et al*: Potentiation of antileukemic therapies by the dual PI3K/PDK-1 inhibitor, BAG956: effects on BCR-ABL- and mutant FLT3-expressing cells. *Blood* 2008, 111(7):3723-3734.
89. Baumann P, Schneider L, Mandl-Weber S, Oduncu F, Schmidmaier R: Simultaneous targeting of PI3K and mTOR with NVP-BGT226 is highly effective in multiple myeloma. *Anticancer Drugs* 2012, 23(1):131-138.
90. Kampa-Schittenhelm KM, Heinrich MC, Akmut F, Rasp KH, Illing B, Dohner H, Dohner K, Schittenhelm MM: Cell cycle-dependent activity of the novel dual PI3K-MTORC1/2 inhibitor NVP-BGT226 in acute leukemia. *Mol Cancer* 2013, 12:46.

91. Knight ZA, Gonzalez B, Feldman ME, Zunder ER, Goldenberg DD, Williams O, Loewith R, Stokoe D, Balla A, Toth B *et al*: A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell* 2006, 125(4):733-747.
92. Niedermeier M, Hennessy BT, Knight ZA, Henneberg M, Hu J, Kurtova AV, Wierda WG, Keating MJ, Shokat KM, Burger JA: Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. *Blood* 2009, 113(22):5549-5557.
93. Glassford J, Kassen D, Quinn J, Stengel C, Kallinikou K, Khwaja A, Yong KL: Inhibition of cell cycle progression by dual phosphatidylinositol-3-kinase and mTOR blockade in cyclin D2 positive multiple myeloma bearing IgH translocations. *Blood Cancer J* 2012, 2(1):e50.
94. Maira SM, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D, Schnell C, Guthy D, Nagel T, Wiesmann M *et al*: Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2012, 11(2):317-328.
95. Zheng Y, Yang J, Qian J, Zhang L, Lu Y, Li H, Lin H, Lan Y, Liu Z, He J *et al*: Novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 induces apoptosis in myeloma cells and shows synergistic anti-myeloma activity with dexamethasone. *J Mol Med (Berl)* 2012, 90(6):695-706.
96. Bendell JC, Rodon J, Burris HA, de Jonge M, Verweij J, Birlle D, Demanase D, De Buck SS, Ru QC, Peters M *et al*: Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2012, 30(3):282-290.
97. Amrein L, Shawi M, Grenier J, Aloyz R, Panasci L: The phosphatidylinositol-3 kinase I inhibitor BKM120 induces cell death in B-chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Int J Cancer* 2013, 133(1):247-252.
98. Zang C, Eucker J, Liu H, Coordes A, Lenarz M, Possinger K, Scholz CW: Inhibition of pan-class I phosphatidyl-inositol-3-kinase by NVP-BKM120 effectively blocks proliferation and induces cell death in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2014, 55(2):425-434.
99. Lonetti A, Antunes IL, Chiarini F, Orsini E, Buontempo F, Ricci F, Tazzari PL, Pagliaro P, Melchionda F, Pession A *et al*: Activity of the pan-class I phosphoinositide 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2013.
100. Rosich L, Saborit-Villarroya I, Lopez-Guerra M, Xargay-Torrent S, Monraveta A, Aymerich M, Villamor N, Campo E, Perez-Galan P, Roue G *et al*: The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 overcomes resistance signals derived from microenvironment by regulating the Akt/FoxO3a/Bim axis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2013, 98(11):1739-1747.
101. Evans M, Hasting N, Peacock B: Statistical distributions. New York: John Wiley & Sons; 2000.
102. Lonetti A, Antunes IL, Chiarini F, Orsini E, Buontempo F, Ricci F, Tazzari PL, Pagliaro P, Melchionda F, Pession A *et al*: Activity of the pan-class I phosphoinositide 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2014, 28(6):1196-1206.

103. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C: Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2006, 1(5):2315-2319.
104. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J: A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 2001, 61(2):439-444.
105. Mains RE, May V: The role of a low pH intracellular compartment in the processing, storage, and secretion of ACTH and endorphin. *J Biol Chem* 1988, 263(16):7887-7894.
106. Traganos F, Darzynkiewicz Z: Lysosomal Proton Pump Activity: Supravital Cell Staining with Acridine Orange Differentiates Leukocyte Subpopulations. In: *Methods in Cell Biology Flow Cytometry (2nd edition)*. Edited by Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA, vol. 41. New York: Academic Press; 1994.
107. Saal LH, Johansson P, Holm K, Gruvberger-Saal SK, She QB, Maurer M, Koujak S, Ferrando AA, Malmstrom P, Memeo L *et al*: Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(18):7564-7569.
108. Huang WC, Hung MC: Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance. *J Formos Med Assoc* 2009, 108(3):180-194.
109. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL: Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol* 2011, 29(33):4452-4461.
110. Ando Y, Inada-Inoue M, Mitsuma A, Yoshino T, Ohtsu A, Suenaga N, Sato M, Kakizume T, Robson M, Quadri C *et al*: Phase I dose-escalation study of buparlisib (BKM120), an oral pan-class I PI3K inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Sci* 2014, 105(3):347-353.
111. Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK, Alix S, Baker SJ, Box G, Chuckowree IS, Clarke PA, Depledge P, Eccles SA *et al*: The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-t hieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J Med Chem* 2008, 51(18):5522-5532.
112. Brachmann SM, Kleylein-Sohn J, Gaulis S, Kauffmann A, Blommers MJ, Kazic-Legueux M, Laborde L, Hattenberger M, Stauffer F, Vaxelaire J *et al*: Characterization of the mechanism of action of the pan class I PI3K inhibitor NVP-BKM120 across a broad range of concentrations. *Mol Cancer Ther* 2012, 11(8):1747-1757.
113. Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M, Boxer LM: Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 2001, 20(2):240-251.
114. Froesch BA, Aime-Sempe C, Leber B, Andrews D, Reed JC: Inhibition of p53 transcriptional activity by Bcl-2 requires its membrane-anchoring domain. *J Biol Chem* 1999, 274(10):6469-6475.
115. Stiles BL: PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev* 2009, 61(14):1276-1282.

116. Jane EP, Premkumar DR, Morales A, Foster KA, Pollack IF: Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signaling by NVP-BKM120 Promotes ABT-737-Induced Toxicity in a Caspase-Dependent Manner through Mitochondrial Dysfunction and DNA Damage Response in Established and Primary Cultured Glioblastoma Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2014, 350(1):22-35.
117. Koul D, Fu J, Shen R, LaFortune TA, Wang S, Tiao N, Kim YW, Liu JL, Ramnarian D, Yuan Y *et al*: Antitumor activity of NVP-BKM120--a selective pan class I PI3 kinase inhibitor showed differential forms of cell death based on p53 status of glioma cells. *Clin Cancer Res* 2012, 18(1):184-195.
118. Mueller A, Bachmann E, Linnig M, Khillimberger K, Schimanski CC, Galle PR, Moehler M: Selective PI3K inhibition by BKM120 and BEZ235 alone or in combination with chemotherapy in wild-type and mutated human gastrointestinal cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012, 69(6):1601-1615.
119. Taylor WR, DePrimo SE, Agarwal A, Agarwal ML, Schonthal AH, Katula KS, Stark GR: Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol Biol Cell* 1999, 10(11):3607-3622.
120. Taylor WR, Stark GR: Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001, 20(15):1803-1815.
121. Graves PR, Yu L, Schwarz JK, Gales J, Sausville EA, O'Connor PM, Piwnicka-Worms H: The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem* 2000, 275(8):5600-5605.
122. Rubin CI, Atweh GF: The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem* 2004, 93(2):242-250.
123. Vu C, Fruman DA: Target of rapamycin signaling in leukemia and lymphoma. *Clin Cancer Res* 2010, 16(22):5374-5380.
124. Abraham RT, Eng CH: Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in oncology. *Expert Opin Ther Targets* 2008, 12(2):209-222.
125. Guertin DA, Sabatini DM: Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007, 12(1):9-22.
126. Janes MR, Fruman DA: Targeting TOR dependence in cancer. *Oncotarget* 2010, 1(1):69-76.
127. Shor B, Gibbons JJ, Abraham RT, Yu K: Targeting mTOR globally in cancer: thinking beyond rapamycin. *Cell Cycle* 2009, 8(23):3831-3837.
128. Evangelisti C, Ricci F, Tazzari P, Tabellini G, Battistelli M, Falcieri E, Chiarini F, Bortul R, Melchionda F, Pagliaro P *et al*: Targeted inhibition of mTORC1 and mTORC2 by active-site mTOR inhibitors has cytotoxic effects in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2011, 25(5):781-791.
129. Willems L, Chapuis N, Puissant A, Maciel TT, Green AS, Jacque N, Vignon C, Park S, Guichard S, Herault O *et al*: The dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD8055 has anti-tumor activity in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2012, 26(6):1195-1202.
130. Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, Park S, Sujobert P, Willems L, Ifrah N, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C *et al*: Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-

- regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood* 2008, 111(1):379-382.
131. Shi Y, Hsu JH, Hu L, Gera J, Lichtenstein A: Signal pathways involved in activation of p70S6K and phosphorylation of 4E-BP1 following exposure of multiple myeloma tumor cells to interleukin-6. *J Biol Chem* 2002, 277(18):15712-15720.
 132. Hosoi H, Dilling MB, Liu LN, Danks MK, Shikata T, Sekulic A, Abraham RT, Lawrence JC, Jr., Houghton PJ: Studies on the mechanism of resistance to rapamycin in human cancer cells. *Mol Pharmacol* 1998, 54(5):815-824.
 133. Bartalucci N, Guglielmelli P, Vannucchi AM: Rationale for targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in myeloproliferative neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013, 13 Suppl 2:S307-309.
 134. Thomas D, Powell JA, Vergez F, Segal DH, Nguyen NY, Baker A, Teh TC, Barry EF, Sarry JE, Lee EM *et al*: Targeting acute myeloid leukemia by dual inhibition of PI3K signaling and Cdk9-mediated Mcl-1 transcription. *Blood* 2013, 122(5):738-748.
 135. Park S, Chapuis N, Tamburini J, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Willems L, Green A, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D: Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2010, 95(5):819-828.
 136. Lo Nigro L, Mirabile E, Tumino M, Caserta C, Cazzaniga G, Rizzari C, Silvestri D, Buldini B, Barisone E, Casale F *et al*: Detection of PICALM-MLLT10 (CALM-AF10) and outcome in children with T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2013, 27(12):2419-2421.
 137. Marshall GM, Dalla Pozza L, Sutton R, Ng A, de Groot-Kruseman HA, van der Velden VH, Venn NC, van den Berg H, de Bont ES, Maarten Egeler R *et al*: High-risk childhood acute lymphoblastic leukemia in first remission treated with novel intensive chemotherapy and allogeneic transplantation. *Leukemia* 2013, 27(7):1497-1503.
 138. Yustein JT, Dang CV: Biology and treatment of Burkitt's lymphoma. *Curr Opin Hematol* 2007, 14(4):375-381.