



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ANA ROSA PINTO QUIDUTE

**Expressão dos genes *GNAS* e *BTG2* e de um painel de
microRNAs em somatotrofinomas esporádicos com e sem
mutação no gene *GNAS***

FORTALEZA
2013

ANA ROSA PINTO QUIDUTE

**Expressão dos genes *GNAS* e *BTG2* e de um painel de
microRNAs em somatotrofinomas esporádicos com e sem
mutação no gene *GNAS***

Tese entregue à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Farmacologia Clínica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Elisabete Amaral de Moraes

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

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

Q57e

Quidute, Ana Rosa Pinto.

Expressão dos genes *GNAS* e *BTG2* e de um painel de microRNAs em somatotrofinomas esporádicos com e sem mutação no gene *GNAS* / Ana Rosa Pinto Quidute. – 2013.

138 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Farmacologia Clínica.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Maria Elisabete Amaral de Moraes.

1. Adenoma Hipofisário Secreto de Hormônio do Crescimento. 2. Transformação Celular Neoplásica. 3. MicroRNAs. 4. Oncogenes. I. Título.

CDD 615.1

ANA ROSA PINTO QUIDUTE

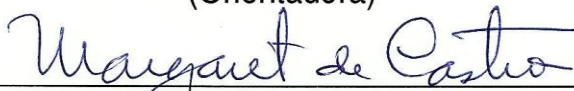
EXPRESSÃO DOS GENES GNAS E BTG2 E DE UM PAINEL DE MICRORNAS EM SOMATOTROFINOMAS ESPORÁDICOS COM E SEM MUTAÇÃO NO GENE GNAS

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

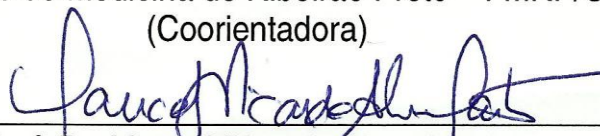
Aprovada em: 18 de outubro de 2013.



Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes
Universidade Federal do Ceará – UFC
(Orientadora)



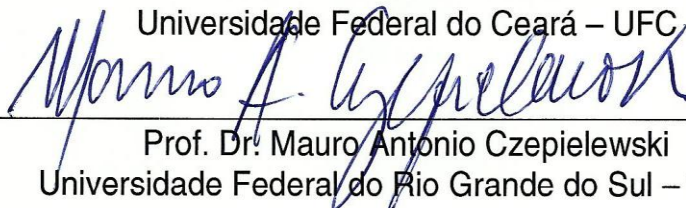
Profa. Dra. Margaret de Castro
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
(Coorientadora)



Prof. Dr. Manoel Ricardo Alves Martins
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Mauro Antonio Czepielewski
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS

Dedico esta tese aos meus queridos e amados filhos Maria Eduarda, Eduardo Augusto e marido Eduardo Arrais Rocha.

Pela presença,
compreensão, amor, carinho e
estímulo.

Aos meus queridos e amados pais Clélia Rosa e José Quidute e irmãos, José Augusto e Arnóbio Augusto.

Pela presença, amor e
carinho.

Aos residentes e alunos formados por todos esses anos no SED-HUWC-UFC e HGCC.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me iluminado a cada dia desta jornada e permitir mais uma conquista.

Aos Professores Doutora Maria Elisabete Amaral de Moraes e Doutor Manoel Odorico de Moraes Filho pela confiança, orientação e por todo suporte e estímulo para a realização deste trabalho, exemplos de empreendedorismo e dedicação a pesquisa e ao ensino.

À Professora Doutora Margaret de Castro pela orientação, ensinamentos, disponibilidade, atenção, paciência; exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino, pelos estímulos e contribuições em todos os momentos. Não conseguiria chegar aqui sem seu auxílio, amizade e carinho.

Agradeço à Doutora Fernanda Borchers Coeli-Lacchini por me ensinar os primeiros passos na bancada de biologia molecular, pela inestimável ajuda na realização deste trabalho, pelo acompanhamento na realização dos ensaios de biologia molecular, além da sua amizade, disponibilidade e paciência.

Agradeço à Doutora Paula Elias, exemplo de dedicação e de médica, pela contribuição intelectual e auxílio nos dados endocrinológicos utilizados neste trabalho e por nossa grande amizade e carinho.

Aos Professores Doutor Ayrton Custódio Moreira e Doutora Lucila L. K. Elias pela minha formação médica e científica, exemplos de médicos, mestres e pesquisadores, que norteiam meu dia a dia profissional.

Agradeço ao Professor Doutor Renan Magalhães Montenegro, por todas as oportunidades, amizade e contribuição na minha formação médica ao longo de todos esses anos de convivência.

Agradeço aos Doutores Leandro Machado Colli e Tatiana Freitas por compartilharem parte dos seus trabalhos e conhecimentos de expressão gênica em tumores hipofisários.

Agradeço ao Professor Doutor Sonir R. R. Antonini pela grande amizade, confiança, estímulo e apoio para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Hélio Rubens Machado pela contribuição na minha formação médica, bem como pelo excelente trabalho desenvolvido na obtenção das amostras de hipófise utilizadas neste trabalho.

Aos Professores Doutores Mauro Antônio Czepielewski, Manoel Ricardo Alves Martins, Alexandre Havt Bindá, Catarina D'Alva Brasil, Cristina Micheletto Dallago pela prontidão em participar da avaliação deste trabalho e pela disponibilidade, atenção e contribuição com sugestões valiosas para a correção desta tese.

Ao Professor Doutor Armênio Aguiar dos Santos, pela confiança, amizade, suporte e estímulo para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os colegas do Serviço de Endocrinologia e Diabetes (SED-HUWC) e em especial aos Doutores Ana Paula Abreu, Eveline Gadelha, Rejane Magalhães, Rosana Quezado, Renan Magalhães Montenegro Júnior e Virginia Fernandes pela amizade, incentivo, suporte e compreensão nas minhas ausências, sem as quais seria impossível a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Miguel Nasser Hissa, chefe do Serviço de Endocrinologia e Diabetes, por todo suporte e estímulo para a realização deste trabalho e total compreensão nas minhas ausências, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

Aos Professores Doutores José Otho Leal Nogueira e José Walter Correia, chefes no serviço de Clínica Médica do HGCC, exemplos de dedicação ao ensino médico, por todo suporte e estímulo para a realização deste trabalho e total compreensão nas minhas ausências, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Endocrinologia e Biologia Molecular de Ribeirão Preto-FMRP-USP, Mara, José Roberto, Adriana, Wendy e Rogério.

Às senhoras Aura, Célia e Fábila, da secretaria de pós-graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e da UNIFAC, pela ajuda burocrática nesses anos.

Agradeço aos pós-graduandos do Laboratório de Endocrinologia e Biologia Molecular de Ribeirão Preto-FMRP-USP doutorandos Débora Gomes, Beatriz Paixão, Ana Carolina Bueno, Letícia Leal, Lívia Mermejo, Ana Cláudia Reis, Renata Camargo, Silvia Ruiz, Leonardo Araújo, pela troca de conhecimentos em biologia molecular, ajuda, amizade e atenção.

Agradeço especialmente aos pacientes que sempre nos confiam suas vidas e contribuem para o crescimento da ciência, permitindo que sua ausência de saúde sirva para tentar amenizar o sofrimento de outros. Aos familiares que consentiram na retirada das amostras para a realização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Introdução: Mutações nos genes *GNAS* e *AIP* estão presentes em 35% e 3%, respectivamente, dos somatotrofinomas esporádicos. Recentemente, observa-se importância biológica crescente dos microRNAs (miRNAs) na tumorigênese hipofisária. Entretanto, mecanismos moleculares envolvidos na patogênese de 60% desses tumores permanecem não elucidados. **Objetivos:** Identificar a prevalência de mutações nos genes *GNAS* e *AIP* em um grupo de somatotrofinomas esporádicos. Comparar parâmetros clínicos e bioquímicos ao diagnóstico como idade, tamanho tumoral e agressividade (escore Hardy), hormônio do crescimento (GH), prolactina (PRL) e Fator de Crescimento Insulin-Like I (IGF-1) e resposta as terapêuticas entre os grupos com (gsp+) e sem (gsp-) mutação no *GNAS*. Analisar a expressão dos genes *GNAS* e *BTG2* e miRNAs entre somatotrofinomas e hipófises normais (HN) e a associação entre a expressão com agressividade, a resposta à cirurgia e a todas as terapêuticas adjuvantes disponíveis. **Material e Métodos:** 26 pacientes com diagnóstico de acromegalia. Tamanho tumoral foi avaliado por RNM/CT e o grau de invasibilidade pelo escore de Hardy (I a IV). GH basal $\leq 2.5\mu\text{g/L}$ ou nadir de GH após o GTT $\leq 1\mu\text{g/L}$ e IGF-1 normal para idade e sexo foram utilizados como critério de cura após cirurgia transesfenoidal (CTE). Como controle com o análogo da somatostatina (AS), adotamos a normalização dos níveis de IGF-1 para idade e sexo. As amostras tumorais (n=26) foram obtidas durante a CTE, realizado histopatológico e armazenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, para estudos moleculares. HN (07) foram obtidas durante autópsias. RNA e DNA total foram extraídos pelo TRIzol®. Os códons 201 e 227 do gene *GNAS* e o *AIP* completo foram sequenciados. Expressão relativa dos genes *GNAS* e *BTG2* e dos miRNAs let-7a, miR-16a, miR-21, miR-141, miR-143, miR-15a, miR-145, miR-23a, miR-23b e miR-24-2 foi avaliada por qPCR (sondas TaqMan), pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. **Resultados:** A frequência de mutações no *GNAS* foi de 35% e no *AIP* 3,8%. Não houve diferença entre as médias de idade ($39,0\pm 11,5$ vs $43,6\pm 9,0$ anos; $p=0,32$), nas concentrações plasmáticas basais de GH ($62,4\pm 128,1$ vs $39,9\pm 48,3\mu\text{g/L}$; $p=0,39$), IGF-1 ($435,5\pm 230,8$ vs $556,9\pm 238,3\text{ } \% \text{ULNR}$; $p=0,32$), PRL ($25,7\pm 29,8$ vs $30,9\pm 32,8\text{ ng/L}$; $p=0,69$) e agressividade tumoral entre os gsp+ e gsp- ($p=1,00$). Ao analisar o uso do AS como terapêutica adjuvante à CTE, observamos que 04/05 (80%) dos indivíduos com somatotrofinoma gsp+ obtiveram controle da doença, enquanto que no grupo gsp- 02/06 (33%) obtiveram controle ($p=0,08$). Quando associamos ao AS, os agonistas dopaminérgicos e/ou radioterapia externa, observamos que 05/05 (100%) dos pacientes gsp+ tiveram critério de controle da doença, contra (04/09) 44% no grupo gsp- ($p=0,09$). Não houve diferença na expressão de *GNAS* entre os somatotrofinomas e as HN ($1,07\pm 0,55$ vs $0,98\pm 0,28$; $p=0,97$), e entre os gsp+ e gsp- ($1,04\pm 0,59$ vs $1,10\pm 0,55$; $p=0,97$, respectivamente). Os tumores Hardy I / II apresentaram maior expressão do *GNAS* do que os tumores classificados como III / IV ($p=0,02$). Não houve associação entre a expressão do *GNAS* e o controle da doença com cirurgia isolada ou com o uso de todas as terapêuticas adjuvantes. Observamos hipoexpressão do *BTG2* e dos miR-16a e miR-141 em somatotrofinomas quando foram comparados com as HN ($p=0,002$, fold=-6,63; $p=0,01$, fold=-10,00; $p=0,0003$, fold=-50,00, respectivamente) sem diferenças entre os gsp+ e gsp-. Houve hiperexpressão do miR-21 ($p=0,02$; fold=10,18) em somatotrofinomas ($20,16\pm 18,48$) quando comparado com as HN ($2,52\pm 3,56$), sem

diferença entre os gsp + e gsp-. Não houve diferença na expressão entre os grupos gsp+ e gsp- para os miRNAs let-7a, miR-21, miR-143, miR-15a, miR-23a e miR-24-2. Entretanto, miR-145 e miR-23b foram mais hipoexpressos no grupo gsp+ quando comparados ao gsp- ($p=0,03$, $\text{fold}=-4,83$ e $p=0,02$, $\text{fold}=-2,77$, respectivamente). Não houve associação entre a expressão do *BTG2* e o painel de miRNAs com agressividade e com o controle da doença. **Conclusão:** Na presente série de somatotrofinomas, assumidos como esporádicos, a frequência de mutações nos genes *GNAS* (35%) e *AIP* (3,8%) foram semelhantes aos relatados na literatura. Não houve diferenças nas características clínicas e bioquímicas, agressividade, resposta às terapêuticas, e na expressão diferencial do *GNAS* entre os pacientes com tumores gsp+ e gsp-. Hipoexpressão de *BTG2* (gene supressor tumoral relacionado às vias de sinalização do p53 e do Rb), baixa expressão de miRNAs (supressores tumorais) e alta expressão de oncomirs em somatotrofinomas sugerem um papel desses na tumorigênese somatotrófica.

Palavras-chave: Adenoma Hipofisário Secretor de Hormônio do Crescimento. Transformação Celular Neoplásica. MicroRNAs. Oncogenes.

ABSTRACT

Introduction: Mutations in *GNAS* and *AIP* genes are present in 35% and 3%, respectively, of the sporadic somatotropinomas. Recently, increased biological importance of microRNAs (miRNAs) has been observed in pituitary tumorigenesis. However, the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of 60% of these tumors remain to be elucidated. **Objectives:** To identify the prevalence of mutations in *GNAS* and *AIP* genes in a series of sporadic somatotropinomas. Compare clinical, biochemical parameters at diagnosis as age, tumor size and their aggressiveness, pre-operative growth hormone (GH), prolactin (PRL) and insulin-like growth factor-I (IGF-1) levels and treatment responsiveness between somatotropinomas with (gsp+) and without (gsp-) *GNAS* mutation. To analyze the expression of *GNAS* and *BTG2* genes and a panel of miRNAs between somatotropinomas and normal pituitaries (NP) and the association between the expression of these genes and miRNAs with aggressiveness, as well as disease control with surgery or control with all adjuvant therapeutic approaches. **Material and Methods:** 26 patients with acromegaly. GH basal $\leq 2.5 \mu\text{g/L}$ or nadir after OGTT $\leq 1 \mu\text{g/L}$ and normal IGF-I matched for age and sex were used as diagnosis and for cure criteria after transsphenoidal surgery (TS). As control after somatostatin analogues (SA), we adopted the normalization of IGF-I matched for age and sex. Tumor size was evaluated by MRI/CT and the degree of invasiveness by Hardy score (I to IV). Tumor samples (26) were obtained during TS, processed for histopathology and stored at -70°C for molecular studies. NP (07) were obtained during autopsy. Total DNA and RNA were extracted by TRIzol®. Codons 201 and 227 of the *GNAS* gene and the whole *AIP* gene were sequenced. Relative expression of *BTG2* and *GNAS* genes and miRNAs let-7a, miR-16a, miR-21, miR-141, miR-143, miR-15a, miR-145, miR-23a, miR-23b, and miR-24-2 was measured by qPCR (TaqMan probes) using $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. **Results:** Frequencies of *GNAS* and *AIP* mutations were 35% and 3.8%, respectively. There was no difference between the mean age (39.0 ± 11.5 vs 43.6 ± 9.0 years, $p=0.32$), basal GH (62.4 ± 128.1 vs $39.9 \pm 48.3 \mu\text{g/L}$; $p=0.39$), IGF-I (435.5 ± 230.8 vs 556.9 ± 238.3 ; $p=0.32$) and PRL (25.7 ± 29.8 vs $30.9 \pm 32.8 \text{ ng/L}$, $p=0.69$) in plasma concentration, and tumor aggressiveness ($p=1.00$) between (gsp+) and (gsp-) groups. We observed that 80% (04/05) of gsp+ whereas 33% (02/06) of the gsp- achieved control ($p=0.07$) after SA therapy adjuvant to TS. When SA, dopamine agonists and/or external radiotherapy were associated 100% (05/05) of gsp+ group and 44% (04/09) of gsp- group ($p=0.08$) showed disease control. There was no difference in *GNAS* expression between somatotropinomas and NP (1.07 ± 0.55 vs 0.98 ± 0.28 , $p=0.97$) as well as between somatotropinomas gsp+ and gsp- (1.04 ± 0.59 vs 1.10 ± 0.55 , $p=0.97$, respectively). Hardy I/II tumors showed higher *GNAS* expression than Hardy III/IV ($p=0.02$), but there was no association between *GNAS* expression and disease control with surgery alone or associated with other adjuvant therapies. We observed hypoexpression of *BTG2* and miR-16a and miR-141 in somatotropinomas compared with NP (-6.6 fold, $p=0.002$; -10.0 fold, $p=0.01$; and -50.0 fold, $p=0.0003$, respectively) with no difference between gsp+ and gsp- somatotropinomas. There was miR-21 overexpression in somatotropinomas compared with NP (20.2 ± 18.5 vs 2.5 ± 3.6 ; 10.2 fold, $p=0.02$), with no difference between gsp+ and gsp- somatotropinomas. However, miR-145 and miR-23b were more hypoexpressed in gsp+ compared to gsp- (-4.8 fold, $p=0.03$ and -2.7 fold, $p=0.02$). There was no

association between the expression of *BTG2* and a panel of miRNAs with aggressiveness or disease control. **Conclusion:** In this series of assumed sporadic somatotopinomas, the frequencies of mutations in *GNAS* (35%) and *AIP* (3.8%) were similar to the literature. There were no differences in clinical and biochemical characteristics, aggressiveness, response to therapy, and *GNAS* expression in patients with gsp+ and gsp- somatotropinomas. Hypoexpression of *BTG2*, a tumor suppressor gene related to p53 and Rb signaling pathways, low expression of tumor suppressor miRNAs and high expression of oncomirs in somatotropinomas suggest a role in the somatotrophic tumorigenesis.

Key words: Growth Hormone-Secreting Pituitary Adenoma. Cell Transformation Neoplastic. MicroRNAs. Oncogenes.

LISTA DE FIGURAS

- 1** Eletroforese em gel de agarose a 0,8%. (1) gel representativo de DNA genômico de 20 amostras tumorais. 64
- 1A** Eletroforese em gel de agarose a 1,2% demonstram a qualidade de RNA total das amostras. (1A) gel representativo de RNA de 12 amostras tumorais 64
- 2** Eletroforese em gel de agarose 1%. Produto da PCR com 424 pb correspondente ao fragmento dos exons 8 e 9 do gene *GNAS*. Linha 1: marcador de peso molecular (Ladder 100pb, Invitrogen); linha 13: controle negativo 65
- 3** Eletroforese em gel de agarose 1,0% dos diferentes produtos de PCR do gene *AIP*. L Ladder 100 pb, Invitrogen. Em A) produto da PCR com 397pb referente ao exon 1; em B) produto de PCR com 426pb referente ao exon 2; em C) produto da PCR com 359pb referente ao exon 3; em D) produto da PCR com 587pb referente aos exons 4-5; em E): produto da PCR com 469pb referente ao exon 6 66
- 4** Sequenciamento do gene *GNAS*. A) Amostra de tecido hipofisário normal; B) Substituição do nucleotídeo citosina na posição 604 do DNA (ENST00000354359) pelo nucleotídeo timina no éxon 8, (Arg201Cys- p.R201C); C) Substituição do nucleotídeo guanina na posição 605 do cDNA (ENST00000354359) pelo nucleotídeo adenina no éxon 8, (Arg201His - p.R201H) 67
- 5** Sequenciamento do gene *GNAS*. A) Amostra de tecido hipofisário normal; B) Substituição do nucleotídeo adenina na posição 683 do Cdna (ENST00000354359) pelo nucleotídeo timina no éxon 9 (Gln227Leu - p.Q227L) 67
- 6** Sequenciamento do gene *AIP* (ENSG00000110711). A) Amostra de tecido hipofisário normal; B) Substituição do nucleotídeo citosina na posição 7748 a partir do ATG inicial pelo nucleotídeo timina no éxon 6 (Arg304X - p.R304X). 68
- 7A** Expressão relativa do gene *GNAS* entre o grupo de somatotrofinoma gsp-positivos, gsp-negativos e hipófises normais, ns: não significativo. 72
- 7B** Expressão relativa do gene *GNAS* entre os tumores (Hardy I/II) e (Hardy III/IV) 72
- 7C** Expressão relativa do gene *BTG2* nos somatotrofinomas e hipófises normais, ns: não significativo. 73

7D	Expressão relativa do gene <i>BTG2</i> nos somatotrofinomas gsp-positivos, gsp-negativos e hipófises normais, ns: não significativo.	73
8	Expressão relativa do miR-16 entre somatotrofinomas e hipófises normais	78
9	Expressão relativa do miR-21 entre os somatotrofinomas e hipófises normais	78
10	Expressão relativa do miR-141 entre os somatotrofinomas e hipófises normais	79
11	Expressão relativa do miR-145 entre os somatotrofinomas gsp-positivos e gsp-negativos.	79
12	Expressão relativa do miR-23b entre os somatotrofinomas gsp-positivos e gsp-negativos	80

LISTA DE TABELAS

1	<i>Primers</i> específicos para a região codificadora do gene <i>AIP</i>	54
2	Concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR	55
3	Dados clínicos, genéticos e laboratoriais dos pacientes com tumor hipofisário secretor de GH	63
4	Dados clínicos e bioquímicos entre os pacientes <i>gsp+</i> e <i>gsp-</i>	70
5	Expressão gênica diferencial entre hipófises normais e somatotrofinoma <i>gsp</i> -positivo (<i>gsp+</i>) e <i>gsp</i> -negativo (<i>gsp-</i>) dos genes <i>GNAS</i> e <i>BTG2</i>	74
6	Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) diferencial dos MicroRNA do estudo entre somatotrofinomas e hipófises normais e entre somatotrofinomas <i>gsp+</i> e <i>gsp-</i>	81
7	Correlação entre a expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes <i>GNAS</i> e <i>BTG2</i> com microRNA	82

LISTA DE QUADROS

1	Importância dos microRnas na tumorigênese hipofisária	44
---	---	----

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

Símbolos

μg	micrograma
μL	microlitro
mL	mililitro
kD	kilo Dalton
nm	nanômetros
pb	(base pair): pares de base
[]	concentração

Abreviaturas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AhR	Receptor aril hidrocarbono
AIP	Proteína de interação com receptor aril hidrocarbono
AS	Análogo da somatostatina
BCL2	Gene célula B leukemia/linfoma;
BTG2	BTG família membro 2
CAB	Cabergolina
cAMP	Adenosine monofosfato cíclico
CDK	Quinases dependentes de ciclinas
CDKN1B	Inibidor de ciclina dependente de quinase 1B
cDNA	DNA complementar
CC	Complexo de Carney
CNF	Clinicamente não funcionante
CREB	Proteína elemento de ligação de resposta ao cAMP

CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CT	Ciclo limiar
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento endotelial
EGF-R	Receptor do fator de crescimento epidermal
ERK1	Extracelular regulador quinase 1
FasL	Ligante da família do fator de necrose tumoral
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
FIPA	Adenoma hipofisário familiar isolado
FSH	Hormônio folículo estimulante
GAPDH	Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato
GH	Hormônio de crescimento
GHRH	Hormônio liberador do hormônio de crescimento
GNAS	GNAS complex locus: subunidade alfa da proteína G;
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
gsp	Guanine Nucleotide-Binding Protein, Alpha-Stimulating Activity Polypeptide 1
<i>GUSB</i>	Glucuronidase, beta
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HMGA2	Grupo AT-ganho 2 de alta mobilidade
HN	Tecido Hipofisário Normal
IGF-1	Fator de Crescimento Insulin-Like I
IHQ	imuno-histoquímica
KLF4	Fator semelhante ao kruppel 4

LH	Hormônio luteinizante
LOH	Perda de heterozigosidade
MAS	Síndrome de McCune Albright
MEN- 1	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1
<i>MEN1</i>	Gene da neoplasia endócrina múltipla 1
MEN-4	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 4
miR	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
NESP55:	Neuroendocrine Secretory Protein 55
Nm23	Fator ligador de purina
OCT4	Fator de transcrição octâmero-4
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>PDCD4</i>	Proteína de morte celular programada 4
PEG	Pegvisomanto
<i>PGK1</i>	Quinase 1 de fosfoglicerato
PKA	Proteína quinase dependente de AMP cíclico;
PKC	Proteína quinase C
<i>PRKAR1A</i>	<i>Protein kinase, cAMP-dependent, Regulatory, Type I, alpha</i> (sub-unidade reguladora tipo 1 alfa da proteína quinase A)
PRL	Prolactina
<i>PTEN</i>	Proteína Fosfatase e homóloga de angiotensina
<i>PTTG</i>	Gene transformador de tumor hipofisário
qPCR	Quantitative PCR; PCR quantitativa
<i>RAS</i>	v-ras Harvey homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato
<i>RB1</i>	Gene do retinoblastoma1
<i>RET</i>	Proto-oncogene RET

RNA	Ácido Ribonucléico
RNM	Ressonância nuclear magnética
SAGE	Análise seriada da expressão gênica
SD	Desvio padrão
SNC	Sistema nervoso central
SOX2	Região determinante do sexo no cromossomo Y
SSTR2	Receptor da somatostatina do subtipo 2
SSTR5	Receptor da somatostatina do subtipo 5
TBE	Tris ácido bórico EDTA
TE	Tris EDTA
TGF- α	Fator α transformador de crescimento
TSH	Hormônio tireo-estimulante
TTGO	Teste oral de tolerância à glicose
ULNR	Limite superior do intervalo normal
VEGF	Fator de crescimento endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Acromegalia	22
1.2	Tumorigênese hipofisária com ênfase aos somatotrofinoma	28
1.3	MicroRNAs e tumorigênese	41
2	OBJETIVOS	48
2.1	Objetivo geral	48
2.2	Objetivos específicos	48
3	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1	Aspectos éticos	50
3.2	Sujeitos	50
3.3	Amostras de tecido	51
3.4	Extração de DNA e RNA	51
3.5	Quantificação e validação do DNA e RNA extraído	53
3.6	Pesquisa da mutação no gene <i>GNAS</i> e no gene <i>AIP</i>	54
3.7	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	55
3.8	Sequenciamento automático	56
3.9	Estudo da expressão de genes e microRNAs	57
3.9.1	Síntese de cDNA	57
3.9.2	PCR em tempo real (qPCR)	57
3.10	Análise estatística	59
4	RESULTADOS	62
4.1	Sujeitos	62
4.2	Amostras de tecido	64
4.3	Pesquisa da mutação no gene <i>GNAS</i> e no gene <i>AIP</i> - Amplificação por PCR	65

4.4	Sequenciamento	67
4.5	Estudo da expressão dos genes <i>GNAS</i> e <i>BTG2</i>	70
4.6	Estudo da expressão dos microRNAs	75
5	DISCUSSÃO	84
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
7	CONCLUSÕES	104
	REFERÊNCIAS	106
	APÊNDICES	121
	ANEXOS	135

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acromegalia

Os tumores hipofisários estão entre as neoplasias intracranianas mais frequentes, correspondendo a 25% de todos os tumores intracranianos e exibem três clássicas manifestações clínicas como hipopituitarismo, excesso na secreção de seus múltiplos hormônios e as manifestações decorrentes dos efeitos compressivos (VANDEVA *et al.*, 2010). A prevalência em autópsias é em torno de 10%, ocorrendo aumento com a idade. Os tumores hipofisários são classificados morfológicamente em microadenomas (<1cm de diâmetro) e macroadenomas (>1cm de diâmetro), podem ser circunscritos, invasivos e/ou expansivos; são geralmente benignos, possuem crescimento lento e podem apresentar, com menor frequência, comportamento local mais agressivo com infiltração e destruição de estruturas ósseas, vasculares e tecido nervoso circunjacentes. Raramente são indutores de metástases, o que os caracterizariam como carcinomas, representando 0,2% nas séries cirúrgicas (SAEGER *et al.*, 2007). No entanto, o tecido hipofisário pode ser sede de metástase de outros tumores, sendo os mais frequentes de mama, pulmão e renal. Do ponto de vista clínico são divididos em adenomas secretores ou “funcionantes” (secretam PRL, GH, ACTH, TSH, LH e FSH, podendo cosecretar dois ou mais hormônios) e adenomas clinicamente não secretores.

Acromegalia, inicialmente descrita por Pierre Marie em 1886, é uma doença crônica e insidiosa decorrente do excesso circulante do hormônio de crescimento (GH) e do seu mediador direto e principal marcador bioquímico da doença o IGF-1 (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1), na qual os pacientes apresentam alterações metabólicas e características físicas peculiares, como crescimento de extremidades e alterações faciais. Quando a hipersecreção do GH/IGF-1 ocorre após o fechamento epifisário dos ossos longos, o quadro clínico é de acromegalia; quando seu surgimento se dá na infância ou na adolescência, antes do indivíduo alcançar sua estatura final, é definida como gigantismo. Normalmente, o diagnóstico é feito em média de 6 a 10 anos após os sintomas iniciais, o que colabora para a alta morbimortalidade associada a esta doença (CHANSON; SALENAVE, 2008; MELMED, 2009).

Tem prevalência entre 40-70 casos por milhão de habitantes, com frequência praticamente igual entre homens e mulheres, com uma incidência anual de 3-4 novos casos por milhão de habitantes. Estudo realizado na população belga revelou uma prevalência de 100-130 casos por milhão de habitantes (DALY, 2006; MELMED, 2009). Pode ocorrer em qualquer idade, mas com pico de incidência entre a terceira e quinta décadas de vida (CHANSON; SALENAVE, 2008; MELMED, 2009).

A principal causa da acromegalia, ocorrendo em mais de 95% dos casos, é o tumor hipofisário produtor de GH (somatotrofinoma) (CHANSON; SALENAVE, 2008), que corresponde a 20% de todos os tumores hipofisários. Porém, existem outras lesões intracranianas raras ectópicas à hipófise capazes de secretar GH e hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH), como os gangliocitomas, neurocitomas e hamartomas hipotalâmicos (ASA *et al.*, 1984), além de lesões no seio esfenoidal ou na região parafaringeana (MELMED, 2009). A produção ectópica autônoma de GH fora do sistema nervoso central é extremamente rara, tendo sido descrita em tumores do pulmão, mama, pâncreas e do trato gastrointestinal (FAGLIA; AROSIO; BAZZONI, 1992). A produção autônoma de GHRH em feocromocitoma, tumores de ilhotas pancreáticas e tumores carcinoides pulmonares também já foi descrita (GOLA *et al.*, 2006; MELMED *et al.*, 1985; VIEIRA NETO *et al.*, 2007; WEISS *et al.*, 2011).

As principais modalidades terapêuticas na acromegalia são a cirurgia transesfenoidal (CTE), a radioterapia e a terapêutica medicamentosa. O tratamento cirúrgico é considerado o tratamento de primeira escolha (padrão-ouro) visando o controle dos níveis hormonais de GH/IGF-1, bem como redução ou ressecção completa do tumor. A possibilidade de ressecção completa dependerá do tamanho e grau de invasão das estruturas vizinhas. A experiência do cirurgião é fator determinante para o sucesso cirúrgico.

A ressecção completa está limitada na maioria dos macroadenomas, principalmente nos invasivos. O procedimento de *debulking* tumoral está associado, em algumas casuísticas, à melhor resposta ao tratamento medicamentoso com agonistas da somatostatina (PETROSSIANS *et al.*, 2005; COLAO *et al.*, 2006). A comparação dos resultados com o tratamento cirúrgico nas diversas séries

publicadas é difícil devido ao emprego de diferentes parâmetros como critério de cura com diferentes graus de rigidez, pela não discriminação da proporção entre macroadenomas invasivos e não invasivos, como também pelo uso de técnicas cirúrgicas diferentes (microcirurgia e endoscópica) (JANE JR *et al.*, 2011). Analisando um conjunto de publicações que utilizam como critério de “cura” normalização de IGF-1 e/ ou GH (<2,5 ou <2,0 ou <1,01 ng/mL) após TTGO (teste de tolerância à glicose), envolvendo 449 acromegálicos, observam-se variações de normalização hormonal entre 82% a 91% em microadenomas, e de 47% a 64% nos macroadenomas com o procedimento cirúrgico (JANE JR *et al.*, 2011; MELMED, 2010). Trabalho analisando os resultados cirúrgicos de uma série de 60 acromegálicos submetidos à cirurgia endoscópica, utilizando os critérios mais recentes para definição de remissão no pós-operatório (GIUSTINA *et al.*, 2010), observou 61% de remissão nos macroadenomas, sendo o GH no pós-operatório precoce <2,5 ng/ml o preditor mais acurado para a remissão (JANE JR *et al.*, 2011).

O tamanho tumoral e a presença de invasão do seio cavernoso são fatores associados a diferentes taxas de remissão, sendo relatada taxa de remissão significativamente menor em tumores maiores que 2 cm quando comparados a tumores entre 1 e 2 cm (27% vs 65%, respectivamente) (LÜDECKE; ABE, 2006). Assim, parece haver uma relação inversa entre as dimensões e a localização tumoral e os resultados cirúrgicos. Complicações cirúrgicas são raras, observadas em menos de 1%, sendo o hipopituitarismo uma das complicações mais frequentes, ocorrendo ao redor de 30%. O acompanhamento por longo período se faz necessário, uma vez que existe a possibilidade de recorrência.

A principal terapêutica medicamentosa utilizada são os análogos da somatostatina (AS). O mecanismo de ação dos AS tem como base fisiológica o fato da somatostatina inibir a liberação do GH pré-formado na adenohipófise, através de sua ligação com 5 tipos de receptores da somatostatina (SSTR1-5). Os AS ligam-se com maior afinidade ao receptor da somatostatina do subtipo 2 (SSTR2) e com menor afinidade ao receptor do subtipo 5 (SSTR5). No fígado os AS possuem ação direta, promovendo diminuição da ligação do GH ao seu receptor no hepatócito e consequentemente levando à diminuição de síntese de IGF-1. Este efeito é independente da sua ação no hipotálamo e nas células hipofisárias (BEN-SHLOMO; MELMED, 2010).

As indicações para o tratamento medicamentoso primário com os AS na acromegalia recaem nas situações nas quais a cirurgia é relativamente contraindicada, como nos macroadenomas invasivos em que existe risco de lesão em estruturas nobres e pouca chance de cura cirúrgica; na presença de comorbidades sérias que aumentem o risco cirúrgico (cardiopatia arritmica grave, malformações em vias aéreas, pneumopatias, etc) e em pacientes idosos com risco cardiovascular alto. Na maioria dos casos, os AS são utilizados como terapêutica adjuvante na falha em controle dos níveis de IGF-1 após a cirurgia e enquanto se aguardam os resultados da radioterapia (PETERSENN *et al.*, 2008; VIEIRA NETO *et al.*, 2011).

Estudo avaliando a eficácia do octreotide-LAR em 80 acromegálicos observou normalização do IGF-I em 43% durante terapêutica primária (28/80), de 54% na terapêutica adjuvante à cirurgia e em 64% no grupo no qual, além da cirurgia, foi utilizado radioterapia. Redução do volume tumoral de pelo menos 25% foi considerada significativa, sendo alcançada em 76% dos pacientes que receberam tratamento primário (JALLAD *ET AL* 2005). Em situações de resistência à terapia com AS, o efeito da terapia combinada de octreotide-LAR e cabergolina (CAB) proporcionou queda importante dos níveis de GH e IGF-I em 50-47% dos pacientes, sendo o grau de controle alcançado com concentrações de GH <2,5 ng/mL e normalização do IGF-I em 21% e 42%, respectivamente (COZZI *et al.*, 2004). Nessa situação, não foi observada correlação da resposta do GH e IGF-I com nível de PRL ou positividade desse hormônio à imunistoquímica, diferentemente quando a cabergolina foi usada como monoterapia. Nesse caso, a presença de cosecreção de GH e PRL e valor inicial do IGF-1 <750mg/L favoreceram uma melhor resposta terapêutica (ABS *et al.*, 1998). Metanálise, avaliando a resposta da CAB em 227 acromegálicos, observou eficácia no controle de IGF-1 em 32% na monoterapia e em 52% na terapia combinada com AS (SANDRET; MAISON; CHANSON, 2011).

Associação da CAB com os AS está indicada em pacientes não controlados com os AS em dose máxima, especialmente naqueles com concentrações plasmáticas de IGF-I pouco a moderadamente elevadas. Na acromegalia já está demonstrada a eficácia superior da cabergolina em relação à bromocriptina na normalização dos níveis de IGF-1. A terapêutica adjuvante com cabergolina em monoterapia na acromegalia é indicada quando existe preferência

por terapêutica oral, após cirurgia em pacientes com níveis basais de GH e IGF-I pouco elevados e/ou cosecreção de prolactina, uma vez que foram esses os fatores associados com melhor resposta terapêutica (VIEIRA NETO *et al.*, 2011).

Durante o acompanhamento de pacientes em terapêutica medicamentosa adjuvante com AS e/ou CAB, valores discordantes de GH randômico e IGF-I poderão ocorrer em 25%-30% dos pacientes (MACHADO *et al.*, 2008). Caso a discrepância entre GH e IGF-I seja mantida, a conduta deve ser baseada nos níveis de IGF-I, pois este reflete a secreção integrada do GH, não apresentando flutuação circadiana, o que o torna uma ferramenta mais precisa para caracterização do controle bioquímico (BARKAN *et al.*, 2010; ELIAS *et al.*, 2009; GIUSTINA *et al.*, 2010).

Pegvisomanto (PEG) é uma droga recentemente aprovada no Brasil indicada para o tratamento de pacientes acromegálicos. É um antagonista seletivo do receptor do GH, tem sua ação antissecretória independente da expressão de receptores de somatostatina ou de dopamina. É um análogo mutado da molécula do GH que difere do GH 22kDa por alterações em dois sítios de ligação. Bloqueia a ação pós-receptor do GH e, conseqüentemente, a produção de IGF-1. Tem se mostrado eficaz na normalização do IGF-1, mas não inibe a secreção do GH, nem induz redução do volume tumoral, podendo ser observado aumento do volume tumoral durante o seguimento inicial, possivelmente por efeito rebote devido à parada do AS (BUHK *et al.*, 2010).

A eficácia terapêutica do PEG como monoterapia foi avaliada em 44 acromegálicos resistentes a AS, sendo observada normalização do IGF-I em 84% dos pacientes, sem correlação entre redução ou normalização dos níveis de IGF-I com idade ou níveis de GH e IGF-I pré-tratamento. Foi observada redução mais pronunciada do IGF-I e percentual de maior controle entre os indivíduos de sexo masculino e nos submetidos à radioterapia prévia (MARAZUELA *et al.*, 2009). Estudo em que foram revisados os dados de 1288 acromegálicos, submetidos à terapêutica com PEG durante cinco anos, demonstrou controle de IGF-1 em 63% dos indivíduos, sendo baixa a ocorrência de crescimento tumoral (VAN DER LELY *et al.*, 2012).

Complicações associadas ao emprego da radioterapia nos adenomas hipofisários têm levado à diminuição da sua indicação como terapêutica adjuvante e raramente como terapêutica primária. Atualmente, sua indicação está limitada para os macroadenomas invasivos, não curados pela cirurgia, ou pacientes sem possibilidade de uso ou sem boa resposta ao tratamento farmacológico otimizado. Salienta-se que longo tempo (em média 10 anos) é necessário para se observar controle efetivo da secreção hormonal após radioterapia (BARKAN *et al.*, 2010). A comparação da eficácia terapêutica entre as duas modalidades de radioterapia convencional e a radiocirurgia guarda um viés de seleção, uma vez que na radiocirurgia os tumores são menores e os estudos usam diferentes critérios para o controle da doença. Observam-se variações de 29 a 60% na taxa de remissão na acromegalia com a utilização da radiocirurgia como terapêutica adjuvante, após *debulking* tumoral, além do controle mais precoce nos níveis de GH/IGF-1 quando comparada à radioterapia convencional (ATTANASIO *et al.*, 2003; ROLSTON; BLEVINS, 2012). A terapêutica com radioterapia tem sido associada a aumento de mortalidade principalmente por eventos cerebrovasculares e desenvolvimento de hipopituitarismo (HOLDAWAY; RAJASOORYA; GAMBLE, 2004).

A concentração plasmática de GH é o determinante mais robusto do excesso de mortalidade nessa doença. Assim, a terapêutica objetivando concentrações entre 1-2 µg/L mantém as taxas de mortalidade semelhantes à população normal (BEN-SHLOMO *et al.*, 2011; HOLDAWAY; RAJASOORYA; GAMBLE, 2004). Atualmente o tratamento é considerado efetivo quando preenche os critérios de cura/controlado estabelecidos pelo consenso realizado em Paris, em 2009, e recentemente publicado (GIUSTINA *et al.*, 2010). No consenso, são considerados controlados pacientes com concentrações plasmáticas de GH basal randômico <1ng/mL ou nadir de GH <0,4 ng/mL durante o TOTG e normalização do IGF-I para a idade. Segundo as recomendações do novo consenso, quando existem valores discordantes entre os níveis de GH e IGF-1, deverá ser utilizada a média dos valores de GH randômico obtidos em 05 medidas diferentes a cada 30 minutos, sendo definido como controle bioquímico o valor médio de GH abaixo de 1,0 ng/mL (GIUSTINA *et al.*, 2010). Porém, quando o objetivo é avaliar controle de doença com as diferentes modalidades terapêuticas, a maioria dos estudos disponíveis utiliza, ainda, o critério de Cortina (GIUSTINA *et al.*, 2000). O estudo dos fatores biológicos

e genéticos envolvidos na tumorigênese hipofisária pode resultar em escolha terapêutica mais individualizada, com maior chance de sucesso no controle bioquímico e controle do crescimento tumoral.

1.2 Tumorigênese hipofisária com ênfase aos somatotrofinomas

Na tumorigênese humana, os mecanismos moleculares envolvidos são múltiplos e complexos. Alterações genéticas não letais, que levam à desordem no DNA e perda das informações corretas para a manutenção do ciclo celular, podem ser adquiridas através da ação de agentes externos (radiações, produtos químicos e vírus) no DNA, por agentes endógenos provenientes do metabolismo celular, ou ainda podem ser mutações herdadas. Quatro classes de genes reguladores são os principais alvos dos defeitos genéticos, sendo eles, os proto-oncogenes, os genes supressores tumorais, os genes que regulam a morte celular programada (apoptose) e os genes envolvidos com o reparo do DNA. O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese e progressão dos tumores hipofisários, o papel dos neuropeptídeos hipotalâmicos, dos esteróides, dos fatores de crescimento e suas vias de sinalização não foram totalmente elucidados.

A importância de fatores hipotalâmicos na fisiopatologia dos adenomas hipofisários tem pouco respaldo, uma vez que, na vasta maioria dos casos de adenomas em humanos, encontramos lesões focais neoplásicas e não hiperplasia generalizada tecidual. Com a utilização de técnicas apropriadas foi demonstrada preferência para apenas um cromossomo X em tumores hipofisários, o que sugere origem comum de todas as células tumorais, ou seja, monoclonalidade. Adicionalmente foi demonstrada a presença de expansão clonal em tumores com imunohistoquímica (IHQ) positiva para prolactina, hormônio adrenocorticotrófico, folículo estimulante e/ou luteinizante (HERMAN *et al.*, 1990; LEVY, 2000). De acordo com esta hipótese, após um evento que favoreceu a mutação na célula com ganho de função proliferativa, um segundo evento seria o responsável por alterações nos fatores regulatórios promovendo a expansão clonal.

Nesse contexto, pesquisas de mutações ativadoras nos genes dos receptores dos hormônios hipotalâmicos, como *GHRH-R*, *GnRH-R*, *TRH-R*, *D2R*,

SSTR2, e *SSTR5*, mostram que as referidas mutações são raramente encontradas em tumores hipofisários em humanos e não representam um mecanismo importante que leve à vantagem de crescimento nas células hipofisárias. Em uma série de somatotrofinomas estudada, 20% dos tumores apresentavam uma substituição de um nucleotídeo no gene do GHRH-R, porém sem levar a incremento no AMPc, sendo, portanto, considerada um polimorfismo frequente na população (SALVATORI *et al.*, 2001). Ressalta-se, ainda, que uma mutação germinativa (Arg240Trp) no *SSTR5* foi relatada em um somatotrofinoma resistente ao análogo da somatostatina (BALLARE *et al.*, 2001). Apesar de o GHRH estimular a proliferação dos somatotrofos, mutação com ganho de função ativadora no *GHRH-R* não foi encontrada (SALVATORI *et al.*, 2001).

O desenvolvimento dos tumores hipofisários também está na dependência da ativação ou inativação de oncogenes (*PTTG*, *CCND1*, *gsp*), da perda de genes supressores tumorais e desregulação de genes envolvidos com o ciclo celular. Proto-oncogenes clássicos da tumorigênese geral como *MYC*, *BCL1*, *FGF4/HSTF1*, *SEA* e *HER2* aparentemente não têm influência na patogênese dos adenomas hipofisários (ASA; EZZAT, 2009; MELMED, 2003).

O gene *PTTG* (*pituitary tumor transforming gene*) é uma securina de mamíferos, tendo participação importante na mitose ligando-se e inibindo as separinas, as quais clivam a ligação das cromátides irmãs durante a metáfase (ZOU *et al.*, 1999). O *PTTG* é degradado no final da metáfase, permitindo separação igual das cromátides irmãs. A hiperexpressão do *PTTG* promove aneuploidia, inibindo a segregação harmônica das cromátides e aumentando o número de células aneuplóides, levando, assim, à instabilidade genômica e configurando sua ação como oncogene. Dessa forma, tanto excesso de *PTTG*, como observado em tumores, quanto perda do mesmo, leva à ruptura do ciclo celular e aneuploidia. Essas características apontam o *PTTG* como um gene “zelador”, o qual assegura estabilidade genômica (PEI; MELMED, 1997). A maior expressão de *PTTG* foi encontrada em somatotrofinomas que apresentavam critério de invasibilidade ao exame radiológico quando comparados com adenomas sem sinais de invasão local (ZHANG *et al.*, 1999). Existem evidências de que este oncogene estimula, por interação parácrina, a expressão do fator de crescimento de fibroblastos básico do

tipo 2 (FGF-2), conhecido mediador do crescimento celular e de angiogênese e, portanto, da patogênese tumoral geral.

Na hipófise normal e tumoral são produzidos vários fatores de crescimento, como o *Transformin growth fator α* (TGF- α), o fator de crescimento epitelial (EGF), além da expressão de seus diferentes receptores, estando estes hiperexpressos em adenomas hipofisários, principalmente nos mais agressivos (METE; EZZAT; ASA, 2012). Adicionalmente, o FGF-2 também leva à hiperexpressão do *PTTG*, constituindo, assim, um mecanismo de retroalimentação positiva. Existe associação funcional direta entre o *PTTG*, o *FGF-2* e angiogênese, sugerindo que a transativação do *FGF-2* pelo *PTTG* pode causar aumento da vascularização de tumores hipofisários (MCCABE *et al.*, 2003). Estudo analisando 103 adenomas hipofisários demonstrou correlação positiva entre a expressão do *PTTG* e do fator de crescimento endotelial (VEGF), reforçando uma possível ação na regulação da angiogênese hipofisária (MCCABE *et al.*, 2002). Porém, ainda não é clara a relação entre o grau de expressão do *PTTG* e o prognóstico dos adenomas hipofisários.

Os genes de supressão tumoral são responsáveis por codificarem proteínas que regulam o ciclo celular e mantêm a estabilidade genômica, evitando que mutações gênicas sejam perpetuadas no processo de duplicação celular.

Em modelos animais de camundongos *Knockout*, para os genes supressores tumorais envolvidos na regulação do ciclo celular (*Rb* e *p27^{Kip1}*), ocorre desenvolvimento de adenomas hipofisários no lobo intermédio (MELMED, 2003). A proteína nuclear *Rb* é reguladora final do ciclo celular da fase G1-S. Deleção heterozigota no gene *Rb* em camundongos também leva ao desenvolvimento de tumor hipofisário (MELMED, 2003).

Estudo em humanos demonstrou diminuição da expressão da proteína *p27^{Kip1}* em adenomas hipofisários produtores de ACTH recorrentes e em carcinomas, quando comparados a tecido hipofisário normal, bem como em somatotrofinomas, prolactinomas e adenomas produtores de TSH observou-se menor expressão da *p27^{Kip1}*, quando os tecidos tumorais foram comparados às respectivas células de origem; além do que, a transformação maligna dos tumores

foi acompanhada de total perda de expressão da proteína (LIDHAR *et al.*, 1999). Em outro estudo com adenomas hipofisários a hipoexpressão da p27^{Kip1} foi relacionada à recorrência tumoral, sendo lesões que apresentaram alto índice proliferativo e maior imunomarcção pelo Ki67 (NAKABAYASHI; SUNADA; HARA, 2001).

O gene *CCND1* (Cyclin D1) localizado no 11q13 é o mais frequentemente amplificado em tumores humanos. Um estudo demonstrou a presença de desbalanço alélico do gene *CCND1* em 25% dos tumores hipofisários, com maior frequência em tumores mais invasivos, sendo observada maior imunomarcção da proteína ciclina D1 em tumores clinicamente não funcionantes quando comparados aos somatotrofinomas (HIBBERTS *et al.*, 1999).

O gene *BTG2* (*B-Cell Translocation Gene 2*) está localizado no 1q32, é largamente expresso em tecidos normais e tem sua expressão diminuída durante a carcinogênese, além de atuar em diferentes linhagens celulares como supressor tumoral (LIM, 2006). A proteína codificada por esse gene é membro da família BTG/Tob. Tal família de proteínas tem propriedades antiproliferativas e está envolvida na regulação da transição das fases G1/S e G2/M do ciclo celular. Foi demonstrada a importância do *BTG2* na regulação das ciclina D1/pRb, ciclina E/E2F/pRb e p53/p21, proteínas que regulam o ciclo celular (BOIKO *et al.*, 2006; ROUAULT *et al.*, 1996). A ação na inibição da expressão da ciclina D1 resulta no impedimento da proliferação celular na fase G1/S, por atuar na proteína pRb, mantendo a mesma na sua forma não fosforilada e ativa (BOIKO *et al.*, 2006). Por outro lado, o gene *BTG2* inibe a degradação da ciclina A e B1 na fase G2/M e se liga diretamente a Cdc2, resultando na diminuição da mitose e aumento da morte celular, causando supressão da tumorigênese. Além disso, regula a transição do ciclo celular na fase G1/Se a fase G2/M em sistemas com células tumorais nos quais ocorreu inativação da pRb e p53, respectivamente, demonstrando sua importância como regulador do ciclo celular independente dessas vias. Assim, a regulação da fase G1/S e da senescência celular por biosíntese atrasada de ciclina e da proteína CDK4 pode ocorrer por via independente da pRb (LIM, 2006).

O *BTG2* tem expressão constitutivamente elevada no timo, no epitélio alveolar do pulmão, no túbulo proximal do rim e células da camada basal da próstata, sendo o nível de expressão normalmente baixo nos seus tumores

correspondentes (LIM, 2006). Adicionalmente, estudo com células de câncer de mama MCF-7 demonstrou que a ação do ácido retinóico como anticarcinogênico seria, em parte, mediada por aumento da expressão do *BTG2* (DONATO; SUH; NOY, 2007). Em modelos experimentais foi observado hipossupressão do *PC3* (homólogo em ratos do *BTG2*) em meduloblastoma, como também, nas lesões pré-malignas (FARIOLI-VECCHIOLI *et al.*, 2007). Esses achados sugerem uma função de supressão tumoral do gene *BTG2*. Na literatura é encontrado apenas um estudo envolvendo o *BTG2* na tumorigênese hipofisária, em um pequeno número de somatotrofinomas; hipossupressão do RNAm do *BTG2* também foi observada (JIANG; GUI; ZHANG, 2010).

A presença de alterações gênicas em genes supressores tumorais comumente encontrados em neoplasias não endócrinas, como o *RAS* e o *TP53*, é de ocorrência rara nos adenomas hipofisários (BOS, 1989). Estudo pesquisando a presença de alterações estruturais nos genes *RAS* (*N-ras*, *H-ras* e *K-ras*) encontrou mutação pontual no *H-ras* em 1 dos 19 tumores hipofisários analisados, sendo este secretor de prolactina com grande invasibilidade e comportamento agressivo (KARGA *et al.*, 1992). Em outra casuística composta por 78 tumores hipofisários (prolactinomas invasivos, não invasivos e carcinomas) não foi encontrada mutação no *RAS* (CAI *et al.*, 1994). O gene supressor tumoral *TP53* está normalmente relacionado à agressividade de lesões tumorais. Em tumores hipofisários, aumento da expressão de p53 foi demonstrado em prolactinomas agressivos, porém outros estudos não confirmaram os mesmos achados (HERMAN *et al.*, 1993; LANIA *et al.*, 2010). Um estudo no qual foram analisados fatores associados à chance de progressão pós-cirurgia não observou associação entre a reatividade da proteína p53 por IHQ e a recidiva pós-cirúrgica, já o Ki-67 foi preditor independente de progressão tumoral (GEJMAN; SWEARINGEN; HEDLEY-WHYTE, 2008). Estudos na literatura demonstram ausência de mutações no gene *TP53* em adenomas secretores de GH e prolactinomas (HERMAN *et al.*, 1993) e em carcinomas hipofisários (METE; EZZAT; ASA, 2012).

Outro gene supressor tumoral possivelmente associado à tumorigênese hipofisária é o *nm23* (*purine-binding factor gene*). A expressão do RNA do *nm23* foi estudada em 22 tumores hipofisários, sendo constatada redução significativa da expressão da isoforma H2 e da imunorreatividade de sua proteína em adenomas

invasivos (TAKINO *et al.*, 1995). Entretanto, esses tumores não expressaram alterações estruturais do gene *nm23* (TAKINO *et al.*, 1995).

O fenômeno de apoptose encontra-se normalmente supresso em células neoplásicas, criando um desbalanço entre a atividade mitótica e apoptótica, contribuindo para o crescimento celular. A análise da expressão de fatores antiapoptóticos como o B-cell CLL/lymphoma 2 (*bcl-2*) e o fator BCL2-associated X protein (*bax*) proapoptótico, isolados ou na forma de índice apoptótico (*bcl-2/bax*) em tumores hipofisários, demonstraram resultados conflitantes, sendo observado hipoexpressão do *bcl-2* em carcinomas hipofisários quando comparado com tecidos hipofisários não tumorais (METE; EZZAT; ASA, 2012).

A cascata de sinalização RAF/MEK/ERK regula diferenciação celular, apoptose e crescimento celular, estando envolvida com desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias (JAFFRAIN-REA; ROTONDI; ALESSE, 2013). De modo geral, sinais extracelulares como GHRH e EGF ativam o receptor tirosina quinase que, por sua vez, ativa a proteína do oncogene *RAS*, a proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase C (PKC) (JAFFRAIN-REA; ROTONDI; ALESSE, 2013; LANIA *et al.*, 2003). *RAS* ativará ERK1/2 através da proteína RAF. ERK1/2, PKA e PKC estimulam a transcrição de genes de proliferação celular (LANIA *et al.*, 2003). Diversas alterações nas vias de sinalização celular sugerem um papel importante na tumorigênese hipofisária. A via da PKC foi estudada em células tumorais hipofisárias nas quais a sua atividade bioquímica encontrava-se aumentada (LANIA *et al.*, 2003). Adicionalmente, foi observada a presença de mutação pontual do gene da PKC em adenomas invasivos, tornando esta via importante na tumorigênese hipofisária (ALVARO *et al.*, 1993). O uso experimental de ativadores da via PKC foi associado a aumento da secreção de GH, enquanto que inibidores da via resultam em diminuição de secreção de GH na maioria dos somatotrofinomas estudados (LANIA; MANTOVANI; SPADA, 2003).

As causas genéticas dos tumores hipofisários estão parcialmente esclarecidas em quatro síndromes raras: complexo de Carney (CC), neoplasia múltipla tipo-1 (MEN-1), MEN-4 (neoplasia múltipla tipo-4), adenoma hipofisário familiar isolado (FIPA) e Síndrome de McCune-Albright (MAS) (BECKERS; ROSTOMYAN; DALY, 2012; VANDEVA *et al.*, 2010). Atualmente, estima-se que os

adenomas hipofisários apresentam origem familiar em aproximadamente 5% do total de casos (DALY, A. F. *et al.*, 2006; STRATAKIS *et al.*, 2010).

No CC, síndrome de herança autossômica dominante, em que há a presença de lesões tumorais em várias glândulas endócrinas, tem sido descrita hiperplasia multifocal de células somatotrófica, raros relatos de prolactinomas, mixomas, tumores adrenais, testiculares e da tireoide (STRATAKIS *et al.*, 2010). Este modelo de doença demonstra a importância do AMPc, que atua como segundo mensageiro, envolvido nas vias de indução de proliferação celular nas células hipofisárias, notadamente nas células produtoras de GH. Em tais células existe uma ampliação da resposta celular da via de sinalização da PKA ao AMPc devido à presença, em mais de 50% dos casos, de mutação germinativa e inativadora no gene supressor tumoral *PRKAR1A* (subunidade reguladora tipo 1 alfa da proteína quinase A), que codifica a subunidade reguladora tipo 1 alfa da PKA (BOIKOS; STRATAKIS, 2007; STERGIOPOULOS *et al.*, 2004). A subunidade reguladora tipo 1 alfa exerce atividade inibitória sobre a atividade da PKA. Na hipófise, o receptor do GHRH utiliza a via AMPc/PKA para estimular a síntese e secreção de GH. No CC, mesmo em indivíduos assintomáticos para o excesso na ativação do eixo GH/IGF-1, ocorrem anormalidades bioquímicas como elevação do GH/IGF-1 e/ou não supressão do GH com sobrecarga de glicose em aproximadamente 75% dos casos (STERGIOPOULOS *et al.*, 2004). A acromegalia clínica ocorre em 10% dos indivíduos com CC. Os achados de imunohistoquímica não diferem entre os somatotrofinoma associados ao CC e os de ocorrência esporádica, não havendo relato de mutação no *PRKAR1A* entre os esporádicos (BOIKOS; STRATAKIS, 2007; STERGIOPOULOS *et al.*, 2004).

MEN-1 é uma rara síndrome genética autossômica dominante de alta penetrância, na qual existe a ocorrência de tumores primários comprometendo dois ou mais tecidos endócrinos em um mesmo paciente. Ela inclui a associação de hiperparatireoidismo (em 95% dos casos), adenomas da hipófise anterior (em 15% a 90%) e neoplasias das ilhotas pancreáticas (em 30% a 80%) (PIECHA; CHUDEK; WIECEK, 2008). O gene *MEN1*, responsável pela MEN-1, foi mapeado no braço longo do cromossomo 11 (11q13), contém 10 éxons e codifica uma proteína composta por 610 aminoácidos denominada “menin” (LARSSON *et al.*, 1988). O gene *MEN1* parece ter ação nas vias de sinalização envolvidas no controle

do crescimento e proliferação celular durante a embriogênese e na vida pós-natal (LARSSON *et al.*, 1988). Sabe-se que a proteína menin é predominantemente nuclear e se liga ao fator de transcrição *junD* inibindo-o; além disso, estudos mais recentes demonstraram que menin também interage com outras proteínas, como NFkB P ϵ m, SMAD3, RPA2, FANCD2, NM23 beta, GFAP, vimentina, RUNX2 e uma variedade de fatores transcricionais. No entanto, o papel fisiológico dessas interações ainda não foi totalmente esclarecido e ainda não foi possível estabelecer a sinalização intracelular de menin em tecidos normais ou tumorais (CALENDER, 2010). Encontra-se hipoexpressão da menin em diferentes tipos histológicos de adenomas hipofisários, com ausência de expressão em carcinoma produtor de PRL (JAFFRAIN-REA; ROTONDI; ALESSE, 2013).

Mais de 600 mutações germinativas já foram identificadas em famílias com MEN-1, estando distribuídas por todos os 9 exons do gene *MEN1* (o éxon 1 não é transcrito). Entre 10 a 30% dos pacientes com achados fenotípicos da MEN-1 não apresenta mutação no *MEN1*, sugerindo o envolvimento de outros genes (CALENDER; RICH; PERRIER, 2008). A prevalência de tumores hipofisários na MEN-1, em diferentes séries, varia de 15% a 50%. Na série de Vergès e cols, houve predomínio de macroadenomas (85%), sendo 32% invasivos (VERGÈS *et al.*, 2002). Os tumores hipofisários representam a terceira manifestação mais comum da MEN-1, sendo os prolactinomas os mais frequentes (60%), seguidos pelos clinicamente não-funcionantes (15%) e os somatotropinomas em 10% dos casos (CALENDER; RICH; PERRIER, 2008).

Até o momento, não foi possível estabelecer relação genótipo-fenótipo nos casos de MEN-1. LOH (perda de heterozigiosidade) na região do gene *MEN1* é encontrada em 10% a 30% dos tumores endócrinos esporádicos, sugerindo que o *MEN1* teria implicações no desenvolvimento desses tumores; porém os estudos falharam em demonstrar a presença de alterações de expressão ou mutações em pacientes com adenoma hipofisários esporádicos, sendo observada mutação germinativa no *MEN1* em menos de 3% dos casos (JAFFRAIN-REA; ROTONDI; ALESSE, 2013). Assim, o gene *MEN1* atua como supressor tumoral e seu envolvimento na tumorigênese hipofisária ainda é objeto de pesquisas (CALENDER, 2010).

A MEN-4 caracteriza-se por uma síndrome recessiva rara que compartilha achados fenotípicos da MEN-1 e MEN-2 e está associada a tumores endócrinos, nos quais não se encontram mutações no *MEN1* (GEORGITSI, 2010). Inicialmente foi descrita em uma família alemã na qual existia a associação entre somatotrofinoma, hiperpartireoidismo, neoplasia maligna de próstata e testículo e foi detectada uma mutação germinativa *nonsense* no gene *CDKN1B/p27^{Kip1}* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*) (PELLEGATA *et al.*, 2006). Em ratos, os achados fenotípicos da mutação no *CDKN1B/p27^{Kip1}* compreendem múltiplos tumores neuroendócrinos como feocromocitoma, carcinoma medular de tireoide, hiperplasia pancreática e adenoma de hipófise (PELLEGATA *et al.*, 2006).

O gene *CDKN1B* localiza-se no cromossomo 12p13, sendo responsável por codificar uma proteína nuclear, *p27^{Kip1}*, composta por 198 aminoácidos, que por sua vez regula negativamente a progressão do ciclo celular, atuando como um inibidor de quinase dependente de ciclina. Posteriormente, mutação germinativa em *frameshift* foi descrita no *CDKN1B/p27^{Kip1}* em uma portadora de carcinoma de cervix, tumor hipofisário produtor de ACTH e hiperpartireoidismo (GEORGITSI *et al.*, 2007). Entretanto, a ocorrência de mutação no gene *CDKN1B* foi baixa em estudos envolvendo 456 casos sem mutações no *MEN1* e, portanto, suspeitos para MEN-4, permanecendo uma grande parcela desses indivíduos sem um achado genético que possa ser associado à presença de múltiplos tumores (GEORGITSI, 2010). Assim, a ocorrência de mutação somática no *CDKN1B/p27^{Kip1}* é inexistente ou muito rara tanto na acromegalia familiar quanto na esporádica (GEORGITSI *et al.*, 2007; TICHOMIROVA *et al.*, 2012).

A FIPA é uma síndrome clínica autossômica dominante na qual ocorre a presença de dois ou mais casos de adenomas hipofisários na mesma família, sem a associação de outros tumores endócrinos, sendo responsável por 1% de todos os adenomas hipofisários, podendo ter apresentação homogênea ou heterogênea. FIPA reúne as apresentações clínicas do IFS (somatotrofinoma familiar isolado) e da APA (predisposição familiar para adenoma hipofisário), em que 90% são portadores de IFS. Os portadores de FIPA são diagnosticados em idade mais jovem e apresentam tumores hipofisários mais agressivos, sendo os prolactinomas, somatotrofinomas, não funcionantes e os mamosomatotrofos os mais frequentes (CHAHAL, H.S. *et al.*, 2010; DALY, A. F. *et al.*, 2006; TICHOMIROVA; DALY;

BECKERS, 2009). A ausência de achados clínicos semelhantes aos portadores de MEN-1 fez com que houvesse interesse em se pesquisar outras alterações genéticas que justificassem a presença de FIPA. Assim, foi descrito em famílias com acromegalia LOH no locus 11q13 sobrepondo o locus do gene NEM1 (BENLIAN *et al*, 1995, YAMADA *et al*, 1997, GADELHA *et al.*, 1999, 2000), sendo caracterizada como a região do gene *AIP* (proteína de interação com receptor aril hidrocarbono).

O *AIP* é um gene supressor tumoral, no qual ocorrem mutações em até 15-20% das famílias com FIPA e destas, 50% apresentam-se com somatotrofinoma. O gene *AIP* está localizado no cromossomo 11q13.3, na mesma região do *MEN1*, contém 6 exons e codifica uma proteína ácida cochaperona com 330 aminoácidos. Perda de heterozigossidade (LOH) foi observada em tumores de pacientes portadores de mutação no *AIP* reforçando seu papel como supressor tumoral, favorecendo a teoria do “*second-hit*” com perda do alelo normal (KNUDSON, 1996).

A proteína codificada por esse gene interage com o receptor para hidrocarbonetos arilo (AhR-receptor aril hidrocarbono) que, por sua vez, atua como um factor de transcrição ativado pelo ligante (dioxinas). A proteína codificada pelo *AIP* é responsável pela estabilização no citoplasma do complexo multiprotéico formado pelo AhR e pela proteína chaperona HSp-90 (proteína de choque térmico 90). Quando ocorre ligação do complexo multiprotéico com dioxinas (cancerígenos) ocorre migração do mesmo para o núcleo. No núcleo, a proteína *AIP* se desprende do complexo multiprotéico e o AhR interage diretamente com regiões promotoras do DNA (elementos responsivos à xenobióticos) realizando a transcrição de genes específicos. Na presença de mutação no *AIP* e geração de um receptor mutado ocorre sequestro do mesmo e inibição de função transcripcional (CHAHAL, H.S. *et al.*, 2010). O AhR é capaz de regular a expressão de muitos xenobióticos, (CHAHAL, H.S. *et al.*, 2010). Assim, disruptores endócrinos como dioxinas e outros poluentes ambientais poderiam, potencialmente, atuar como fatores levando à disfunção hipofisária.

A participação do gene *AIP* ocorre nas formas familiares com predisposição ao desenvolvimento de adenomas hipofisários produtores de GH, PRL e GH/PRL em que não foram identificadas outras síndromes, como CC e MEN-1. Mutações germinativas *nonsense* e em sítios de *Splice* (IVS3-1G>A) no *AIP* foram

detectadas em famílias italianas (p.R304X), finlandesas (p.Q14X) (VIERIMAA *et al.*, 2006) e em uma família brasileira (TOLEDO *et al.*, 2007). Em estudo multicêntrico, envolvendo 73 famílias com FIPA de nove países, incluindo o Brasil, mutações no gene *AIP* foram observadas em 11 das 73 famílias, sendo observado 10 diferentes mutações (Q142X, Q217X, Q239X, R304X, R16H, R271W, K241E, G47_R54del, E174fs e Q285fs), reforçando que mutações neste gene ocorrem em uma pequena proporção de famílias com FIPA (20%) (CHAHAL, H. S. *et al.*, 2010; DALY *et al.*, 2007). Portadores de FIPA com mutação no *AIP* são indivíduos mais jovens ao diagnóstico e com maior frequência de macroadenomas quando comparados aos sem mutação no *AIP* e aos adenomas esporádicos (CHAHAL, H. S. *et al.*, 2010; KORBONITS; STORR; KUMAR, 2012).

A presença de mutação germinativa no *AIP* em adenomas hipofisários esporádicos e em outros tumores endócrinos como pâncreas, adrenal, tireoide, carcinoides é infrequente, ocorrendo em aproximadamente 2-2,7% dos casos, não sendo relatada a presença de mutações somáticas nos tumores analisados (CAZABAT *et al.*, 2012; RAITILA *et al.*, 2007). Estudo de colaboração internacional com 36 centros em adenomas hipofisários de diferentes subtipos demonstrou que a mutação germinativa no *AIP* predomina em pacientes masculinos, jovens ao diagnóstico, com macroadenomas e invasibilidade em 93% e 56% dos casos, respectivamente (DALY *et al.*, 2010). Mutação germinativa no *AIP* também predomina em acromegálicos mais jovens ao diagnóstico e portadores de macroadenomas (CAZABAT *et al.*, 2009; DALY *et al.*, 2010)

A síndrome de McCune Albright (MAS) é caracterizada pela presença de puberdade precoce, doença óssea poliostótica, manchas *café au lait* além da ocorrência de gigantismo ou acromegalia, hiperplasia suprarrenal, hiperparatireoidismo, hipertireoidismo; tendo como base molecular a presença de mutação ativadora no gene *GNAS* (DIAZ; DANON; CRAWFORD, 2007).

O gene *GNAS* (*GNAS complex locus*) humano apresenta 20kb, possui 13 exons, está localizado na região 20q13.32, sendo um dos seus transcritos a subunidade α da proteína G, necessária para ativação da adenilciclase e geração de AMPc (WEINSTEIN *et al.*, 2004). Em várias células endócrinas, incluindo as células

hipofisárias, o AMPc ativa vias de sinalização com função de induzir mitose, sendo um fator de crescimento celular (WEINSTEIN *et al.*, 2004).

As proteínas G (*guanine nucleotide-binding proteins*) são heterotrímeros constituídos por subunidades (α -alfa, β -beta e γ -gama). A função principal é reconhecer os receptores acoplados à proteína G (GPCR), ativá-los e transmitir a mensagem para os sistemas efetores (adenilciclase e canais iônicos) gerando assim resposta celular.

A ativação de GPCR por um sinal extracelular (ex; GHRH e ACTH) causa alteração conformacional na proteína G resultando na troca do GDP pelo GTP, dissociando a subunidade α da sua forma trimérica inativa (α , β e γ). A subunidade α ativada, interage com moléculas efetoras como a adenilciclase, fosfodiesterases dependentes de AMPc, canais iônicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), aumentando (G_s) ou inibindo (G_i) a conversão de ATP em AMP cíclico (segundo mensageiro). Este, por sua vez, ativa as vias de sinalização dependentes da proteína-kinase A (PKA) e fosforila a proteína ligadora responsiva a AMPc (CREB), estimulando síntese hormonal e proliferação celular (DONANGELO; GADELHA, 2004).

A autodesativação das vias de sinalização envolvendo os GPCR se dá pela presença de atividade GTPas e intrínseca na subunidade α -alfa. Dessa forma, como os GPCR atuam regulando funções celulares como proliferação e sobrevivência, estes são apontados como elementos-chave no crescimento, metástase e agressividade tumoral. Assim, mutações envolvendo a proteína G e seus receptores vêm sendo alvo de estudos na tumorigênese humana (MANTOVANI; LANIA; SPADA, 2010).

Mutações ativadoras, somáticas, pontuais, do tipo *missense* em heterozigose nos éxons 8 e 9 do gene *GNAS* transformam o proto-oncogene *GNAS* no oncogene *gsp* (*Guanine Nucleotide-Binding Protein, Alpha-Stimulating Activity Polypeptide 1*) e resultam da substituição de um aminoácido na proteína $G_s\alpha$, em que, no codon 201, encontramos a substituição da arginina por cisteína (Arg201Cys) ou histidina (Arg201His) e no códon 227, a substituição da glicina por arginina (Gln227Arg) e glicina por leucina (Gln227Leu). A presença dessas alterações nucleotídicas tornam a proteína $G_s\alpha$ constitutivamente ativa, por perder a

capacidade intrínseca de hidrolisar o GTP (atividade GTPase), levando à formação contínua de AMPc (WEINSTEIN *et al.*, 2004). Tais mutações resultam em hiperplasia celular e hipersecreção hormonal, levando a fenótipos como acromegalia, gigantismo, puberdade precoce e hipertireoidismo, uma vez que na hipófise, ovários e tireoide, a ativação constante de AMPc atuaria como mitógeno (LANDIS *et al.*, 1989). Mutações no gene *GNAS* também estão associadas a outros fenótipos clínicos além dos observados na MAS, como pseudohipopatireoidismo tipo 1a e pseudohipopatireoidismo tipo 1b (MANTOVANI *et al.*, 2000).

A associação entre presença da mutação no gene *GNAS* e a presença de tumores hipofisários levou ao interesse para realização de *screening* para a mutação, em subunidades da proteína G, em portadores de tumores hipofisários (BOIKOS; STRATAKIS, 2007). O gene *GNAS* pode sofrer *imprinting* genômico, mecanismo de regulação da expressão génica que permite apenas a expressão de um dos alelos parentais. Ao contrário da maioria dos genes em que a expressão é bialélica, os genes que estão submetidos a este mecanismo (genes *imprinted*) têm expressão monoalélica, apenas um alelo está ativo (materno ou paterno) levando a uma diferença funcional nas células somáticas da prole, em que um dos alelos parentais não é expresso e o outro é transmitido (MANTOVANI; BONDIONI; LOCATELLI; *et al.*, 2004; WEINSTEIN *et al.*, 2004). O *imprinting* do *GNAS* parece ser tecido específico e evidências sugerem que ele tenha efeito nas manifestações clínicas em portadores de mutações ativadoras (MANTOVANI *et al.*, 2002; WEINSTEIN *et al.*, 2004). No tecido hipofisário é encontrado um padrão materno de expressão da proteína $G_s\alpha$ (MANTOVANI; BONDIONI; LANIA; *et al.*, 2004). Hayward e colaboradores mostraram que em 21 de 22 tumores hipofisários secretores de GH, a mutação *gsp* encontrava-se no alelo materno (HAYWARD *et al.*, 2001).

A presença de mutação somática pontual ativadora na subunidade alfa da proteína G está implicada na patogênese dos somatotrofinomas em cerca de 40% dos casos e em 10% dos adenomas não secretores. Apresentando, ainda, prevalência variável em diversos grupos raciais (JOHNSON *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2001; MENDOZA *et al.*, 2005; SHI *et al.*, 1998; TABOADA *et al.*, 2009). Assim, a mutação somática na subunidade α da proteína G_s é a alteração genética mais bem estabelecida na tumorigênese hipofisária até o momento. Porém, em 60-70% dos

adenomas somatotróficos os mecanismos moleculares permanecem ainda por ser elucidados.

1.3 MicroRNAs e tumorigênese

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas (20-23 nucleotídeos) de RNA não-codificantes de fita simples, endógenos, considerados na atualidade elementos fundamentais de regulação da expressão de diversos genes envolvidos na tumorigênese. A desregulação na expressão de microRNAs tem sido observada em uma variedade de doenças humanas, em especial no desenvolvimento do câncer. Os microRNAs que regulam negativamente oncogenes podem atuar como supressores de tumor. Por outro lado, os microRNAs que regulam negativamente genes supressores de tumor ou relacionados com diferenciação celular, quando se encontram hiperexpressos ou amplificados em tecidos tumorais, podem atuar como oncogenes (BARTEL, 2004). Estudos vêm demonstrando que os microRNAs estão localizados em regiões frágeis dos cromossomos que sofrem perda de heterozigose, amplificação, integração viral e estão associadas ao desenvolvimento do câncer em geral (BARTEL, 2004; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010).

Na via da biogênese dos micro-RNAs, os mesmos são inicialmente transcritos como longas fitas de RNA com cauda poliadenila, sendo chamados de pri-miRNA. Estes são processados dentro do núcleo em um "complexo de microprocessador" contendo ribonuclease III-RNA específicas conhecidas como Drosha e, seu parceiro de ligação Pasha. Após a formação do complexo, ocorrem, por ação enzimática, cortes na estrutura inicial do pri-miRNA e, conseqüentemente, a formação dos pré-microRNAs, os quais assumem conformação estrutural em gancho, chamada de *hairpin*. Em seguida, através da exportina-5 ocorre a translocação nuclear do pré-miRNA para o citoplasma, onde é incorporado ao complexo por uma endoribonuclease (*Dicer*), resultando em micro-RNA maduro, com cerca de 20 a 22 nucleótidos (KIM; HAN; SIOMI, 2009; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010). O miRNA maduro resultante se dissocia e é novamente incorporado a um novo complexo RISC (complexo de indução do silenciamento de RNA). Uma vez no complexo RISC, uma fita única do miRNA maduro é selecionada

e a outra é degradada. A vertente madura fica em condições de modular a expressão gênica, mediando o silenciamento do gene através de inibição de tradução (emparelhamento parcial de bases 3'-UTR do gene) ou promovendo a degradação dos RNA mensageiros (RNAm) alvo. Os miRNAs podem, também, direcionar a clivagem de RNA mensageiros, com os quais têm complementaridade, ou fazer repressão da tradução, ficando ligados ao RNAm na região 3' não traduzida, impedindo sua tradução pelo ribossomo (BARTEL, 2004). Portanto, a princípio, os miRNA atuam como reguladores negativos dos genes codificantes de proteínas, ocorrendo diminuição da produção proteica por dois mecanismos possíveis: aumento da degradação do RNAm ou bloqueio da tradução do RNAm em proteína (BARTEL, 2004).

Os microRNAs ativos resultantes realizam *down-regulation* da expressão gênica pela repressão de tradução e/ou pela clivagem do RNA mensageiro (RNAm), mediadas pelo RISC, de forma muito semelhante ao silenciamento gênico feito pelos RNA de interferência (siRNA). No entanto, apesar dos siRNAs também levarem ao silenciamento da expressão gênica, via RISC, há algumas diferenças cruciais entre os microRNAs e os siRNA. Por exemplo, os siRNAs de ocorrência natural não têm sido documentados em mamíferos, em contraste com o amplo predomínio dos microRNAs endógenos (BARTEL, 2004; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010). Os siRNAs são altamente complementares às suas transcrições do gene alvo, enquanto que os microRNAs não o são. Assim, é possível que alguns microRNAs sejam alvo para centenas de mRNA de baixa afinidade (*one-to-many*) e, inversamente, vários microRNAs podem visar um único mRNA (*many-to-one*). Assim, a precisão *one-to-one* dos siRNAs, conferindo grande especificidade para os seus objetivos, pode ser contrastada com efeitos de longo alcance de um único miRNA na expressão de muitos genes (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010).

Esse mecanismo natural intrigante parece ser muito antigo na evolução, tendo sido detectado em todos os sistemas vegetais e animais em várias formas, e até mesmo em vírus. As sequências envolvidas parecem, de fato, ser altamente conservadas entre indivíduos e espécies, mas suas populações e composições dentro das células apresentam uma correlação muito forte com o tipo celular ou tipos específicos de tecidos, fases de desenvolvimento e/ou tipos de doenças (KROL;

LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010). Assim, o perfil dessas populações de microRNAs como biomarcadores deve ser uma ferramenta muito poderosa de diagnóstico e prognóstico de doenças. A tecnologia de detecção e análise de microRNAs dentro das células já avançaram rapidamente para acomodar tal possibilidade, com êxitos notáveis na área da caracterização de câncer metastático. Desde a descoberta de que microRNAs seriam uma classe de RNA não codificantes, diversos estudos têm demonstrado suas funções biológicas na diferenciação e proliferação celular, bem como nas vias de sinalização celular, apoptose e metabolismo (BARTEL, 2004; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010).

Em estudos envolvendo linhagens de câncer de mama, colon, pulmão, próstata, tireoide e doenças malignas hematológicas, foi observada a presença de alterações na expressão de diferentes microRNAs (MIRNEZAMI *et al.*, 2009). Esses achados ajudam a respaldar o papel dos miRNA na tumorigênese, onde poderiam funcionar regulando a expressão de oncogenes e genes de supressão tumoral.

Os primeiros trabalhos que demonstraram a associação entre câncer e a presença de alterações na regulação e/ou expressão de micro-RNAs foram com portadores de leucemia linfóide crônica, em que *miR-15a* e *miR-16-1* encontravam-se deletados ou hipoexpressos em 2/3 dos indivíduos (CALIN *et al.*, 2002). Assim, esses microRNAs apresentariam atividade proapoptótica, sendo aceitos como supressores tumorais. Os miR-16-1 e miR-15 atuam inibindo em nível pós-transcricional a expressão do *bcl-2*, o que resulta em apoptose de células leucêmicas (CIMMINO *et al.*, 2005). A deleção de miR-15a e miR-16-1 foi associada com a presença de tumores de próstata mais avançados (BONCI *et al.*, 2008). Evidências vêm demonstrando que não apenas os microRNAs estão diferentemente expressos entre tumores e os respectivos tecidos normais, como também o grau de expressão está associado à fatores prognósticos no câncer humano (AQEILAN; CALIN; CROCE, 2010).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado a importância de diferentes microRNAs na tumorigênese hipofisária, estando os principais sumarizados no quadro abaixo.

Quadro 1- Importância dos microRnas na tumorigênese hipofisária

MicroRna	Tipo tumoral	Importância biológica
Hipoexpressão dos miR-5a e miR-16-1 (Bottoni <i>et al.</i> , 2005).	Produtores de GH e PRL	Inversamente correlacionada ao diâmetro e crescimento tumoral.
Hiperexpressão miR-212, miR-26a, miR-150, miR-152, miR-191, e miR-192 Hiperexpressão semelhantes dos miR-23a, miR-23b, e miR-24-2 em GH e PRL (Bottoni <i>et al.</i> , 2007).	Produtores de GH, ACTH e PRL	Relacionados à proliferação celular. Diferenciar os tipos histológicos.
Hipoexpressão miR-145, miR-15a, miR-let 7a, miR-16, miR -141 e miR-143 (Amaral <i>et al.</i> , 2009).	Produtores de ACTH	Hipoexpressão miR -141, maior chance de cura pós-cirurgia, regulação de genes envolvidos no crescimento e invasão local do tumor.
Hiperexpressão miR-128 ^a , miR-155, miR-516 ^a -3p (Butz <i>et al.</i> , 2010).	Não funcionantes	Alvos da Wee1 proteína nuclear reguladora do ciclo celular. Função de gene supressor tumoral.
Hiperexpressão miR-107 (Trivellini <i>et al.</i> 2012).	Produtores de GH e não funcionantes.	Supressor tumoral, sendo um dos seus alvos o <i>AIP</i> .
Hiperexpressão miR-542-3p, miR-629, miR-450b-5p, miR-424, miR-503. Hipoexpressão miR-629 e miR- 214 (Butz <i>et al.</i> , 2011).	Não funcionantes	miR-629 e miR- 214 alvos da proteína antiapoptótica bcl-2, favorecendo proliferação celular.

Expressão diminuída dos miR-15a e miR-16-1 foi descrita em tumores hipofisários produtores de GH e PRL, quando comparada ao tecido hipofisário normal, e sua expressão foi inversamente correlacionada ao diâmetro e crescimento tumoral, estando diretamente correlacionado com a secreção da p53 (BOTTONI *et al.*, 2005). Os mesmos autores, utilizando *microarray*, identificaram 30 microRNAs diferencialmente expressos entre tumores hipofisários e tecido normal, sendo os mais representativos os miR-212, miR-26a, miR-150, miR-152, miR-191, e miR-192, que se encontravam hiperexpressos nos tumores hipofisários; esses microRNAs

estão relacionados à proliferação celular (BOTTONI *et al.*, 2007). Adicionalmente, análise da expressão dos microRNAs foi capaz de diferenciar os diferentes tipos histológicos, sendo uma possível ferramenta para a classificação funcional dos tumores ou, a depender da linhagem tumoral, alguns microRNAs exerceriam mais função que outros na maquinaria celular. Assim, os tumores secretores de GH e PRL que possuem origem celular comum apresentaram hiperexpressão semelhantes dos miR-23a, miR-23b, e miR-24-2 (BOTTONI *et al.*, 2007). Particularmente, os miR-23a e miR-23b estavam diferencialmente hiperexpressos em tumores produtores de GH e PRL quando comparados aos produtores de ACTH e os CNF (BOTTONI *et al.*, 2007).

Em corticotrofinomas, menor expressão de miR-145, miR-15a, miR-16 e o miR-143 e miR-141 foi observada em relação às amostras de tecidos hipofisários normais (AMARAL *et al.*, 2009). O subgrupo com menor expressão de miR-141 apresentou maior chance de cura pós-cirurgia, sugerindo que o miR-141 atuaria na regulação de genes envolvidos no crescimento e invasão local do tumor, fatores que influenciam a possibilidade de cura pós-cirurgia.

Butz e colaboradores encontraram hiperexpressão de 5 microRNAs em tumores hipofisários CNF (miR-542-3p, miR-629, miR-450b-5p, miR-424, miR-503 e miR-214) e hipoexpressão dos microRNAs miR-629 e miR-214, alvos da proteína antiapoptótica bcl-2, favorecendo proliferação celular (BUTZ *et al.*, 2011). Em adenomas hipofisários produtores de GH e não funcionantes esporádicos foi observada hiperexpressão de miR-107, que atua como supressor tumoral; salienta-se que o miR-107 tem como um dos seus alvos o *AIP* (TRIVELLIN *et al.*, 2012).

Mutações no gene *GNAS* permanecem como o principal mecanismo envolvido na tumorigênese somatotrófica esporádica; ainda, há um entendimento crescente do papel dos microRNAs em tumorigênese, atuando em diversos RNAs mensageiros, influenciando múltiplas vias de sinalização e apresentando um enorme potencial na regulação gênica. Finalmente, o gene *BTG2* regula o ciclo celular inibindo a expressão da ciclina D1, resultando no impedimento da proliferação celular, e a degradação da ciclina A e B1, resultando na diminuição da mitose e aumento da morte celular. Como um gene supressor tumoral, seu papel na gênese

dos somatotropinomas ainda não está esclarecido. No presente estudo, correlacionamos a expressão gênica de diferentes microRNAs com a expressão dos genes *GNAS* e *BTG2* nas amostras de tumores somatotróficos com e sem a mutação *GNAS*. Adicionalmente, correlacionamos a expressão desses genes e de microRNAs com parâmetros clínicos e bioquímicos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar em somatotrofinomas esporádicos a presença da mutação no gene *GNAS*, a expressão de *GNAS* e *BTG2* e de um painel de microRNAs e se os parâmetros moleculares se associam com parâmetros clínicos da doença.

2.2 Objetivos específicos

1 Avaliar a presença de mutação dos genes *GNAS* e *AIP* em somatotrofinomas esporádicos.

2 Comparar os parâmetros bioquímicos e clínicos como GH, PRL e IGF-1 ao diagnóstico, idade, tamanho tumoral e grau de invasibilidade e controle da doença entre os portadores de somatotrofinomas mutados e não mutados.

3 Avaliar a expressão dos genes *GNAS* e *BTG2* em somatotrofinomas mutados e não mutados.

4 Avaliar a expressão de um painel de microRNAs em somatotrofinomas mutados e não mutados.

5 Avaliar a associação entre o grau de expressão dos genes *GNAS*, *BTG2* e painel de microRNAs com tamanho tumoral e grau de invasibilidade (Hardy), controle da doença com cirurgia e com o uso das terapêuticas adjuvantes .

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

A coleta das amostras e o projeto de pesquisa foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética do HCFMRP e pelo CONEP (Proc. nº 5283/2007). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado pelos pacientes com acromegalia e familiares dos indivíduos doadores de tecido hipofisário normal.

3.2 Sujeitos

Os 26 pacientes do estudo apresentavam critérios diagnósticos de acromegalia baseados na não supressão do GH após sobrecarga oral de glicose e níveis de IGF-1 acima do limite superior para sexo e idade em indivíduos normais (ULNR%). O GH plasmático foi determinado por ensaio imunofluorométrico em fase sólida (IFMA) em duplicata, calibrado contra o padrão de preparação segundo referência internacional da OMS 98/574 para 22 kDaGHrh, adquirida pelo Instituto Nacional de Padrões Biológicos e Controle (NIBSC, Hertfordshire, Reino Unido). O limite de detecção para a GH foi de 0,095 µg/L, e os coeficientes de variação (CV) intra e interensaios de 5,5 e 11,7%, respectivamente. O IGF-1 foi determinado em duplicata por ensaio imuno-radiométrico (IRMA), após extração com ácido (Diagnostic System Laboratories Inc., Webster, TX, EUA). O limite de detecção para o IGF-I foi de 10 ng/L, e os CV intra e inter ensaio foram de 5 e 11,3%, respectivamente. Os dados clínicos dos pacientes portadores de acromegalia foram obtidos através da revisão de prontuários (impressos e eletrônicos) e protocolos de acompanhamento elaborados pelo Serviço. O tamanho tumoral e grau de invasibilidade foi classificado utilizando-se o escore de Hardy (I,II,III e IV) (IRONSIDE, 2003), baseando-se em dados do exame de imagem realizado por ocasião do diagnóstico [ressonância nuclear magnética (RNM) ou tomografia computadorizada (TC)] e nos registros dos achados cirúrgicos. Adotamos como critério de cura após o procedimento cirúrgico o encontro de GH randômico (basal) $\leq 2.5\mu\text{g/L}$ ou nadir de GH após oGTT $\leq 1\mu\text{g/L}$ e IGF-1 normal para idade e sexo

(GIUSTINA *et al.*, 2000). Como critério de controle sob terapêutica medicamentosa adotamos a normalização dos níveis de IGF-1 para idade e sexo.

3.3 Amostras de tecido

Foram obtidas 26 amostras de somatotrofinomas durante a realização de CTE dos pacientes com diagnóstico de acromegalia, seguidos no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

No momento da remoção do tecido tumoral, a amostra foi imediatamente acondicionada em tubo estéril de 15 mL, mergulhada em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenada em freezer -70°C. Como controles, foram utilizadas sete amostras de tecido hipofisário normal, obtidas após necropsia de indivíduos adultos jovens com morte acidental, que não apresentavam antecedentes de doença endócrina. No dia do procedimento, o fragmento tumoral foi microdissecado utilizando-se microscópio por patologista experiente, para separação do tecido tumoral de qualquer tecido normal.

Amostras de fragmentos tumorais foram também enviadas para a análise histopatológica com coloração pela hematoxilina-eosina e complementada com estudo imunohistoquímico para todos os hormônios adeno-hipofisários e subunidade alfa dos hormônios glicoproteicos pela técnica da peroxidase-antiperoxidase confirmando o diagnóstico clínico-laboratorial.

3.4 Extração de DNA e RNA

Extração de DNA e RNAs dos tumores e das hipófises normais foram realizadas pelo método do TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo protocolo do fabricante, sendo realizado em três etapas: precipitação, lavagem e ressuspensão do DNA e RNA.

No tubo contendo o fragmento tumoral microdissecado ou amostra de tecido normal, foram adicionados 250µL de PBS 1x autoclavado. O tecido tumoral foi homogenizado com uso do politron utilizando-se 750 µL de TRIzol® (Invitrogen Life Technologies) para cada 100 mg de tecido, sem haver aumento de temperatura do tubo com a amostra. Foi realizada a limpeza da broca a cada nova amostra com: H₂O da torneira (5x), etanol a 70% (1x), etanol absoluto(1x), H₂O milli-Q (1x) e RNAase Away.

Após a homogeneização das amostras foram adicionados 200µL de clorofórmio a 100% e 10µL de glicogênio (20mg/mL) para cada 1000µL de TRIzol®, homogeneizando as amostras por 15 segundos e deixando em temperatura ambiente por 10 minutos. Com o objetivo de separar a solução em fases aquosas e orgânicas o material foi submetido à centrifugação a 12.500 rpm por 15 minutos a 4°C.

Após a centrifugação as amostras foram separadas em três fases: fase orgânica inferior (vermelha, com fenol, clorofórmio e proteína); fase intermediária (branca, com DNA); e a fase aquosa superior (transparente, contendo o RNA). A fase aquosa foi transferida para *tubo* previamente preparado e identificado para RNA. A fase orgânica foi estocada em freezer a -80°C para posterior extração de DNA.

Para extração de RNA, 500µL de álcool isopropílico foram adicionados à fase aquosa transferida para o *tubo*, sendo homogeneizado e deixado à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foi realizada centrifugação a 12.500rpm por 10 minutos a 4°C para precipitar o RNA.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e desprezado. Para retirada de impurezas do RNA 1mL de etanol 75% foi adicionado e, subsequentemente, realizada homogeneização das amostras em *vortex* e centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida após a centrifugação, os sobrenadantes foram removidos e desprezados, deixando o *pellet* de RNA secando por 5-10 minutos à temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspensão em 15-30µL de água livre de RNase, tratada previamente com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma, St. Louis, MO, USA).

Para extração de DNA, adicionou-se à fase orgânica 0,3 ml de etanol a 100% para cada 1,00mL de Trizol[®], em temperatura ambiente; as amostras foram homogeneizadas por inversão dos tubos e incubadas em temperatura ambiente durante 2-3 minutos; após, centrifugação das amostras foi realizada a 2000rpm durante 5 minutos a 4°C (de 2 a 8°C). Após a centrifugação, houve formação do *pellet* de DNA e retirou-se todo o sobrenadante, que foi transferido para um novo tubo para posterior extração de proteína. Em seguida, foi feita a lavagem do *pellet* de DNA com 1mL de uma solução de citrato de sódio diluído em etanol 10% e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo homogeneizado a cada 5 minutos por centrifugação 2000 rpm, durante 5 minutos a temperatura de 4°C, sendo descartado o sobrenadante. Após as duas lavagens os *pellets* de DNA das amostras foram ressuspensos em etanol a 75%-1,5ml (1 ml de etanol a 75% para 1ml de Trizol[®]), estocados por 20 minutos a temperatura ambiente com períodos de agitação e centrifugados a 6.700 rpm por 5 minutos a 4°C. O etanol foi descartado, sendo o *pellet* seco a temperatura ambiente por 10 min. O DNA foi ressuspenso, em 10µl de NaOH 8mM.

Uma lavagem adicional foi requerida quando houve formação de um *pellet* muito grande, contendo acima de 200µg de DNA. Quando houve formação de *pellet* insolúvel, o material insolúvel foi removido por centrifugação a 12000g por 10 minutos e o sobrenadante contendo o DNA transferido para um novo tubo previamente identificado.

3.5 Quantificação e validação do DNA e RNA extraído

Após a extração de DNA e RNA, alíquotas (1µl) do RNA e DNA na concentração de 1:500 (RNA/água DEPC) foram quantificadas por espectrofotômetro (BioPhotometer, Tubo) em comprimento de onda de 260 nm, considerando que 1 unidade de DO₂₆₀ equivale a 40 µg/mL de RNA e 50µg/mL de DNA. O cálculo da razão entre a DO em 260 e 280 nm serviu para estimar o grau de pureza do DNA e RNA total. A integridade das amostras de RNA foi verificada pela visualização das bandas de RNA ribossômico 28S e 18S em gel de agarose 1,2% corado com solução de brometo de etídeo 0,5%.

3.6 Pesquisa da mutação no gene *GNAS* e no gene *AIP*

Para a análise das alterações presentes nos códons (201 e 227) onde já foram descritas mutações somáticas pontuais em heterozigose no gene *GNAS* (ENSG00000087460/NG_016194.1) foi desenhado um par de *primer* que flanqueava esta região: *GNASF* 5'-CTCTTTCCAACTACTCCAGACCTTT-3' e *GNASR* 5'-AAAGAGAGCAAAGCCAAGAGCGTGA-3' com o auxílio do site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Para o estudo do gene *AIP* (ENSG00000110711/NG_008969.1) foram utilizados os *primers* apresentados na tabela 01, previamente descritos (VIERIMAA *et al.*, 2006).

Tabela 1- *Primers* específicos para a região codificadora do gene *AIP*

Local	Sequência (5' → 3')	Fragmento	T _m (°C)
Exon 1	CCGAGACATTCCTAGGCTCC**	397 pb	55
Exon 1	CTCTCGCCTAAGGCCTCC**		
Exon 2	AGCGTGGGAGGATGAAGCCA**	426pb	68
Exon 2	GTCTAGCAGAGGGTGGAGGG*		
Exon 3	GATGGTGGTGGGGAAGG**	359pb	55
Exon 3	ACCCCTGGGTGGACAGG**		
Exon 4 -5	ATGTGGGTCAGGTCTGCTG**	587pb	64
Exon 4 -5	AAAGGCTAGGTCTTGACCCC**		
Exon 6	AGGAGACATGAGGGCAGGC**	469pb	65
Exon 6	AACAGCCACCCAAGTACCAG**		

**primer* desenhado com o auxílio do site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; ** Outi Vierimaa *et al* 2006.

3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada utilizando-se a enzima *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*), seguindo as concentrações dos reagentes apresentadas na tabela 2.

Tabela 2- Concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR

Reação padrão de PCR	[] Final
DNA genômico	1µg
Tampão <i>Invitrogen</i> (10X)	1X
MgCl ₂ <i>Invitrogen</i> (50mM)	1,5mM
dNTP <i>Invitrogen</i> (2mM)	0,2mM
<i>Primer direto</i> (20 pmol/uL)	0,6pmol/uL
<i>Primer reverso</i> (20 pmol/uL)	0,6 pmol/uL
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerase <i>Invitrogen</i> (5 U/µL)	1U
H ₂ O qsp	30 MI

Após a preparação da reação, os tubos foram colocados no termociclador (*Applied Biosystems*) e submetidos a uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, T_m foi 65.5°C para o *GNAS* e para o *AIP* a T_m variou de acordo com os pares de *primers* utilizados (Tabela1) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando com uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a amplificação do fragmento desejado (Figura 2).

3.8 Sequenciamento automático

Após a verificação da qualidade dos produtos de PCR em gel de agarose foi realizada a purificação das amostras utilizando a enzima ExoSAP-IT. A reação de sequenciamento foi feita com os *primers* da tabela 1 e com o *kit Big Dye Terminator v3.1*. Foram realizadas em *tubo* de 0,2mL adicionando-se 13,5µL de água, 3,0µL de tampão para sequenciamento 5x, 2,0µL de *Big Dye*, 0,5µL do *primer sense* ou *antisense*, e 1,0µL do produto de PCR, com volume final de 20,0µL, sendo as amostras submetidas ao termociclador à 95°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 4 minutos. Para a purificação todo o volume da reação de sequenciamento (20µL) foi transferido para *tubo* de 1,5mL e em seguida adicionaram-se 80µL de isopropanol 65%, sendo homogeneizado e deixado em repouso ao abrigo da luz por 20 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas por 25 minutos a 13.500rpm em temperatura ambiente. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, com inversão do tubo sobre papel absorvente limpo durante 1-2 minutos até secar. Após foram adicionados 250µL de etanol a 60%, homogeneizado novamente e centrifugado por 5 minutos a 13.500 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, mais uma vez, deixando os tubos invertidos sobre papel por 1-2 minutos. Para garantir a perfeita secagem dos tubos os mesmos foram aquecidos a 90°C por 2 minutos. Para a resuspensão das amostras adicionaram-se 20µL de formamida *Hi-Di* (*Applied Biosystems-Foster City, CA, USA*) em cada *tubo*, agitando-as em velocidade máxima até homogeneização completa. Em seguida, todo o volume foi transferido para placas de 96 poços. Todas as amostras foram então submetidas à desnaturação na temperatura de 95°C por 3 minutos, em termociclador. Após a desnaturação, a placa foi acoplada ao sequenciador automático *3130 Genetic Analyzer Applied Biosystems* (*Foster City, CA, USA*). As análises dos sequenciamentos foram realizadas com o auxílio dos softwares *Chromas lite®v2.01* e *Codon Code Aligner®*.

3.9 Estudo da expressão de genes e microRNAs

3.9.1 Síntese de cDNA

Para o estudo da expressão dos genes *GNAS* e *BTG2*, assim como para o estudo da expressão dos microRNAs realizou-se a síntese de cDNA utilizando o RNA das amostras de tecido de hipófise normais e tecido hipofisário tumoral previamente extraídos.

A transcrição reversa para obtenção do cDNA foi realizada pela enzima MultiScribe™ - (Applied Biosystems Foster City, CA, USA), e kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems Foster City, CA, USA). O protocolo foi realizado segundo as instruções do fabricante. As reações foram incubadas a 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. Os produtos finais foram diluídos 1:5 e 1:4 para genes e miRNA respectivamente.

3.9.2 PCR em tempo real (qPCR)

A expressão do gene *GNAS* (Part n°.NG_016194.1) e do gene *BTG2* (Part n°. [Hs00198887_m1](#)) foi avaliada por qPCR. *BTG2* foi selecionado de uma biblioteca de SAGE de adenomas produtores de GH (<http://qdm.fmrp.usp.br>). Ainda, o *BTG2* pode ser considerado gene alvo de alguns dos microRNAs estudados. Utilizamos como controles endógenos os genes *PGK1* (ID: Hs99999906_m1), *TBP1* (ID:4310891E) e o *GUSB* (ID:4326320E)

Os microRNAs miR-23a (Part n°4373074), miR-23b (Part n°4373073) e miR24-2 (Part n°4395552) foram selecionados por terem sido estudados previamente em adenomas hipofisários (Bottoni e cols, 2007). Os microRNAs let-7a (Part n°4373169); miR-15a (Part n°4373123); miR-16 (Part n°4373121); miR-21 (Part n°4373090); miR-141 (Part n°4373137); miR-143 (Part n°4373134); miR-145 (Part n°4373133); miR-150 (Part n°4373127) também haviam sido previamente estudados por nosso grupo em corticotrofinomas (AMARAL *et al.*, 2009). Ainda, o miR-21 foi também selecionado por instrumentos de bioinformática (miRNAMap: www.mirmap.mbc.nctu.edu.tw) por regular o gene *BTG2*. Utilizamos como controles

endógenos para os microRNAs os RNU38B (ID: 001004) e RNU49 (ID: 001030). Os ensaios de RT-PCR para a validação dos genes, dos microRNAs e dos controles endógenos, utilizados na normalização dos resultados, foram obtidos pelo site <http://www.appliedbiosystems.com> e sintetizados pela *Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)*.

A expressão dos genes e dos microRNAs foi determinada por PCR em Tempo Real (*Real Time PCR-7500 Applied Biosystems Singapore*). As reações foram realizadas em duplicata em um volume final de 10 μ L, sendo 4,5 μ L de cDNA, 0,5 μ L de TaqMan™ específico para cada gene ou microRNA e 5 μ L Master mix. Foram utilizados placas de 96 poços com os kits TaqMan™ específicos para cada gene. As reações foram submetidas a uma desnaturação inicial de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

A fluorescência foi detectada a cada ciclo, obtendo-se um gráfico da variação da fluorescência (Rn) pelo número de ciclos (*Cycle Number*), ao final dos ciclos de amplificação (Figura1). As curvas de amplificação foram visualizadas pelo *software ABI Prism® 7500*, a linha de base (*Baseline*) estabelecida pelo programa e o limiar de detecção (*Threshold*) foi ajustado na fase exponencial do gráfico para 0,05. O *Threshold* indicou o ponto de referência onde todas as amostras possuíam a mesma intensidade fluorescente, teoricamente correspondente à mesma quantidade de produto de PCR. A identificação do *Threshold* determinou o estabelecimento do ciclo limiar (*cycle threshold*) (Ct) que foi o ciclo em que cada curva de amplificação atravessou o limiar, servindo como base para comparação entre amostras.

Após o estabelecimento do Ct de cada amostra, os dados foram exportados em tabelas compatíveis com o *software Excel*, contendo valores médios dos Cts de cada amostra e respectivos desvios padrão.

A normalização dos resultados de cada amostra foi realizada pela subtração do Ct para o gene ou miRNA (alvo) pelo Ct do controle endógeno. A normalização e calibração dos resultados foram realizadas pelo cálculo do Δ Ct e $\Delta\Delta$ Ct, respectivamente.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{amostra (alvo)}} - Ct_{\text{amostra (controle endógeno)}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{(amostra)}} - \Delta Ct_{\text{(calibrador)}}$$

A expressão relativa de determinado gene ou miRNA nas amostras foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A mediana do valor obtido de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras de tecido tumoral hipofisário foi comparado com o valor da mediana dos valores obtidos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras de tecido hipofisário normal, obtendo o valor que revela o número de vezes (*fold*) que este miRNA está hiper ou hipo expresso no tecido hipofisário tumoral em comparação ao tecido hipofisário normal.

3.10 Análise estatística

A expressão relativa de cada gene estudado foi expressa em média e desvio padrão da média, mediana e variação da média. Para as variáveis com distribuição normal (D'Agostino'stest) como idade, tamanho tumoral e IGF-1 (ULNR%) ao diagnóstico foi utilizado o teste t Student. A expressão diferencial dos genes estudados entre o tecido hipofisário normal e tumoral foi comparada utilizando-se o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*.

Após a pesquisa das mutações no gene *GNAS* o grupo foi dividido em mutados (oncogene *gsp* positivo) e não mutados (oncogene *gsp* negativo). O teste não paramétrico de *Mann-Whitney* foi também utilizado para avaliar as diferenças entre dados clínicos dos pacientes, como tamanho tumoral (maior diâmetro da lesão durante a realização de RNM ou TC), GH e PRL ao diagnóstico. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar a expressão de cada gene entre os três grupos (tumor oncogene positivo (*gsp+*), tumor oncogene negativo (*gsp-*) e o tecido hipofisário normal), com pós-teste de Dunn.

O teste de correlação de *Spearman* foi utilizado para comparar a expressão relativa dos genes *GNAS* e *BTG2* e de cada gene com a expressão de cada microRNA, em valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

O teste exato de *Fisher* foi utilizado para análise de associação entre a expressão de cada gene e cada microRNA com tamanho e agressividade tumoral (Hardy), controle da doença após-cirurgia e controle da doença com as terapêuticas adjuvantes instituídas. A expressão de cada gene e microRNAs amostras tumorais foi normalizada dividindo as amostras em dois subgrupos baseados na mediana dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras de hipófise normais.

A amostra tumoral com presença de mutação no *AIP* foi excluída das análises envolvendo a expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos genes e microRNAs, uma vez que o trabalho se propôs a avaliar a expressão relativa dos tumores com e sem o oncogene *gsp*. As análises foram realizadas pelo programa *GraphPad Prism 6.02* (GraphPad Software, San Diego, CA) e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Sujeitos

A tabela 3 apresenta as características clínicas dos pacientes com acromegalia que compuseram a casuística do presente estudo. Foram analisados os dados de 26 pacientes (15 mulheres e 11 homens; com média de idade $41,0 \pm 9,7$ anos ao diagnóstico; variando entre 26-57 anos. Todos os pacientes apresentavam elevação nas concentrações plasmáticas de GH basal ($47,7 \pm 82,8$ $\mu\text{g/L}$; IFMA; variando entre 1,5-392,0 $\mu\text{g/L}$) não supressíveis após o TTGO. Apresentavam, ainda, concentrações de IGF-1 ($516,4 \pm 236,3$ ULNR%; variando entre 119,0-922,0 ng/mL) acima do limite superior do normal para idade e sexo. As concentrações plasmáticas de prolactina ao diagnóstico foram de $29,0 \pm 31,3$ ng/mL; variando entre 2,8-121,0 ng/mL.

À RNM ou CT de hipófise 96% (24/25) dos pacientes apresentavam macroadenoma e apenas 4% (01/25) apresentavam microadenoma. Quanto ao grau de invasibilidade, 52% (13/25) dos tumores foram classificados em escore de Hardy I e II e 48% (12/25) classificados em escore de Hardy III e IV.

O tempo de seguimento médio em anos dos pacientes em acompanhamento regular no serviço foi de $5,5 \pm 4,6$ anos; variando entre 1-19 anos. Havendo perda de seguimento em dois pacientes.

Quanto à terapêutica instituída para controle da acromegalia, todos os indivíduos foram submetidos à CTE, 80,8% (21/26) realizaram apenas um procedimento cirúrgico e 19,2% (5/26) realizaram duas cirurgias. O controle da doença com o procedimento cirúrgico foi observado em 42% (10/24) dos pacientes.

O uso das terapêuticas adjuvantes à CTE com análogo da somatostatina e/ou agonista dopaminérgico e/ou radioterapia externa visando o controle da doença ao longo do seguimento clínico foi utilizada em 58% (14/24) dos pacientes. Dos pacientes que fizeram uso de drogas, o controle da doença (IGF-1 normal para idade e sexo) foi observado em 64% (09/14), vale ressaltar que 03 utilizaram radioterapia externa, o tempo de seguimento foi de $6,0 \pm 3,9$ (variando entre 2-13 anos) e não houve uso isolado do agonista dopaminérgico visando controle da doença.

Tabela 3- Dados clínicos, genéticos e laboratoriais dos pacientes com tumor hipofisário secretor de GH.

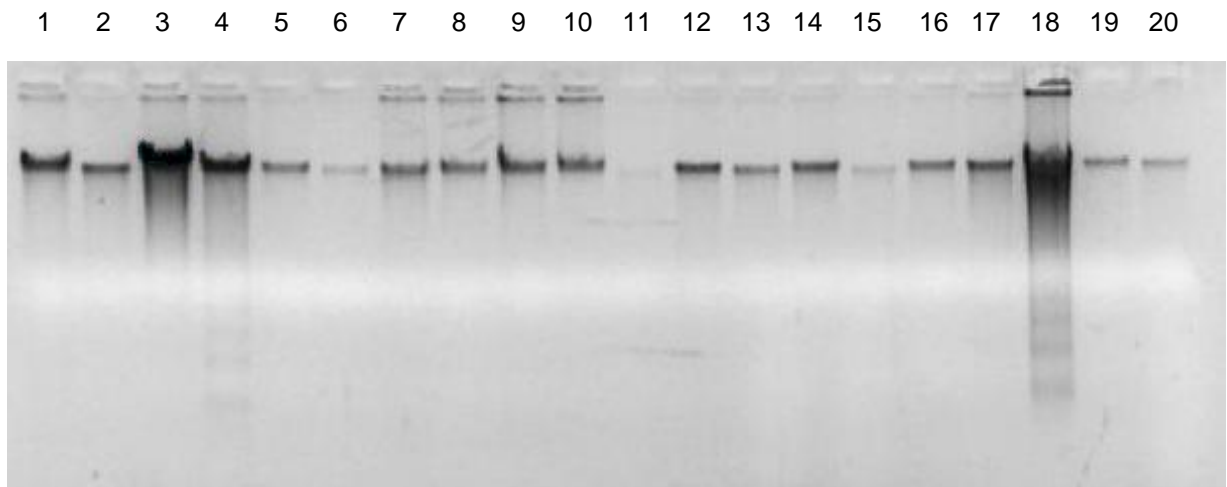
Paciente	Idade* (anos)	Sexo	Tamanho tumoral (RM ou CT)	gsp	IHQ	Controle Hardy	PRL* ng/mL	GH* µg/L	GH** µg/L	IGF-1 ng/mL/%ULNR
GH1	28	F	2,4 x 1,5 cm	+	GH+, PRL+	S/CD IV	13,7	14,4	10,4	2304/459
GH2	29	M	3,3 x 2,0 cm	-	GH+, PRL+	N IV	47,7	84,0	52,0	ND
GH3	44	F	1,0 x 0,8 cm	-	GH+, PRL+, LH+	S/CC II	5,4	15,5	13,5	622/205
GH4	42	M	1,5 x 1,3 cm	-	GH+, PRL+, LH+, FSH+, TSH+	S/CC II	36,0	19,0	22,0	2793/922
GH5	55	F	0,8 cm	+	GH+, PRL+	S/CC I	30,6	1,9	1,8	1778/686
GH6	34	M	1,2 x 1,0 cm	+	GH+, PRL+	S/CD II	11,4	6,7	5,4	590/119
GH7	50	F	1,2 x 1,0 cm	-	GH+	S/CC II	26,0	29,2	22,0	ND
GH8	53	F	1,1 x 0,8 cm	+	GH+	S/CD II	4,6	3,7	3,4	1790/693
GH9	29	F	1,9x 1,3 cm	+	GH+	S/CD II	21,0	11,7	7,1	2060/410
GH 10	37	F	3,0 x 2,5 cm	-	GH+	S/CD IV	41,0	185,0	67,0	1470/415
GH 11	36	M	3,0 cm	-	GH+, PRL+	S/CD III	8,5	70,0	32,4	ND
GH 12	51	F	1,1x 1,1 cm	+	GH+, PRL+, LH+	ND II	16,4	10,7	ND	636/246
GH 13	32	M	2,0 x 1,4 cm	-	GH+, TSH+, PRL+, LH+	S/CC II	13,0	39,7	10,8	266/103
GH 14^o	39	M	2,5 x 2,7 cm	-	GH+, PRL+	N IV	121,0	27,0	13,5	2710/548
GH 15	52	F	2,7 x 2,4 cm	-	GH+	S/CD IV	14,7	23,0	19,5	1204/467
GH 16	44	M	1,4 x 1,3 cm	-	GH+	S/CC II	2,8	4,9	19,2	2060/679
GH 17	43	F	2,0 x 1,7 cm	-	GH+	N II	23,0	2,8	1,6	2506/835
GH 18	26	M	5,8 cm	+	GH+, PRL+TSH+FSH+PRL+	ND IV	26,8	392,0	260	ND
GH 19	31	F	2,1 x 1,5 cm	-	GH+, TSH+, PRL+	N IV	17,7	119,0	117	ND
GH 20	42	M	Macro invasivo	+	GH+, PRL+, TSH+	S/CC IV	5,4	110	106	ND
GH 21	54	F	Macro invasivo	-	GH+	S/CD IV	11	20,9	7,1	ND
GH22	54	F	2,3 x 1,7 cm	-	GH+, PRL+, LH+	N IV	27,0	32,5	53,4	1114/442
GH23	35	F	1,2 x 0,8 cm	-	GH+ LH+	S/CC II	ND	2,9	0,6	1510/426
GH24	57	M	ND	-	ND	S/CC ND	6,3	1,5	1,2	1845/715
GH25	37	F	2,9 x 1,9 cm	-	GH+, PRL+	S/CC II	93,0	11,0	7,0	735/208
GH26	33	M	2,0 x 1,7cm	+	GH +	S/CD IV	101,7	10,8	8,5	ND

F:Feminino; M:Masculino; RM:Ressonância Magnética; CT:Tomografia computadorizada; IHQ:imuno-histoquímica; IGF:Fator do crescimento do Tipo Insulina 1 e %ULNR:% acima do limite do normal para idade e sexo; ND:não disponível. S/CD:controle com as terapêuticas disponíveis, S/CC:controle com cirurgia transesfenooidal; N:Não controle com as terapêuticas disponíveis; *: ao diagnóstico da acromegalia; **:Pós-oGTT. ^o amostra A/Pmutada.

4.2 Amostras de tecido

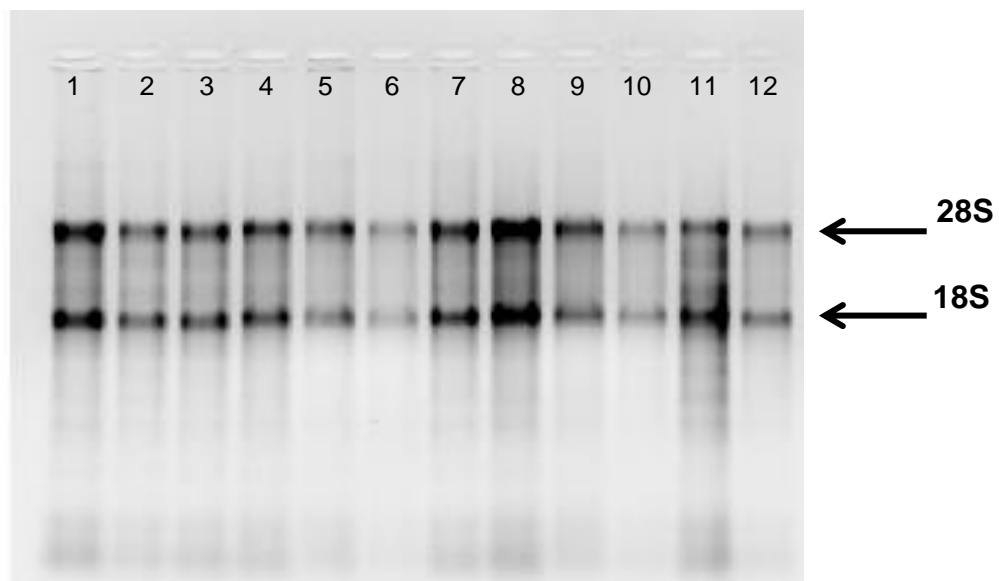
A relação DO em 260 e 280 nm foi considerada adequada, pois as amostras apresentaram razão entre 1,6-1,8. A viabilidade do DNA e do RNA nas amostras de somatotrofinomas também foram demonstradas pela visualização das bandas em gel de agarose (Figuras 1A e 1B).

Figura 1- Eletroforese em gel de agarose a 0,8%



(1) gel representativo de DNA genômico de 20 amostras tumorais.

Figura 1A- Eletroforese em gel de agarose a 1,2% demonstram a qualidade de RNA total das amostras.

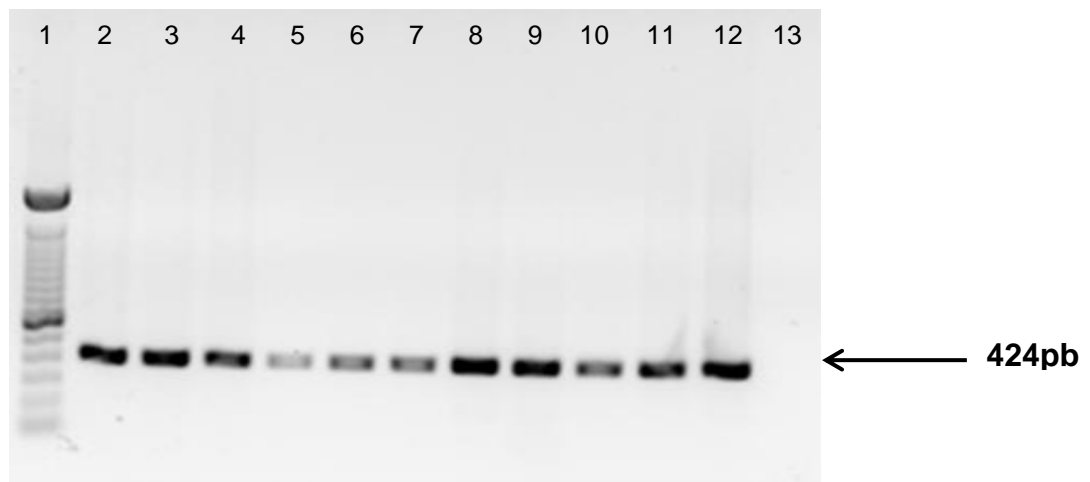


(1A) gel representativo de RNA de 12 amostras tumorais.

4.3 Pesquisa da mutação no gene GNAS e no gene AIP - Amplificação por PCR

A figura 2 apresenta a eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da PCR obtidos com os *primers* específicos para o gene *GNAS*. Observamos a amplificação de 424 pares de bases correspondentes ao fragmento dos exons 8 e 9 do gene *GNAS*.

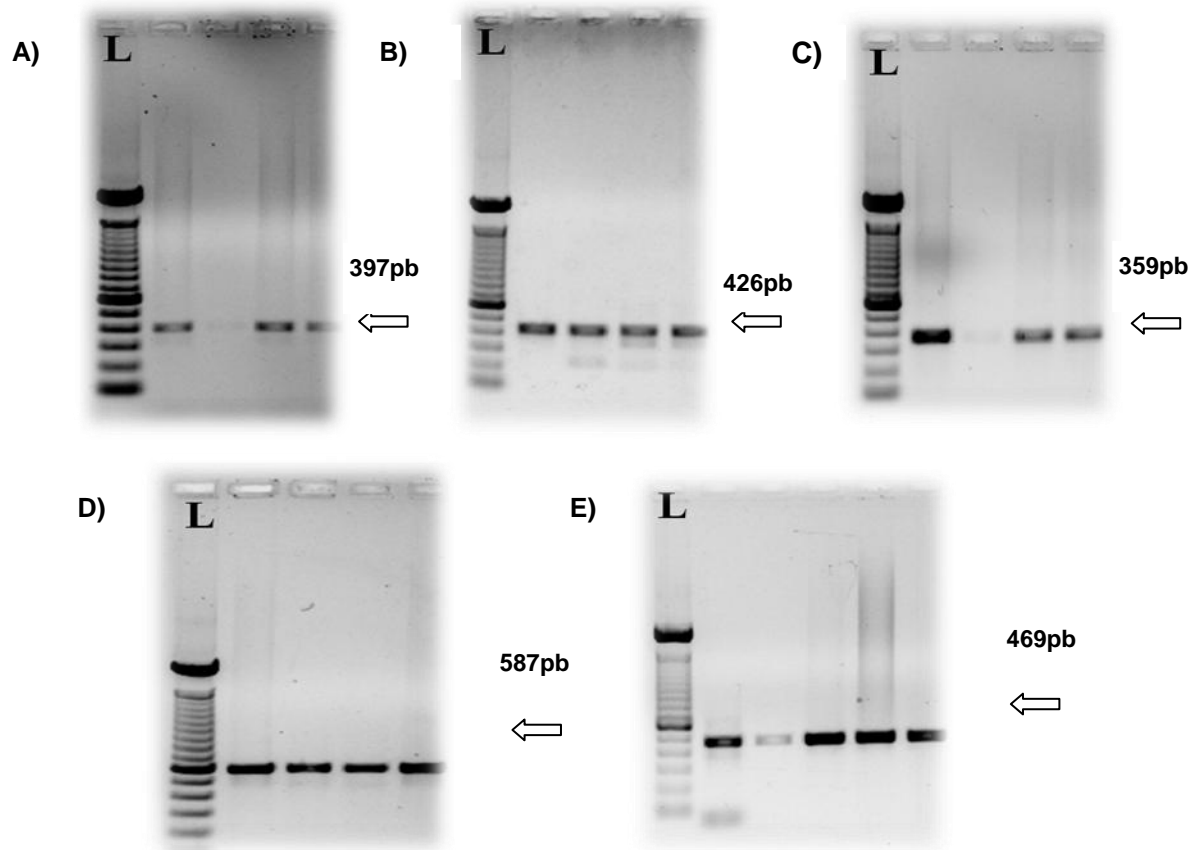
Figura 2- Eletroforese em gel de agarose 1%.



Produto da PCR com 424 pb correspondente ao fragmento dos exons 8 e 9 do gene *GNAS*. Linha 1: marcador de peso molecular (Ladder 100pb, Invitrogen); linha 13: controle negativo.

A figura 3 apresenta a eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da PCR obtidos com as diversas combinações de pares de *primers* (Tabela1) específicos para cada exon do gene *AIP*. Observamos a amplificação dos fragmentos referentes aos exons 1, 2, 3, 4-5 e 6 do gene *AIP*.

Figura 3- Eletroforese em gel de agarose 1,0% dos diferentes produtos de PCR do gene *AIP*. L Ladder 100 pb, Invitrogen.

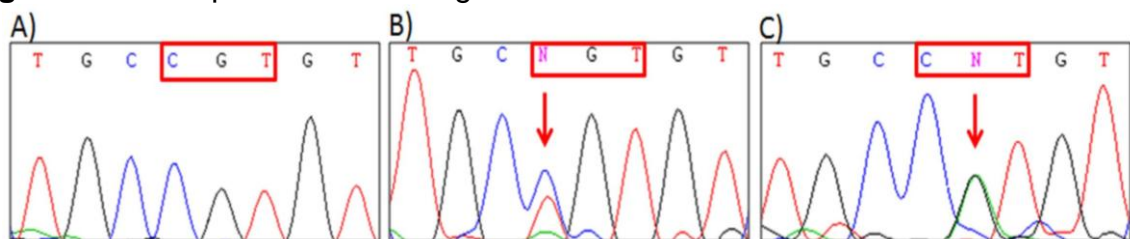


Em A) produto da PCR com 397pb referente ao exon 1; em B) produto de PCR com 426pb referente ao exon 2; em C) produto da PCR com 359pb referente ao exon 3; em D) produto da PCR com 587pb referente aos exons 4-5; em E) produto da PCR com 469pb referente ao exon 6.

4.4 Sequenciamento

Observamos a presença do oncogene *gsp* em nove das 26 amostras tumorais (35%). No grupo *gsp* positivo, cinco pacientes (55%) apresentaram a substituição da arginina pela cisteína no codon 201 (Arg201Cys) no exon 8 do gene *GNAS* levando à mutação p.R201C (Figura 5), dois pacientes (22%) apresentaram a substituição da arginina pela histidina no mesmo códon (Arg201His) levando a mutação p.R201H (Figura 4).

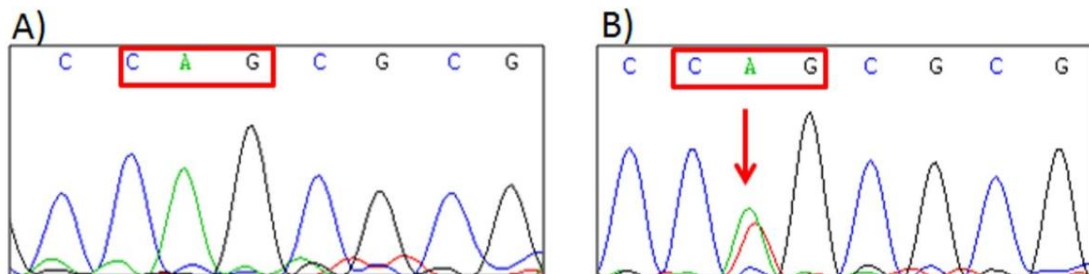
Figura 4- Sequenciamento do gene *GNAS*.



A) Amostra de tecido hipofisário normal; B) Substituição do nucleotídeo citosina na posição 604 do DNA (ENST00000354359) pelo nucleotídeo timina no éxon 8, (Arg201Cys- p.R201C); C) Substituição do nucleotídeo guanina na posição 605 do DNA (ENST00000354359) pelo nucleotídeo adenina no éxon 8, (Arg201His - p.R201H).

Em duas outras amostras (22%) observamos a troca da glicina pela leucina no codon 227 no exon 9 (Gln227Leu), levando à mutação p.Q227L (Figura 5). Todas as mutações observadas foram em heterozigose.

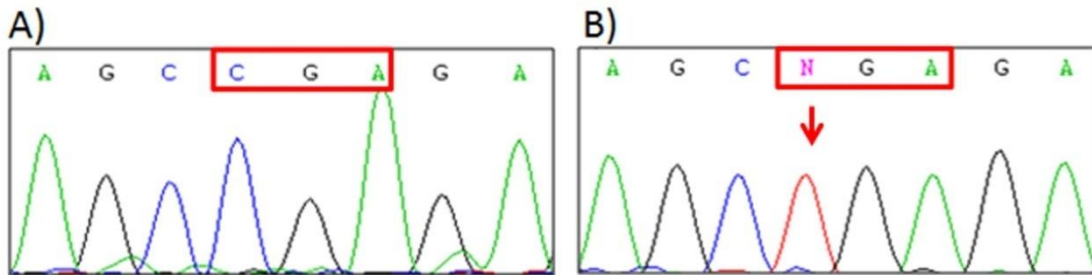
Figura 5- Sequenciamento do gene *GNAS*.



A) Amostra de tecido hipofisário normal; B) Substituição do nucleotídeo adenina na posição 683 do DNA (ENST00000354359) pelo nucleotídeo timina no éxon 9 (Gln227Leu - p.Q227L).

Quanto à presença de mutação no gene do *AIP*, nas 26 amostras estudadas encontramos a troca da arginina por um stop códon na posição 304 no exon 6 (Arg304X), levando à mutação (p.R304X), em apenas uma (3,8%) das amostras tumorais (Figura 6). Ressalta-se que essa amostra foi negativa para a presença de mutação no gene *GNAS*.

Figura 6- Sequenciamento do gene *AIP* (ENSG00000110711).



A) Amostra de tecido hipofisário normal; B) Substituição do nucleotídeo citosina na posição 7748 a partir do ATG inicial pelo nucleotídeo timina no éxon 6 (Arg304X - p.R304X).

A tabela 4 apresenta os dados clínicos dos pacientes com somatotrofinoma *gsp*-positivos e *gsp*-negativos. Observamos que a idade ao diagnóstico da acromegalia foi semelhante entre os grupos *gsp*-positivos (39,0±11 anos; variando entre 26-55 anos) e *gsp*-negativos (43,6±9.0 anos; variando entre 29-57 anos) ($p=0,21$).

Ao diagnóstico, não houve diferença significativa entre as médias das concentrações plasmáticas basais de GH (62,4 ± 128,1 vs 39,9 ± 48,3 µg/L; $p=0,39$), IGF-1(435,5±230,8 vs 556,9±238,3 %ULNR; $p=0,33$) e prolactina (25,7±29,8 vs 30,9 ± 32,8 ng/L; $p=0,69$) entre os somatotrofinoma *gsp*-positivos e *gsp*-negativos, respectivamente.

Utilizando o escore de Hardy, não observamos diferença na distribuição de tumores menos agressivos (Hardy I/II) ou mais agressivos (Hardy III/IV) entre os grupos de somatotrofinoma *gsp*-positivo e *gsp*-negativo ($p=1,00$). Como também não observamos diferença no tamanho tumoral quando consideramos o maior diâmetro da lesão durante a realização de RNM ou TC ao diagnóstico entre os

grupos de somatotrofinoma *gsp*-positivo ($2,04 \pm 1,62$ cm; variando entre 0,80-5,80cm) e *gsp*-negativo ($2,14 \pm 0,75$ variando entre 1,00-3,30cm) ($p=0,84$).

O tempo médio de seguimento foi semelhante entre os indivíduos portadores de somatotrofinoma *gsp*-positivo ($5,6 \pm 2,1$ anos, variando entre 3-9 anos) e *gsp*-negativo ($5,5 \pm 5,4$ anos, variando de 1-19 anos; $p=0,28$). Houve perda de seguimento em dois pacientes no grupo *gsp*-positivo, não sendo possível avaliar o grau de resposta à terapêutica adjuvante.

Não houve diferença no número de procedimentos cirúrgicos ($p=1,0$) entre os indivíduos portadores de somatotrofinoma *gsp*-positivo (77,8% realizaram uma cirurgia e 22,2% realizaram duas cirurgias) e indivíduos portadores de somatotrofinoma *gsp*-negativo (82,4% realizaram uma cirurgia e 17,6% realizaram duas cirurgias).

No grupo de somatotrofinoma *gsp*-positivo e *gsp*-negativo 71% e 53%, respectivamente, necessitaram utilizar terapêutica adjuvante à CTE (análogo da somatostatina e/ou agonista dopaminérgico e/ou radioterapia externa). Ao analisar os indivíduos que fizeram uso do análogo de somatostatina como terapêutica adjuvante à CTE, podemos observar que 80% dos indivíduos com somatotrofinoma *gsp*-positivo obtiveram controle da doença, enquanto que no grupo *gsp*-negativo apenas 33% obtiveram controle ($p=0,08$). Quando associamos ao análogo da somatostatina, os agonistas dopaminérgicos e/ou radioterapia externa, observamos que 100% dos pacientes com somatotropinomas *gsp*-positivo tiveram critério de controle da doença, enquanto apenas 44% no grupo *gsp*-negativo conseguiram alcançar concentrações de IGF-1 adequadas para o sexo e idade ($p=0,09$) (Apêndice B).

Tabela 4- Dados clínicos e bioquímicos entre os pacientes *gsp+* e *gsp-*

Dados clínicos e bioquímicos	<i>gsp+</i>	<i>gsp-</i>	P
Idade ao diagnóstico (anos)	39,0±11,5	43,6±9,0	0,32
Sexo F/M	5/4	10/7	1,00
GH basal ao diagnóstico (µg/L)	62,4±128,1	39,9±48,3	0,39
IGF-1 ULNR% ao diagnóstico	435,5± 230,8	556,9± 238,3	0,32
Prolactina ao diagnóstico (ng/mL)	25,7±29,8	30,9±32,8	0,69
Hardy I/II	5/9	8/16	1,00
Hardy III/IV	4/9	8/16	
Tempo de seguimento (anos)	5,6 ± 2,1	5,5 ±5,4	0,28
Percentual com realização de uma CTE1	78% (01)	82,4% (01)	1,00
RxT adjuvante	01/09	02/17	1,00
Controle da doença com uso de AS, adjuvante a CTE	04/05 (80%)	02/06 (33%)	0,08
Controle da doença com uso de AS, AD e RxT, adjuvante a CTE	05/05 (100%)	04/09 (44%)	0,09

F:feminino;M:masculino;AS:agonista da Somatostatina;CTE:cirurgia trans esfeinoidal;AD:agonista do paminérgico;RxT:radioterapia externa convencional.

4.5 Estudo da expressão dos genes *GNAS* e *BTG2*

Dentre as 26 amostras do estudo, analisamos a expressão relativa do gene *GNAS* e *BTG2* em 20 e 21 somatotrofinomas, respectivamente.

A Tabela 5 apresenta os dados da expressão dos genes *GNAS* e *BTG2* em $2^{-\Delta\Delta Ct}$ em média, desvio padrão, mediana e variação. O fold foi obtido da relação entre a mediana dos valores de $2^{-\Delta\Delta C}$ das amostras tumorais e a mediana dos tecidos normais. Para o cálculo do fold entre o grupo *gsp+* e *gsp-* utilizamos a

relação entre a mediana dos valores de $2^{-\Delta\Delta C}$ das amostras tumorais gsp+ e a mediana das amostras tumorais gsp-.

Não encontramos diferença significativa ($p=0,97$) entre a expressão do gene *GNAS* entre somatotrofinoma ($1,07\pm 0,55$) e amostras de tecido hipofisário normal ($0,98\pm 0,28$). Não encontramos, também, diferença significativa na expressão relativa do gene *GNAS* entre o grupo de somatotrofinoma gsp-positivos ($1,04\pm 0,59$) e gsp-negativos ($1,10\pm 0,55$) ($p=0,97$), assim como entre esses e o tecido hipofisário normal2 ($0,95\pm 0,27$) ($p=0,99$) (figura 7A).

Os tumores classificados com menor agressividade tumoral (Hardy I/II) apresentaram maior expressão do *GNAS* do que os tumores classificados com maior agressividade tumoral (Hardy III/IV) ($p=0,02$), (figura 7B).

Não houve associação entre o grau de expressão do *GNAS* e controle da doença com apenas a cirurgia ($p=0,16$) ou com uso de todas as terapêuticas disponíveis (cirurgia e/ou análogo e/ou CAB e/ou Rxt) ($p=0,47$).

Observamos menor expressão de *BTG2* nos somatotrofinomas ($0,35\pm 0,46$) comparada às amostras de tecido hipofisário normal ($1,22\pm 0,78$) (fold=-6,63; $p=0,002$) (figura 7C). Ainda, a menor expressão do *BTG2* foi observada no grupo de somatotrofinoma gsp-negativo ($0,21\pm 1,15$) quando comparada com as amostras de tecido hipofisário normal ($1,22\pm 0,78$) (fold=-6,67; $p=0,01$); sem diferença entre somatotrofinoma gsp-positivo e amostras de tecido hipofisário normal (Figura 7D). Ainda, não encontramos diferença significativa na expressão relativa do *BTG2* entre o grupo de somatotrofinoma gsp-positivos ($0,54\pm 0,65$) e gsp-negativos ($0,21\pm 0,15$) ($p=0,52$).

Não houve associação entre o grau de expressão relativa de *BTG2* e agressividade tumoral, avaliada pelo escore de Hardy ($p=0,47$), assim como com o controle da doença, apenas com a cirurgia ($p=0,36$) ou com o uso de todas as terapêuticas disponíveis (cirurgia e/ou análogo e/ou CAB e/ou Rxt) ($p=1,00$).

Figura 7A- Expressão relativa do gene *GNAS* entre o grupo de somatotrofinoma gsp-positivos, gsp-negativos e hipófises normais, ns:não significativo.

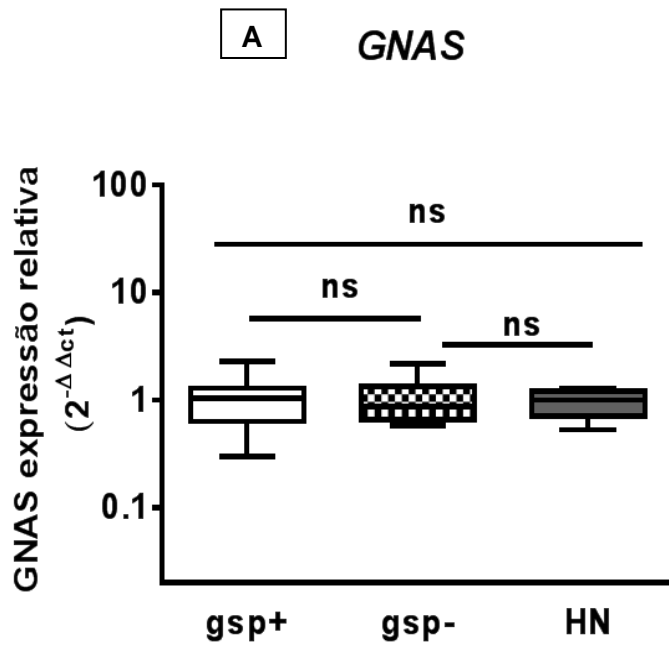


Figura 7B- Expressão relativa do gene *GNAS* entre os tumores (Hardy I/II) e (Hardy III/IV).

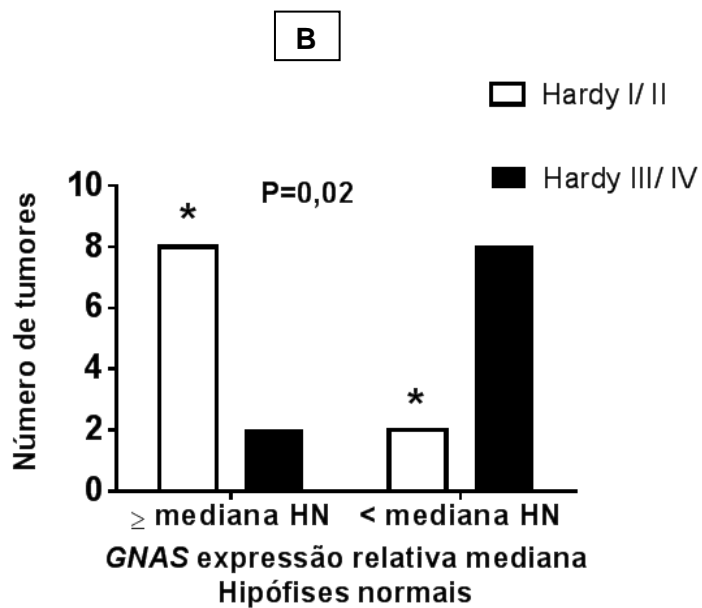


Figura 7C- Expressão relativa do gene *BTG2* nos somatotrofinomas e hipófises normais, ns: não significativo.

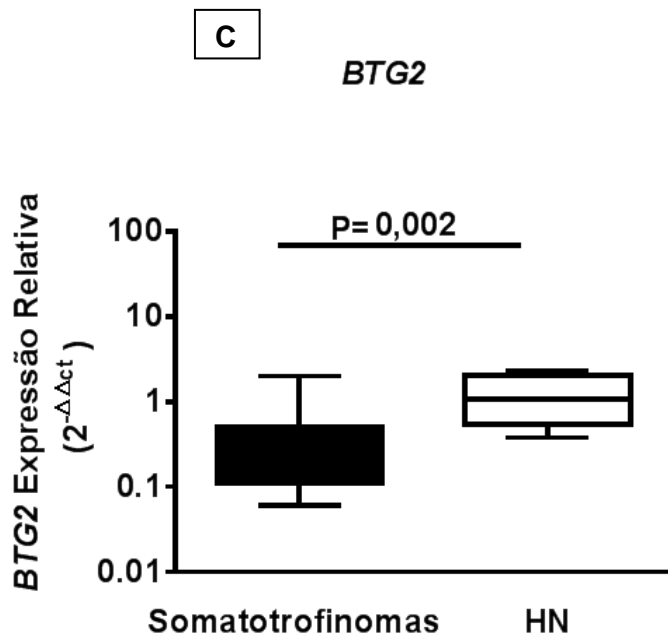


Figura 7D- Expressão relativa do gene *BTG2* nos somatotrofinomas gsp-positivos, gsp-negativos e hipófises normais, ns: não significativo.

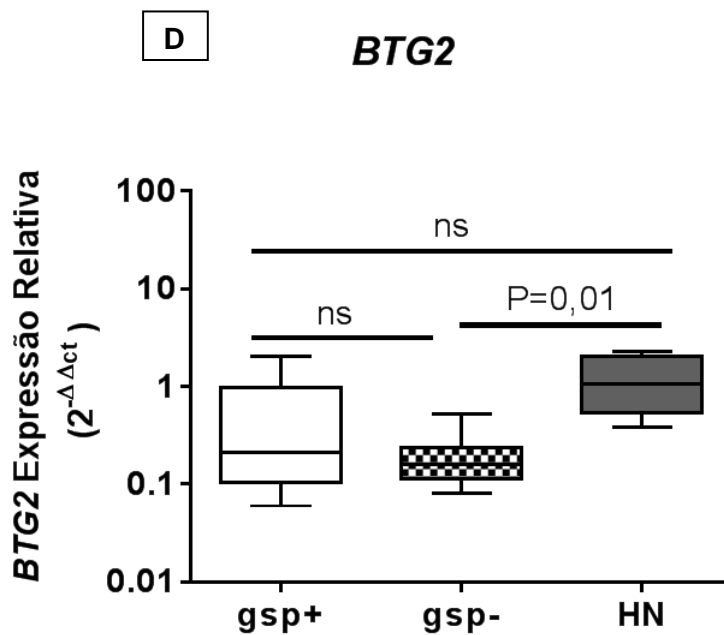


Tabela 5- Expressão gênica diferencial entre hipófises normais e somatotrofinoma gsp-positivo (gsp+) e gsp-negativo (gsp-) dos genes *GNAS* e *BTG2*.

Gene	Hipófises normais	Somatotrofinomas	Mann Whitney	Somatotrofinomas	Somatotrofinomas	Mann Whitney
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Média \pm DP; Mediana(Variação)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Média \pm DP; Mediana(Variação)		gsp+	gsp-	
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Média \pm DP; Mediana(Variação)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Média \pm DP; Mediana(Variação)		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Média \pm DP; Mediana(Variação)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Média \pm DP; Mediana(Variação)	
<i>GNAS</i>	0,97 \pm 0,28 1,00(0,53-1,30)	1,07 \pm 0,55 0,95(0,30-2,29)	p=0,97	1,04 \pm 0,59 1,04 (0,30 –2,29)	1,10 \pm 0,55 0,95 (0,58 –2,18)	p=0,97
<i>BTG2</i>	1,22 \pm 0,78 1,06(0,38-2,26)	0,35 \pm 0,46 0,16(0,06-2,01)	p=0,002; fold=(-6,63)	0,54 \pm 0,65 0,21 (0,06 –2,01)	0,21 \pm 0,15 0,16 (0,08 –0,53)	p=0,52

4.6 Estudo da expressão dos microRNAs

A tabela 6 apresenta a expressão em $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos microRNAs *Let7a*, *miR-16a*, *miR-21*, *miR-141*, *miR-143*, *miR-15a*, *miR-145*, *miR-23a*, *miR-23b* e *miR-24-2* entre somatotrofinoma e amostras de tecido hipofisário normal e entre somatotrofinoma gsp-positivos e gsp-negativos em média, desvio padrão, mediana e variação. O fold foi obtido da relação entre a mediana dos valores de $2^{-\Delta\Delta C}$ das amostras tumorais e a mediana dos tecidos normais. Para o cálculo do fold entre o grupo gsp+ e gsp- utilizamos a relação entre a mediana dos valores de $2^{-\Delta\Delta C}$ das amostras tumorais gsp+ e a mediana das amostras tumorais gsp-.

let-7a

Não encontramos diferença na expressão relativa do miR-let-7a entre os somatotrofinomas ($0,95 \pm 1,03$) e as amostras de tecido hipofisário normal ($1,23 \pm 1,04$) ($p=0,51$). Ainda, não houve diferença na expressão entre os grupos de somatotrofinoma gsp-positivos ($0,84 \pm 0,46$) e gsp-negativos ($1,01 \pm 1,25$) ($p=0,55$).

miR-16a

Encontramos menor expressão relativa do miR-16 no grupo de somatotrofinoma ($0,65 \pm 1,27$) quando comparada as amostras de tecido hipofisário normal ($1,13 \pm 0,46$) ($p=0,01$; fold=-10,00) (Figura 8). Entretanto, não houve diferença na expressão entre os grupos de somatotrofinoma gsp-positivos ($0,46 \pm 1,00$) e gsp-negativos ($0,82 \pm 1,52$) ($p=0,74$).

miR-21

Encontramos maior expressão relativa do miR-21 entre os somatotrofinomas ($20,16 \pm 18,48$) quando comparado com as amostras de tecido hipofisário normal ($2,52 \pm 3,56$) ($p=0,02$; fold=10,18) (Figura 9). Entretanto, não houve diferença na expressão entre os grupos de somatotrofinoma gsp-positivos ($13,17 \pm 15,59$) e gsp-negativos ($23,92 \pm 19,37$) ($p=0,34$).

miR-141

Encontramos menor expressão relativa do miR-141 entre os somatotrofinomas ($0,16 \pm 0,44$) quando comparada com as amostras de tecido hipofisário normal ($0,97 \pm 0,62$) ($p=0,0003$; $\text{fold}=-50,00$) (Figura 10). Entretanto, não houve diferença na expressão entre os grupos de somatotrofinoma *gsp*-positivos ($0,37 \pm 0,66$) e *gsp*-negativos ($0,03 \pm 0,03$) ($p=0,70$).

miR-143

Não encontramos diferença na expressão relativa do miR-143 entre os somatotrofinomas ($1,83 \pm 1,54$) e as amostras de tecido hipofisário normal ($1,14 \pm 0,57$) ($p=0,56$). Ainda, não houve diferença na expressão entre os grupos de somatotrofinoma *gsp*-positivos ($1,17 \pm 1,05$) e *gsp*-negativos ($2,30 \pm 1,70$) ($p=0,13$).

miR-15a

Não encontramos diferença significativada expressão relativa do miR-15^a entre os somatotrofinomas ($1,20 \pm 1,46$) e as amostras de tecido hipofisário normal ($1,09 \pm 0,63$) ($p=0,41$). Ainda, não houve diferença na expressão relativa entre os somatotrofinoma *gsp*-positivos ($0,89 \pm 0,58$) e *gsp*-negativos ($1,45 \pm 1,91$) ($p=0,70$).

miR-145

Não encontramos diferença significativa na expressão relativa do miR-145 entre os somatotrofinomas ($1,71 \pm 1,56$) e as amostras de tecido hipofisário normal ($0,96 \pm 0,53$) ($p=0,63$). Entretanto, a expressão foi menor no grupo de somatotrofinoma *gsp*-positivos ($0,90 \pm 1,24$) quando comparada ao grupo *gsp*-negativos ($2,44 \pm 1,50$) ($p=0,03$; $\text{fold}=-4,83$) (Figura 11).

miR-23a

Não encontramos diferença significativa da expressão relativa do miR-23a entre os somatotrofinomas ($1,74 \pm 1,54$) e as amostras de tecido hipofisário normal ($0,96 \pm 0,38$) ($p=0,49$). Ainda, não houve diferença significativa na expressão relativa entre os somatotrofinoma *gsp*-positivos ($1,24 \pm 1,31$) e *gsp*-negativos ($2,12 \pm 1,65$) ($p=0,14$).

miR-23b

Não encontramos diferença significativa na expressão relativa do miR-23b entre os somatotrofinomas ($1,06 \pm 0,71$) e as amostras de tecido hipofisário normal ($1,20 \pm 0,62$) ($p=0,52$). No entanto, a expressão relativa do miR-23b foi menor no grupo de somatotrofinoma gsp-positivos ($0,66 \pm 1,35$) quando comparada ao grupo gsp-negativos ($1,35 \pm 0,71$) ($p=0,02$; fold=-2,77) (Figura 12).

miR-24-2

Não encontramos diferença significativa na expressão do miR-24-2 entre os somatotrofinoma ($3,07 \pm 2,72$) quando comparado com as amostras de tecido hipofisário normal ($0,91 \pm 0,37$) ($p=0,05$). Ainda, não houve diferença significativa na expressão relativa entre os somatotrofinomas gsp-positivos ($1,93 \pm 2,14$) e gsp-negativos ($3,86 \pm 2,86$) ($p=0,07$).

Não houve associação entre a expressão relativa dos microRNAs *Let7a* ($p=0,63$), *miR-16a* ($p=0,08$), *miR-21* ($p=1,00$), *miR-141* ($p=0,12$), *miR-143* ($p=1,00$), *miR-15a* ($p=0,63$), *miR-145* ($p=0,35$), *miR-23a* ($p=1,00$), *miR-23b* ($p=0,23$) e *miR-24-2* ($p=0,65$) com o grau de agressividade do tumor, avaliado pelo escore de Hardy.

Não houve associação entre a expressão relativa dos microRNAs *Let7a*, *miR-16a*, *miR-21*, *miR-141*, *miR-143*, *miR-15a*, *miR-145*, *miR-23a*, *miR-23b* e *miR-24-2* com o controle da doença com uso da cirurgia ($p=1,00$; $p=1,00$; $p=0,47$; $p=0,44$; $p=0,30$; $p=0,10$; $p=0,58$; $p=1,00$; $p=0,17$; $p=0,32$; respectivamente) e com o uso de todas as terapêuticas disponíveis (cirurgia e/ou análogo e/ou CAB e/ou Rxt) ($p=1,00$ $p=0,37$; $p=1,00$; $p=1,00$; $p=0,23$; $p=0,63$; $p=0,35$; $p=1,00$; $p=0,23$; $p=0,65$; respectivamente).

A tabela 7 apresenta a análise de correlação entre a expressão relativa dos genes *GNAS* e *BTG2* com cada miRNA estudado. Não observamos correlação entre o *GNAS* e os microRNAs *Let7a*, *miR-16a*, *miR-21*, *miR-141*, *miR-143*, *miR-15a*, *miR-145*, *miR-23a*, *miR-23b*, *miR-24-2*), como também não observamos correlação entre o *BTG2* e os mesmos microRNAs.

Figura 10- Expressão relativa do miR-141 entre os somatotrofinomas e hipófises normais.

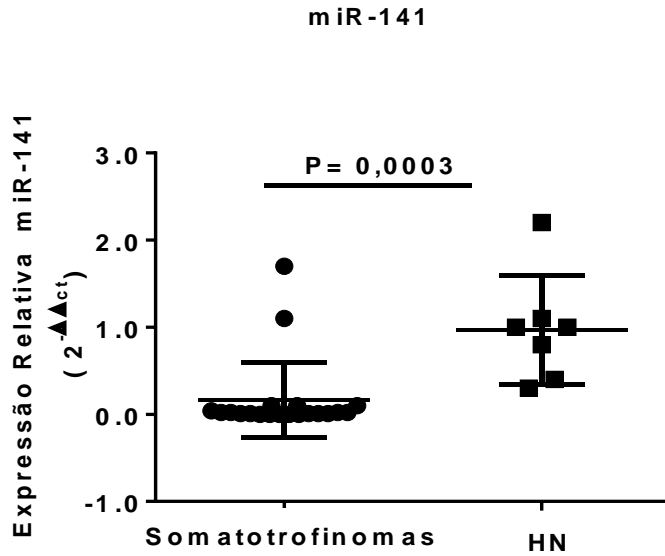


Figura 11- Expressão relativa do miR-145 entre os somatotrofinomas gsp-positivos e gsp-negativos.

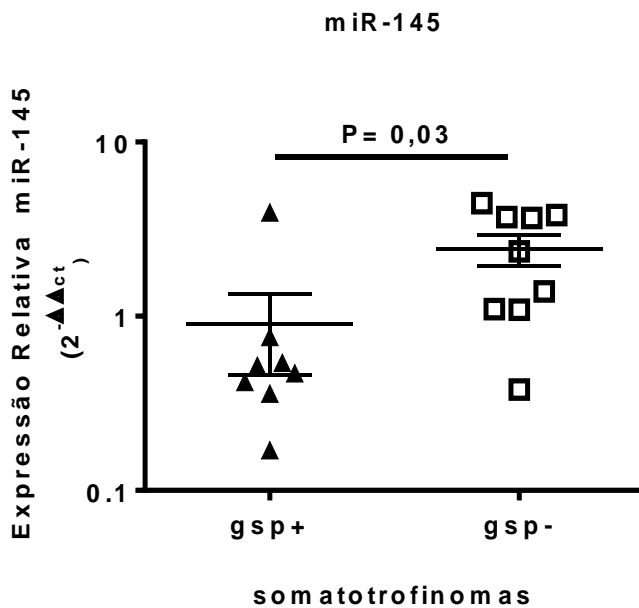


Figura 12- Expressão relativa do miR-23b entre os somatotrofinomas gsp-positivos e gsp-negativos.

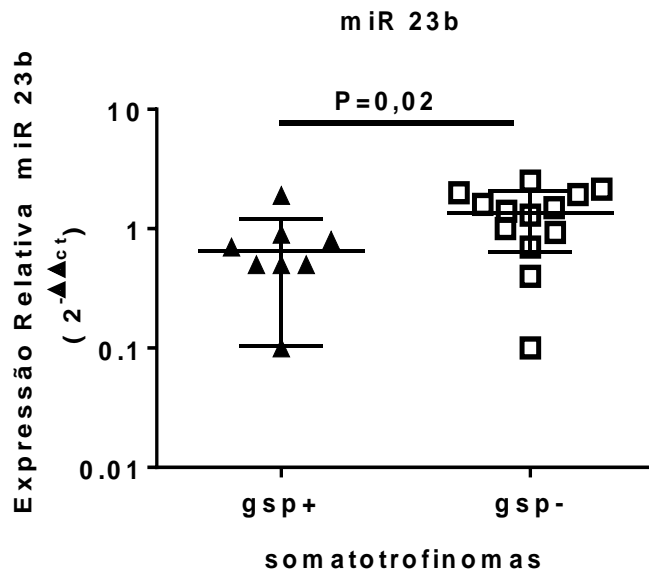


Tabela 6- Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) diferencial dos MicroRNAs do estudo entre somatotrofinomas e hipófises normais e entre somatotrofinomas *gsp+* e *gsp-*

MicroRNA	Média ± Desvio Padrão Mediana (variação)		Mann Whitney p< 0,05 Fold	Média ± Desvio Padrão Mediana (variação)		Mann Whitney p< 0,05 Fold
	Somatotrofinoma ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Hipófises normais ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		<i>gsp+</i> ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	<i>gsp-</i> ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	
<i>Let7a</i>	0,95±1,03 0,64(0,07-4,50)	1,23±1,04 1,05(0,20-2,61)	0,51	0,84 ± 0,46 0,67(0,47-1,81)	1,01 ± 1,25 0,48 (0,07-4,50)	0,55
<i>miR-16^a</i>	0,65±1,27 0,10 (0,00-4,00)	1,13 ± 0,46 1,00 (0,70-2,10)	0,01 Fold (-10,00)	0,46±1,00 0,10 (0,00-2,90)	0,82±1,52 0,10 (0,00-4,00)	0,74
<i>miR-21</i>	20,16±18,48 11,20(0,80-56,40)	2,53 ±3,56 1,10(0,10-7,80)	0,02 Fold (10,18)	13,17±15,59 6,90 (0,90-45,40)	23,92±19,37 18,90(0,80-56,40)	0,34
<i>miR-141</i>	0,16±0,44 0,02 (0,00-1,70)	0,97 ± 0,62 1,00 (0,30-2,20)	0,0003 Fold (-50,00)	0,37±0,66 0,02(0,00-1,70)	0,03±0,03 0,02(0,00-0,10)	0,70
<i>miR-143</i>	1,83 ± 1,54 1,16(0,13-4,84)	1,14 ± 0,57 1,00(0,48-1,96)	0,56	1,17±1,05 0,69(0,13-2,81)	2,30± 1,70 1,66 (0,48-4,84)	0,13
<i>miR-15^a</i>	1,20±1,46 0,70(0,10-5,40)	1,09 ± 0,63 1,00 (0,40-2,20)	0,41	0,89 ± 0,58 0,80 (0,20-1,70)	1,45 ± 1,91 0,45 (0,10-5,40)	0,70
<i>miR-145</i>	1,71±1,56 1,09(0,17-4,45)	0,96±0,53 1,00 (0,27-1,79)	0,63	0,90 ± 1,24 0,50 (0,17-3,95)	2,44 ± 1,50 2,36 (0,38-4,45)	0,03 Fold(-4,83)
<i>miR-23^a</i>	1,74±1,54 1,00(0,21-5,39)	0,96±0,38 1,00(0,30-1,50)	0,49	1,24±1,31 1,00 (0,21-4,60)	2,12±1,65 1,40 (0,40-5,39)	0,15
<i>miR-23b</i>	1,06±0,71 0,89 (0,00-2,50)	1,20±0,62 1,00 (0,38-2,17)	0,52	0,66±1,35 0,50(0,00-1,90)	1,35±0,71 1,40 (0,10-2,50)	0,02 Fold(-2,77)
<i>miR-24-2</i>	3,07± 2,72 2,62 (0,14-10,14)	0,91±0,37 1,00(0,27-1,43)	0,06	1,93 ± 2,14 0,80 (0,10 -6,10)	3,86 ± 2,87 3,90 (0,40-10,14)	0,07

Tabela 7- Correlação entre a expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos genes *GNAS* e *BTG2* com microRNA.

Genes	MicroRNAs									
	<i>Let7a</i>	<i>miR-16a</i>	<i>miR-21</i>	<i>miR-141</i>	<i>miR-143</i>	<i>miR-15a</i>	<i>miR-145</i>	<i>miR-23a</i>	<i>miR-23b</i>	<i>miR-24-2</i>
<i>GNAS</i>										
<i>Coeficiente(r)</i>	-0,29	-0,39	-0,15	0,18	0,04	0,38	0,47	-0,01	0,01	0,01
<i>p (bi-caudal)</i>	0,26	0,13	0,57	0,47	0,86	0,13	0,06	0,98	0,96	0,98
<i>BTG2</i>										
<i>Coeficiente(r)</i>	0,33	-0,17	0,14	-0,26	0,11	0,13	0,30	-0,05	-0,15	0,09
<i>p (bi-caudal)</i>	0,26	0,13	0,57	0,47	0,86	0,13	0,06	0,98	0,96	0,98

Discussão

5 DISCUSSÃO

A maioria dos nossos pacientes encontrava-se entre a quarta e quinta década de vida por ocasião do diagnóstico e 96% eram portadores de macroadenomas, dados esses semelhantes a outras casuísticas (JANE JR *et al.*, 2011; LÜDECKE; ABE, 2006). Esses dados reforçam a necessidade de diagnóstico mais precoce da doença, uma vez que, em média, existe um atraso de 10 anos entre o início dos sintomas e o correto diagnóstico. Estudo recente, realizado em uma coorte de 324 acromegálicos, que tiveram o período de diagnóstico dividido em duas fases durante os 24 anos de seguimento, a depender do ano da realização da cirurgia, demonstrou a persistência no atraso diagnóstico, uma vez que não houve diferença entre manifestações clínicas iniciais, comorbidades e tamanho do tumor hipofisário entre os dois grupos analisados. Dessa forma, apesar dos avanços diagnósticos e terapêuticos ocorridos nas últimas décadas, a acromegalia persiste como uma doença associada à alta morbimortalidade (REID *et al.*, 2010).

Na nossa série todos os pacientes foram submetidos à CTE, 80,8% realizaram apenas um procedimento cirúrgico e 19,2% realizaram duas cirurgias, ressaltando-se que todos os procedimentos foram realizados por um único experiente cirurgião. O controle da doença com o procedimento cirúrgico foi observado em 42% dos pacientes. O fato de 96% dos nossos pacientes serem portadores de macroadenomas justifica o percentual de controle com o procedimento cirúrgico, uma vez que na literatura a taxa de remissão após a cirurgia situa-se entre 26-68% para macroadenomas e entre 59-95% para microadenomas (JANE JR *et al.*, 2011; LÜDECKE; ABE, 2006).

Terapêuticas medicamentosas adjuvantes à CTE visando o controle da doença foram utilizadas em 58% dos pacientes. Controle da doença (normalização do IGF-1) foi observado em 64% dos pacientes durante seguimento de $6,0 \pm 3,9$ anos (variando de 2 a 13 anos); ainda, três pacientes realizaram radioterapia. O longo tempo de seguimento, a disponibilidade de maneira gratuita dos análogos da somatostatina e o uso de radioterapia, em casos selecionados, foram fatores que contribuíram para o grau de resposta observado na nossa casuística. Entretanto, um razoável número de pacientes não obteve controle com as opções terapêuticas

disponíveis. O uso do pegvisomanto, droga ainda não disponível em nosso meio para uso pelo Sistema Único de Saúde (SUS), teria indicação nesses pacientes, embora não tenha ação na redução tumoral. A droga está indicada em situações de não cura após cirurgia e/ou radioterapia, pacientes resistentes ou intolerantes à doses máximas de análogos da somatostatina e agonistas dopaminérgicos (VIEIRA NETO *et al.*, 2011). Seu uso semanal associado à terapêutica com os AS já foi relatado e se mostrou eficaz no controle das concentrações de IGF-1.

Nosso estudo teve como um dos seus objetivos a avaliação da presença de mutação no gene *GNAS* em uma população de somatotrofinomas esporádicos. Para a melhor caracterização desses grupos, estudamos também a presença de mutações no gene *AIP*, mutações essas associadas à acromegalia familiar, mas presente raramente nas formas esporádicas da doença. Nesse grupo de pacientes com somatotrofinomas supostamente esporádicos, encontramos apenas uma mutação na amostra tumoral em homozigose (p.R304X) no *AIP* (3,8%). Nossos dados vão de encontro aos dados existentes na literatura, em que, em tumores hipofisários esporádicos não selecionados, com história familiar negativa, a mutação germinativa do *AIP* é rara, estando presente em 4,1% dos somatotrofinoma, 4,5% dos prolactinomas, 6,8% dos corticotrofinomas e 0,9% dos tumores hipofisários não funcionantes (CAZABAT *et al.*, 2012; CAZABAT *et al.*, 2009).

Quando se seleciona indivíduos portadores de somatotrofinomas esporádicos nos quais o diagnóstico foi feito antes dos 30 anos, observa-se aumento na frequência (13,3%) de mutações germinativas no *AIP* (BECKERS *et al.*, 2013). Dados semelhantes foram observados também na população filandesa, na qual a frequência de mutações *AIP* foi de 16% em acromegálicos (CAZABAT *et al.*, 2012). Nosso paciente com mutação no *AIP* teve seu diagnóstico de acromegalia aos 39 anos, apresentava macroadenoma invasivo (Hardy IV) e com resposta insatisfatória ao AS. Ressalta-se que nesse paciente a pesquisa de mutação no gene *GNAS* foi negativa. Mutações no *AIP* têm sido relatadas em pacientes acromegálicos com adenoma esporádico e menor chance de controle da doença após o uso de diversas modalidades terapêuticas (BARLIER *et al.*, 2007; DALY *et al.*, 2010). Esses dados poderiam sugerir que a pior resposta com o uso de AS, em portadores de mutação no *AIP*, seria devido à redução nos subtipos dos receptores para somatostatina nesses tumores; entretanto, não parece ser essa a causa, segundo trabalho recente

(CHAHAL *et al.*, 2012). Em publicação recente, a recomendação para a realização da pesquisa de mutação germinativa no *AIP* deve ser direcionada para pacientes com critérios clínicos para FIPA, com adenoma hipofisário diagnosticado antes dos 18 anos e macroadenomas diagnosticados antes dos 30 anos, uma vez que a presença da mutação pode ser observada em até 20,5% nesses subgrupos acima mencionados (KORBONITS; STORR; KUMAR, 2012). A presença de mutação somática em adenomas hipofisários ainda não foi reportada na literatura. Em um estudo no qual a mutação foi observada no DNA tumoral, a mesma mutação (p.Arg22X) foi, posteriormente, demonstrada ser germinativa (BARLIER *et al.*, 2007).

A proteína AIP forma um complexo com o receptor para hidrocarbonetos arilo (AHR)(CHAHAL *et al.*, 2010). O paciente de nossa casuística apresentava a mutação p.R304X no gene *AIP*. Esta mutação remove a região de ligação ao receptor, o qual está envolvido na metabolização de xenobióticos, mediando a resposta a agentes tóxicos como as dioxinas. O efeito carcinogênico das dioxinas está relacionado à ativação dos AHR. O exato mecanismo através do qual o *AIP* exerce ação supressiva tumoral na hipófise permanece indeterminada (KARHU; AALTONEN, 2007). A maior expressão da proteína AIP em somatotrofinoma esporádicos sem mutação no gene foi preditora de melhor resposta à terapêutica com octreotide, independente da expressão do SSTR2. Adicionalmente, baixa expressão da proteína AIP foi associada à maior invasibilidade em somatotrofinomas esporádicos (CAZABAT *et al.*, 2012; KASUKI JOMORI DE PINHO *et al.*, 2011; KASUKI *et al.*, 2012).

Observamos a presença do oncogene *gsp* em 35% da nossa casuística, sendo a maioria portadora da mutação p.R201C (55%), enquanto 22% apresentaram a mutação p.R201H, ambas no exon 8, codon 201. Ainda, em duas amostras (22%) observamos a mutação p. Q227L no éxon 9, codon 227. Todas as mutações observadas foram em heterozigose. As mutações no codon 201 também são descritas mais frequentemente na literatura (BARLIER *et al.*, 1998; LANDIS *et al.*, 1990; SHI *et al.*, 1998). Nossos dados quanto à prevalência são semelhantes aos observados em trabalhos anteriores, nos quais a prevalência da mutação em somatotrofinomas esporádicos varia de 4,0-59% (BARLIER *et al.*, 1998; LANDIS *et al.*, 1990; LYONS *et al.*, 1990; YASUFUKU-TAKANO *et al.*, 2006).

Estudos prévios analisando as características clínicas e bioquímicas dos pacientes portadores de somatotrofinoma com mutação *gsp* apresentaram resultados conflitantes. Na nossa série, não observamos diferença significativa na idade de apresentação da doença, sexo e agressividade tumoral (Hardy), concentrações plasmáticas do GH e IGF-1 ao diagnóstico entre mutados e não mutados. Nossos dados são semelhantes aos relatados por outros autores que não encontraram diferenças fenotípicas e/ou bioquímicas claras entre mutados e não mutados (ADAMS *et al.*, 1995; MENDOZA *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 1996; YASUFUKU-TAKANO *et al.*, 2006). Por outro lado, em outras séries, os somatotrofinomas com oncogene *gsp+* foram menores e menos invasivos quando comparados aos *gsp-* (BUCHFELDER *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2001; LANDIS *et al.*, 1990; SHI *et al.*, 1998). Em outra série brasileira, composta de tumores hipofisários não funcionantes e somatotrofinomas, foi observada prevalência de 15% de somatotrofinoma *gsp+*, sendo observadas maiores concentrações de GH e IGF-1 ao diagnóstico e maiores diâmetros tumorais nos mutados, porém sem alcançar significância estatística (TABOADA *et al.*, 2009).

Os portadores do oncogene *gsp* seriam teoricamente portadores de tumores biologicamente mais ativos devido ao ganho de função decorrente da própria mutação. Porém, não se refletindo nas concentrações de IGF-1 devido, possivelmente, a um fenômeno de saturação do receptor hepático quando as concentrações de GH alcançam determinadas concentrações plasmáticas (LANIA; MANTOVANI; SPADA, 2003). Outro fator que poderia influenciar no comportamento mais agressivo dos somatotrofinomas, além do predomínio de macroadenomas bioquimicamente mais ativos (maior concentração de GH ao diagnóstico e de IGF-1) e menos responsivos à terapêutica com análogos, seria a presença de tumores em indivíduos jovens e do sexo masculino (COLAO *et al.*, 2002; PARKINSON; RYDER; TRAINER, 2001; PETERSENN *et al.*, 2008). Dessa forma, o gênero e a idade poderiam ser fatores que potencialmente contribuiriam para o encontro de diferença na resposta à terapêutica medicamentosa no grupo estudado, independente do achado do oncogene *gsp*.

Em nossa série de somatotrofinomas, salientamos que os pacientes com mutação no oncogene *gsp* apresentaram maior percentual de resposta ao agonista da somatostatina, quando usado isoladamente ou quando associado a outras

modalidades terapêuticas (AS, AD e Rxt), porém não observamos diferença estatisticamente significativa, possivelmente devido ao número reduzido de indivíduos no subgrupo analisado (gsp+), havendo necessidade de inclusão de um número maior de casos. Apesar do achado de um maior número percentual de pacientes portadores de tumores gsp+ terem controle da doença, não observamos diferença entre os níveis de GH, IGF1(ULNR%) e PRL, ao diagnóstico, no escore de Hardy, tamanho tumoral e na necessidade de mais procedimentos cirúrgicos entre os grupos mutados e não mutados. Em uma série estudada, os adenomas gsp- foram tumores mais agressivos, com pior controle bioquímico, após a utilização de todas as modalidades terapêuticas disponíveis, e o uso de RXT foi restrito apenas a este grupo (BARLIER *et al.*, 1998); dados semelhantes foram posteriormente confirmados (YASUFUKU-TAKANO *et al.*, 2006).

Melhor resposta à administração de octreotida, com maior supressão das concentrações de GH nos somatotrofinomas gsp+, foi também observada durante teste agudo com octreotida (BARLIER *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 1996). Além de melhor resposta aos agonistas da somatostatina observada em somatotrofinomas gsp+, observa-se, também, melhor controle pós-cirúrgico, atribuído aos menores diâmetros tumorais observado nesse grupo (FAGLIA; AROSIO; SPADA, 1996; SHI *et al.*, 1998). Por outro lado, em uma série mais recente, não foi encontrada diferença na resposta ao análogo da somatostatina entre mutados e não mutados (FREDA *et al.*, 2007). Assim, em várias séries, a presença da mutação gsp foi associada ao melhor prognóstico independente da maior ou menor secreção hormonal, idade ao diagnóstico e tamanho do tumor, sugerindo que outros fatores, que não a presença da mutação gsp+, estariam influenciando o prognóstico neste subtipo de somatotrofinomas (BUCHFELDER *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2001; LANDIS *et al.*, 1990; SHI *et al.*, 1998).

Uma possível explicação para a maior sensibilidade ao octreotide no grupo gsp+ seria a indução de alterações pós-receptor devido à presença da proteína mutada (oncogene gsp), a qual modificaria o equilíbrio existente entre as subunidades α e o complexo $\beta\gamma$ (BARLIER *et al.*, 1998). Os agonistas da somatostatina atuariam revertendo os efeitos da ativação constante $G_s\alpha$, favorecendo a resposta terapêutica medicamentosa (BARLIER *et al.*, 1998). Vários trabalhos *in vivo* e *in vitro* demonstraram a importância dos subtipos dos receptores da

somatostatina SSTR2 e SSTR5 em mediar a supressão do GH nas células hipofisárias somatotróficas (FERONE *et al.*, 2008; FOUNGNER *et al.*, 2008; TAKEI *et al.*, 2007). Nos adenomas ocorre predomínio de expressão do RNA mensageiro dos receptores SSTR2 E SSTR5, bem como correlação positiva entre o grau de expressão do SSTR2 e supressão do GH em resposta aos análogos da somatostatina (FEELDERS *et al.*, 2009; JAQUET *et al.*, 2000; SHIMON *et al.*, 1997; TABOADA *et al.*, 2007). Portanto, maior expressão dos receptores da somatostatina em portadores da mutação *gsp* justificaria uma melhor resposta aos análogos da somatostatina.

Entretanto, Barlier e colaboradores em 1999, utilizando Northern blot, não encontraram diferença de expressão do gene SSTR2 entre mutados e não mutados, assim, a melhor resposta dos somatotrofos *gsp+* se daria por uma via independente da expressão do SSTR2 nas células tumorais (BARLIER *et al.*, 1999). Em estudo avaliando fatores associados a melhor resposta ao AS em somatotrofinomas, encontrou-se correlação positiva entre o grau de imunomarcção na membrana plasmática para o SSTR2A e nuclear para o Ki67, com a resposta aguda ao análogo da somatostatina (NAKASHIMA; TAKANO; MATSUNO, 2009). Todavia, apesar de os somatotrofinomas *gsp+* terem apresentado maior imunomarcção do receptor SSTR2 na membrana plasmática, o que poderia justificar uma melhor resposta aos agonistas, não foi possível correlacionar expressão de SSTR2 e presença de mutação *gsp*. Até o momento, apesar do possível aumento na expressão do receptor SSTR2 mediado pela presença da ativação constitutiva da adenociclase, não há evidências associando a presença do oncogene *gsp* e indução do RNAm do SSTR2 (NAKASHIMA; TAKANO; MATSUNO, 2009).

Além do grau de expressão e densidade no tecido tumoral somatotrófico dos receptores SSTR2 e SSTR5, outros fatores estariam envolvidos no grau de eficácia terapêutica aos AS: frequência de administração e dose total do análogo, o tamanho do tumor, concentrações de GH pré-tratamento, indivíduos do sexo masculino e jovens, presença de hipersinal em T2 na RNM de hipófise, tumores esparsamente granulados, aumento da expressão do Ki67 e p53, além de presença de mutação *AIP* (FOUGNER *et al.*, 2012; GADELHA; KASUKI; KORBONITS, 2012). A resistência ao análogo pode refletir graus de desdiferenciação celular dos adenomas, em que adenomas com *gsp+* seriam menos desdiferenciados e

expressariam mais SSTR. A desdiferenciação estaria associada ao maior grau proliferativo, porém, Nakashima e colaboradores em 2009 não observaram diferença na imunomarcagem para o índice mitótico Ki67 entre gsp+ e gsp-.

Além de todas as características moleculares apontadas para justificar uma diferente atuação dos análogos da somatostatina em somatotrofinomas com oncogene gsp, existem importantes diferenças morfológicas e estruturais nos somatotrofinomas que refletem diferentes mecanismos patogênicos; sendo a diferenciação entre somatotrofinomas densamente granulados e esparsamente granulados de grande importância para prever a antecipação da agressividade tumoral, bem como o grau de resposta à terapêutica medicamentosa (ASA; EZZAT, 2009; FOUNER *et al.*, 2012; GADELHA; KASUKI; KORBONITS, 2012). A literatura sugere que os adenomas com mutação *gsp* seriam, a princípio, do tipo densamente granulado, ou seja, um subtipo que apresenta células muito parecidas com as originais não tumorais, com marcação citoplasmática difusa e forte para GH, imunoreatividade nuclear forte para o Pit-1 e expressão de subunidade α (ASA; EZZAT, 2009). Assim, essas características estruturais, aliadas ao fato dos dois sinais hormonais GHRH e SST atuarem na adenilciclase estimulando e inibindo, respectivamente, o AMPc, favoreceriam a melhor resposta aos análogos da somatostatina, pois seriam células menos diferenciadas que conservam características funcionais e estruturais mais parecidas com as células originais (ASA; EZZAT, 2009; BHAYANA *et al.*, 2005; LARKIN *et al.*, 2013).

Em nosso estudo, além da presença de mutação *gsp*, avaliamos, também, a expressão do gene *GNAS* nos somatotrofinomas. Uma vez que, na literatura, é questionado se o desenvolvimento do adenoma estaria dependente unicamente da presença da mutação ($G_s\alpha$), que levaria a uma proteína mutada e ativação constitutiva do AMPc ou por uma expressão aumentada do *GNAS*. Não observamos diferença na expressão do gene *GNAS* entre somatotrofinomas e amostras de tecido hipofisário normal, assim como não houve diferença na expressão do gene *GNAS* entre o grupo de somatotrofinomas *gsp* mutados e não mutados. Em outro estudo, foi observada reduzida quantidade de proteína mutada nos tumores *gsp+*, porém sem diferença na expressão do RNAm do gene $G_s\alpha$ entre os tumores mutados e não mutados (BALLARE *et al.*, 1998). Porém, a

hipoexpressão do RNAm do gene $G_s\alpha$ em tumores *gsp+* foi relatada em outra série quando esses foram comparado a tumores *gsp-* (BARLIER *et al.*, 1999).

A hipótese levantada por esses autores seria a existência de um mecanismo compensatório de *feedback* negativo entre a proteína mutada $G_s\alpha$ e seu RNAm, como também a menor expressão da proteína $G_s\alpha$ nos tumores *gsp+* seria resultado de um aumento de sua degradação (BALLARE *et al.*, 1998; BARLIER *et al.*, 1999). O aumento da degradação da proteína mutada e o aumento da atividade da fosfodiesterase, responsável por hidrolisar o AMPc, estariam teoricamente protegendo as células e contra balanceando a ativação constitutiva das vias de sinalização celular dependentes deste segundo mensageiro (LANIA *et al.*, 1998). Assim, a existência desses dois mecanismos compensatórios, regulação na expressão do RNAm do gene $G_s\alpha$ pela proteína mutada e aumento da atividade da fosfodiesterase (PDE) podem, também, justificar a diversidade de achados clínicos entre tumores *gsp+* e *gsp-* nas séries estudadas (BARLIER *et al.*, 1999; LANIA; MANTOVANI; SPADA, 2003; LANIA; SPADA, 2009).

As fosfodiesterases (PDEs) são enzimas responsáveis pela hidrólise do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e do AMPc, sendo classificadas em 11 famílias diferentes no organismo. Em somatotrofinomas *gsp+* foi demonstrado aumento da atividade e hiperexpressão das isoformas das fosfodiesterases com maior especificidade para o AMPc como as PDE4C e PDE4D. Assim, o mecanismo de compensação para uma atividade aumentada do AMPc, através de uma maior atividade das PDEs, poderia atuar modulando as manifestações fenotípicas como: concentrações plasmáticas de GH e tamanho tumoral, justificando a não diferença nesses parâmetros observada no nosso estudo (PERSANI *et al.*, 2001).

Outra possível explicação para a semelhança fenotípica entre tumores *gsp+* e *gsp-*, observada por nós e em algumas séries, seria a ação da proteína não mutada semelhante à da proteína truncada, isto é, ativando constitutivamente a via do AMPc (LANIA; MANTOVANI; SPADA, 2003; LANIA; SPADA, 2009). Essa possibilidade baseia-se nos achados de expressão aumentada do gene $G_s\alpha$ em tumores *gsp-*. Tanto a proteína mutada como a “*wild-type*” são capazes de estimular a via AMPc-PKA promovendo proliferação celular. Avaliando a expressão de CREB e de ICER, dois fatores de transcrição nuclear dependentes da ativação do AMPc,

observou-se maior expressão do RNAm dos mesmo sem adenomas *gsp+*, porém com grande sobreposição com o grupo *gsp-*, sugerindo, nos adenomas mutados, a existência de um mecanismo capaz de contra regular o aumento de produção do AMPc (BERTHERAT; CHANSON; MONTMINY, 1995). Assim, o grau de expressão do *GNAS* semelhante entre mutados e não mutados, com possível atuação semelhante das proteínas mutada e não mutada na ativação constitutiva da via do AMPc, poderia justificar a sobreposição dos dados clínicos e a semelhança dos achados bioquímicos, como GH/IGF-1 semelhantes ao diagnóstico, observados nesta série. Ativação e inibição da via PKA e PKC se dão de maneira semelhante entre mutados e não mutados (LEI *et al.*, 1996). Entretanto, a cascata de sinalização com ativação da via PKA e formação de AMPc envolve a ação de várias isoformas ativas da adenilciclase, fosfodiesterases e PKAs, tornando inesgotável a explicação através de um único mecanismo.

Os genes de supressão tumoral são responsáveis por manter a integridade do ciclo celular, através do mecanismo de *checkpoint*, e a desregulação desses genes pode contribuir para a tumorigênese. Os genes de supressão tumoral são responsáveis por codificarem proteínas que regulam o ciclo celular e mantêm a estabilidade genômica, evitando que mutações gênicas sejam perpetuadas no processo de duplicação celular.

Os principais determinantes de parada do ciclo celular são a proteína do retinoblastoma (pRb) e os CDKIs (*cyclin-dependent kinases inhibitors*). Estímulos externos são necessários para ativação do ciclo celular em decorrência da ativação sequencial de ciclinas. Aumento no nível de ciclinas leva à sua ligação com CDKs, ativando-as, e este complexo (ciclinas-CDKs) adquire a capacidade de inativar por fosforilação da pRb, que, na forma inativa, libera fatores de transcrição e consequentemente promove a expressão de genes necessários para replicação de DNA (FU *et al.*, 2004). A atividade promotora da divisão celular dos complexos ciclinas-CDKs é regulada negativamente pelos CDKIs, reprimindo a progressão do ciclo celular (FU *et al.*, 2004). Estudos recentes do laboratório da Professora Margaret de Castro analisaram genes diferencialmente expressos em biblioteca de somatotrofinomas comparada com biblioteca de tecido hipofisário normal (DE LIMA *et al.*, 2012). Dentre os genes que se apresentavam diferencialmente expressos na biblioteca tumoral e que influenciam direta ou indiretamente o ciclo celular, o gene

supressor tumoral *BTG2* estava, com importante redução da sua expressão (-12,4x), despertando interesse de estudo, pois é conhecido como panregulador do ciclo celular (BOIKO *et al.*, 2006).

O *BTG2* atua como um panregulador do ciclo celular através da inibição da expressão de ciclina D1 e por biossíntese atrasada de ciclina E e da proteína CDK4 (BOIKO *et al.*, 2006). O *BTG2* é um gene supressor tumoral relacionado às vias do p53 e do Rb, pertence a uma família de genes com ação antiproliferativa altamente conservada entre diferentes espécies. Também tem sido sugerido como potencial ferramenta na coregulação transcricional, diferenciação e fator antiapoptótico na neurogênese (BOIKO *et al.*, 2006). No presente estudo validamos o SAGE por qPCR e demonstramos hipoexpressão do *BTG2* nos somatotrofinomas, sem diferença entre os *gsp* mutados e não mutados. Adicionalmente, observamos hipoexpressão mais pronunciada do *BTG2* no grupo *gsp*- quando os grupos *gsp*+ e *gsp*- foram comparados às amostras de hipófises normais. Assim, este achado pode justificar a presença de tumores mais invasivos em somatotrofinomas *gsp*- devido à presença de uma atividade proliferativa maior neste grupo, como já relatado na literatura, contribuindo, possivelmente, para uma menor taxa de resposta às terapêuticas medicamentosas, como observado em outras séries e sugerido no nosso estudo.

Recentemente, estudo de expressão gênica diferencial com uso de bioinformática e análises de vias de sinalização, em busca de novos genes candidatos que poderiam estar envolvidos na patogênese dos somatotrofinomas, encontrou diminuição de expressão do RNAm do *BTG2* quando as amostras tumorais foram comparadas a hipófises normais (JIANG; GUI; ZHANG, 2010).

Em câncer gástrico estudando linhagem de células tumorais transfectadas com o gene *BTG2*, foi observado seu marcado efeito apoptótico, com diminuição de proliferação e crescimento celular, constituindo-se um potencial alvo terapêutico (ZHANG, Lin *et al.*, 2010). A importância do *BTG2* como supressor tumoral tem sido demonstrada em neoplasias do sistema nervoso central (FARIOLI-VECCHIOLI *et al.*, 2007) e poderia estar implicado na patogênese dos somatotrofinomas. Em linhagens de células humanas tratadas com agentes químicos, irradiação ultravioleta e ionizante foi observado aumento do RNAm do *BTG2*, sendo os mesmos conhecidos

fatores indutores de atividade da p53. Posteriormente, em outros modelos experimentais foi demonstrado a regulação da p53 sob a expressão do *BTG2*. Dessa forma, o *BTG2* seria um alvo transcricional da p53.

No presente estudo, também avaliamos microRNAs, reguladores da transcrição gênica, que atuam por aumento da degradação do RNAm ou bloqueio da tradução do RNAm em proteína. A importância dos microRNAs no desenvolvimento hipofisário foi observado em estudo utilizando ratos mutados, no qual ocorreu perda de função da enzima Dicer (ribonuclease), responsável pela formação de microRNAs maduros (ZHANG, Zichao *et al.*, 2010). Nesse modelo experimental, ocorreu hipodesenvolvimento da hipófise anterior e não formação das células responsáveis pela produção do GH, prolactina e subunidade β do TSH, sem comprometimento do setor corticotrófico. Dessa forma, a ação dos microRNAs no desenvolvimento hipofisário estaria relacionada à repressão da função do fator de transcrição Pit-1 (ou POU1F1), responsável pela citodiferenciação das células pluripotentes na hipófise, podendo estar diretamente implicado no processo de tumorigênese, uma vez que a hipófise madura é hipocelular. No mesmo estudo, foi demonstrada a importância do mir-26b em modular negativamente a expressão do Lef-1, que atua reprimindo a expressão do Pit-1, e, conseqüentemente, levando à não diferenciação das linhagens celulares dependentes do Pit-1 (ZHANG, Zichao *et al.*, 2010). Em linhagem de células GH3 com deficiência na ação da GTP-ase (ativação constitutiva do AMPc) houve estímulo para expressão do gene Pit-1. Assim, em adenomas gsp+ poderíamos encontrar, teoricamente, hiperexpressão do pit-1, o que contribuiria para o processo tumoral (GAIDDON *et al.*, 1996). Porém, em adenomas humanos produtores de GH e/ou PRL, após dividir o grupo entre gsp+ e gsp-, não foi encontrada diferença significativa nos níveis de RNAm do *Pit-1* e do $G_s\alpha$ entre os dois grupos (BARLIER *et al.*, 1999).

No presente estudo, avaliamos um painel de microRNAs (*Let7a*, *miR-16a*, *miR-21*, *miR-141*, *miR-143*, *miR-15a*, *miR-145*, *miR-23a*, *miR-23b* e *miR-24-2*) em somatotrofinomas esporádicos. Neste trabalho, os microRNAs *Let7a*, *miR-15a*, *miR-143*, *miR-145*, *miR-23a* e o *miR-23b* e o *miR-24-2* não apresentaram expressão diferencial entre as amostras de tecido hipofisário tumoral e de tecido hipofisário normal. *Let-7a*, segundo trabalhos em linhagens de câncer de pulmão, parece ter ação na regulação negativa do gene *RAS* (JOHNSON *et al.*, 2007). Uma possível

justificativa para a não diferença na expressão entre os somatotrofinomas e as amostras de hipófise normal pode ser explicada por estudos anteriores falharem em encontrar mutações no gene *RAS* em tumores hipofisários (KARGA *et al.*, 1992). Bottoni *et al.*, 2006, analisando tumores hipofisários de diferentes tipos, na maioria tumores hipofisários não funcionantes, encontraram hipoexpressão do *mir-let7a*. Ainda, em corticotrofinomas também foi observada hipoexpressão do *mir-let7a* (AMARAL *et al.*, 2009), sugerindo, mais uma vez, papel diferencial específico de microRNAs nas diferentes linhagens celulares da hipófise (BOTTONI *et al.*, 2006). Recentemente, foi evidenciada a relação entre oncogene HMGA2 e o *let-7* na tumorigênese hipofisária, na qual a hipoexpressão do *let-7* contribuiu para o aumento da expressão da proteína HMGA2, associadas à maior agressividade tumoral (METE; EZZAT; ASA, 2012).

Observamos hipoexpressão do *miR-16a* nas amostras de adenomas secretores de GH, reforçando a associação do *mir-16* com a tumorigênese hipofisária (AMARAL *et al.*, 2009; BOTTONI *et al.*, 2005). Os *miR-15a* e *miR-16-1* estão localizados no cromossomo 13q14, sendo uma região frequentemente deletada nos tumores hipofisários. Em adenomas hipofisários, *mir-16* possivelmente atuaria modulando a expressão do gene *BCL2*, um dos seus genes alvo, uma vez que hiperexpressão da oncoproteína do *BCL2* foi descrita em aproximadamente um terço dos adenomas hipofisários, sem imunomarcagem em hipófises normais (WANG *et al.*, 1996). Essa interação protegeria as células de apoptose e favoreceria a proliferação celular. Mecanismo de regulação negativa semelhante foi sugerido em portadores de leucemia linfóide crônica, em que, em 2/3 dos indivíduos, ocorre hipoexpressão de *miR-15a* e *miR-16-1* e hiperexpressão do *BCL2* (CIMMINO *et al.*, 2005).

Observamos também hipoexpressão do *miR-141* nas amostras de adenomas secretores de GH. Hipoexpressão de *miR-141* também foi descrita em corticotrofinomas (AMARAL *et al.*, 2009), sendo o grau de expressão inversamente relacionado à chance de cura pós-cirúrgica; sem estudos prévios de sua expressão em somatotrofinomas. Hipoexpressão de *miR-141* foi observada em diferentes linhagens tumorais, tais como próstata, fígado, rim e no câncer gástrico (DU *et al.*, 2009), em que atuaria como supressor tumoral regulando genes envolvidos no crescimento celular e invasão local do tumor. Já em linhagem de células de

carcinoma nasofaríngeo, como no próprio tecido tumoral, foi observado hiperexpressão do *mir-141*, o qual teria como potenciais alvos os genes *BRD3*, envolvido na regulação da via Rb/E2F, o gene *PTEN* e o *UBAP1* (ZHANG, Liming *et al.*, 2010). Assim, sua ação na regulação gênica, como oncomir ou supressor tumoral, pode ser tecido específico.

Encontramos hiperexpressão do *miR-21* nos somatotrofinomas quando comparamos as amostras de tecido hipofisários normais. Análise por *microarray* também demonstrou hiperexpressão do *mir-21* em uma variedade de tumores, entre eles mama, colon, pulmão, ovário e glioblastoma multiforme, sendo sua ação especulada como regulatória negativa sobre o *PDCD4* (*programmed cell death 4*) (SHI *et al.*, 2012; VOLINIA *et al.*, 2006). Ação regulatória negativa do *mir-21* sobre o *PDCD4* também foi descrita no câncer de mama, em que, juntamente com o *mir-155*, encontra-se hiperexpresso (FRANKEL *et al.*, 2008). No hepatocarcinoma e no câncer coloretal, sua hiperexpressão associou-se à migração e invasão de células malignas, uma vez que teria como alvo a inibição do gene supressor tumoral *PTEN* (MIRNEZAMI *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2012).

A hiperexpressão do *mir-21* observada em nosso estudo, assim como em outras linhagens tumorais, levaria a uma maior atividade proliferativa, também para as células hipofisárias, uma vez que o *miR-21* atua como um “oncomir” regulando negativamente genes supressores tumorais (NEGRINI; NICOLOSO; CALIN, 2009). Adicionalmente, observamos hiperexpressão aberrante do *miR-21* nos somatotrofinomas em contraste com dados prévios do nosso grupo, em corticotrofinomas, nos quais foi demonstrado hipoexpressão do *mir-21* (AMARAL *et al.*, 2009). Como já discutido, a ação dos microRNAs na regulação gênica pode ser tecido específica. Nossos dados em somatotrofinomas estão de acordo com achados em carcinomas de laringe e cultura de células da mesma linhagem tumoral, em que se demonstrou hiperexpressão de maneira consistente sugerindo sua ação como oncomir (LIU *et al.*, 2009). No mesmo estudo, em cultura de células, a supressão do *miR-21* foi acompanhada de repressão do crescimento celular, sem aumento da apoptose. Na neoplasia de laringe, os autores também avaliaram a expressão do *BTG2*, o qual encontrava-se hipoexpresso (LIU *et al.*, 2009). Esse achado é semelhante ao por nós observado em somatotrofinomas esporádicos com hiperexpressão de *miR-21* e hipoexpressão de *BTG2*. Desde que a perda do

controle do ciclo celular parece ser um dos mecanismos clássicos de tumorigênese, novas evidências vêm atribuindo aos microRNAs ação importante nos genes que regulam o ciclo celular (COPPOLA *et al.*, 2012), hipotetizamos que o mecanismo do miR-21 na tumorigênese hipofisária seria via regulação do *BTG2*.

Utilizando as plataformas de bioinformática (Mirmap: www.mirmap.mbc.nctu.edu.tw) confirmamos *in silico* que *miR-21* apresenta como gene alvo o *BTG2*. Portanto, nossos dados sugerem que a hiperexpressão de miR-21 atuaria de forma direta, regulando negativamente em nível pós-transcricional o *BTG2* por ligação na sua região 3'UTR (LIU *et al.*, 2009), embora outros mecanismos não possam ser excluídos. Esses estudos precisam de validação por estudos funcionais. Ainda, a identificação de *BTG2* como gene alvo do *miR-21* em somatotrofinoma fornece uma potencial ferramenta terapêutica, uma vez que a indução de supressão do *miR-21* poderia inibir o crescimento tumoral por influenciar diretamente o ciclo celular, restabelecendo os níveis de expressão do *BTG2* (MIRNEZAMI *et al.*, 2009). Em cultura de células de câncer de laringe, utilizando-se citometria de fluxo e ensaios para medida de apoptose, a supressão da expressão do *mir-21* levou à diminuição da proliferação celular, confirmando sua ação como oncomir na regulação do ciclo celular (LIU *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2008).

Na tentativa de observar diferenças na expressão desse painel de microRNAs em tumores com a mutação no oncogene *gsp+*, subdividimos as amostras de adenomas secretores de GH em dois subgrupos, com e sem mutação. Não encontramos diferença na expressão dos microRNAs *Let7a*, *miR-16a*, *miR-21*, *miR-141*, *miR-143*, *miR-15a*, *miR-23a* e *miR-24-2* entre adenomas secretores de GH com e sem mutação no gene *GNAS*. Todavia, encontramos hipoexpressão do *miR-23b* e do *miR-145* em somatotrofinomas *gsp+*.

Esse é o primeiro estudo que demonstra expressão diferencial de microRNAs no subgrupo de tumores secretores de GH com mutação no gene *GNAS*. Estudos funcionais de regulação do gene *GNAS* por microRNAs específicos serão fundamentais para estabelecer a importância da função desses na tumorigênese hipofisária. Estudo de expressão *miR-23b* em células de carcinoma renal demonstrou que sua hipoexpressão foi relacionada a um melhor prognóstico, uma vez que sobrevida em 5 anos foi observada em 50% dos indivíduos em que

ocorreu hiperexpressão *miR-23b* (ZAMAN *et al.*, 2012). A hipoexpressão do miR-23b em células de carcinomas renais estaria relacionada à regulação positiva do gene *PTEN* supressor tumoral, levando à indução de apoptose e redução de invasibilidade tumoral (ZAMAN *et al.*, 2012). Em câncer colorretal a hipoexpressão do *miR-23b* foi mais pronunciada em pacientes livres de metástases, a qual estaria regulando a expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização ERK, JNK, NF- κ B, PI3K/AKT/mTOR, TGF- β , relacionadas à proliferação, diferenciação celular e apoptose (ZHANG *et al.*, 2011). Estudos em tumores hipofisários observou-se hiperexpressão mais pronunciada do miR-23b em tumores produtores de GH e PRL, quando comparados aos produtores de ACTH e os não funcionantes, atribuindo-se uma função de marcador histológico para os microRNAs (BOTTONI *et al.*, 2007). Assim, a menor expressão do *miR-23b* em somatotrofinomas gsp+ poderia contribuir para um fenótipo menos agressivo e com melhor resposta às terapêuticas instituídas, como relatado em aqui e em outras séries, uma vez que a sua hipoexpressão favoreceria a regulação positiva do *PTEN*, como observado em outras linhagens de células neoplásicas citadas acima.

Adicionalmente, o *miR-145* apresenta importante ação no processo de diferenciação e crescimento de células embrionárias pluripotentes, uma vez que tem como alvo a região 3'UTR dos genes *OCT4* (*octamer-binding transcription factor 4*), *SOX2* (*SRY (sex determining region Y)-box 2*) e *KLF4* (*Kruppel-like factor 4*), atuando como repressor desses genes (XU *et al.*, 2009). Estudos prévios demonstraram que a redução da expressão do *miR-145* resulta em ativação de seus possíveis alvos oncogênicos, tais como *MYC*, *K-RAS*, *FOS*, *YES*, *MAPK3K3* e *MAPK4K4*, genes que estão envolvidos com aumento da proliferação celular e consequente envolvimento na tumorigenese hipofisária e em outros tecidos tumorais (BOTTONI *et al.*, 2007; BUTZ *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2012).

Esta característica do *miR-145* em ser um mediador do silenciamento gênico pode abrir perspectivas para a sua utilização como biomarcador de vários tipos de neoplasias e um potencial alvo terapêutico (KIM; HAN; SIOMI, 2009). Assim, a desregulação na expressão do *miR-145* e do *miR-23b* poderia potencialmente contribuir para os diferentes graus de invasão, migração e crescimento celular nos adenomas hipofisários, como tem sido sugerido em outras linhagens tumorais.

Nossos dados são os primeiros na literatura a comparar a expressão de um painel de microRNAs entre somatotrofinoma gsp+ e gsp-. Uma vez que trabalhos anteriores demonstraram que a ativação da via do AMPc poderia ocorrer de maneira semelhante entre somatotrofinoma, independente da presença do oncogene gsp promovendo proliferação celular, os diferentes graus de expressão dos microRNAs, por nós observados nos portadores da mutação, podem ajudar no entendimento dos mecanismos celulares capazes de modular a presença da ativação constitutiva da via do AMPc, sabidamente uma via indutora de mitose para as células hipofisárias.

Considerações Finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prevalência da mutação no *GNAS* em tumores hipofisários secretores de GH supostamente esporádicos foi de 35%, sendo as mutações no codon 201 mais frequentes do que as do codon 227. A presença de mutação do *AIP* foi rara neste tipo tumoral.

Não encontramos diferenças fenóticas claras entre somatotrofinomas com mutação no *GNAS* e nos não mutados. Os portadores de tumores *gsp+* apresentaram maior percentual de resposta aos análogos da somatostatina isolados ou em combinação, porém devido ao tamanho da amostra, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos *gsp+* e *gsp-*. Assim, estudo multicêntrico, envolvendo uma casuística maior se torna necessário.

Somatotrofinomas *gsp+* seriam do tipo densamente granular, subtipo que apresenta células parecidas com as originais não tumorais, conservando seus sinais hormonais. A melhor resposta dos somatotrofos *gsp+* se daria, possivelmente, por uma via independente da expressão do *SSTR2* nas células tumorais. Vários mecanismos celulares podem atuar compensando a atividade constitutivamente aumentada do AMPc nos somatotrofinomas *gsp+*, como: regulação na expressão do RNAm do gene $G_s\alpha$ pela proteína mutada e aumento da atividade da fosfodiesterase com maior especificidade para o AMPc como as PDE4C e PDE4D.

A expressão diminuída do *BTG2* em somatotrofinomas reforça sua ação como gene supressor tumoral, também nesta linhagem celular, e sua hipoexpressão mais pronunciada nos portadores de somatotrofinomas *gsp-* pode, à princípio, contribuir para o achado de uma atividade proliferativa maior neste subtipo tumoral, o que dificultaria a resposta a terapêutica medicamentosa, uma vez que este subtipo é associado a menores taxas de controle, como observado aqui e em outras séries. No presente estudo identificamos em somatotrofinomas hipoexpressão de *BTG2* e hiperexpressão do miR-21, sendo demonstrado *in silico* a regulação do *BTG2* pelo miR-21 fornecendo uma potencial ferramenta terapêutica, uma vez que a indução de supressão do miR-21 poderia inibir o crescimento tumoral, por restabelecer os níveis de expressão do *BTG2*, o qual exerce ação na regulação do ciclo celular.

Confirmamos a importância da desregulação das expressões do mir-16 e do mir-141 também nos somatotrofinomas esporádicos, reforçando a associação desses microRNAs com a tumorigênese hipofisária.

A hipoexpressão de miR-145 em somatotrofinomas gsp+ pode atuar ativando seus alvos oncogênicos (MYC, K-RAS, MAPKK3 e MAPK4) envolvidos com aumento da proliferação celular e consequente potencial tumorigênico. Em tumores de outras linhagens celulares, a hipoexpressão do miR-23b é relacionado à regulação positiva do gene *PTEN* supressor tumoral, levando à indução de apoptose e redução de invasibilidade tumoral podendo, dessa forma, contribuir com o fenótipo, observado neste estudo, de melhor resposta à terapêutica medicamentosa no grupo gsp+ em que o miR-23b foi mais hipoexpresso.

Associado ao fato de ser possível classificar histologicamente os adenomas hipofisários, a depender do grau de expressão de um painel de microRNAs, e que tumores de uma mesma linhagem apresentam expressão semelhante a determinados microRNAs (GH/PRL), somos levados a hipotetizar que os microRNAs teriam potencial envolvimento nos primórdios de diferenciação das células pluripotentes hipofisária, contribuindo, dessa forma, para a expansão clonal observada. Assim, o estudo da expressão dos microRNA pode vir a ser a uma ferramenta útil para diferenciação histopatológica dos tumores hipofisários, e um preditor de resposta às terapêuticas instituídas, como já ocorre em outros tipos tumorais.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Na presente série de somatotrofinomas, assumidos como esporádicos, a frequência de mutações nos genes *GNAS* (35%) e *AIP* (3,8%) foram semelhantes aos relatados na literatura. Não houve diferenças nas características clínicas e bioquímicas, agressividade, resposta às terapêuticas, e na expressão diferencial do *GNAS* entre os pacientes com tumores *gsp+* e *gsp-*. Hipoexpressão de *BTG2* (gene supressor tumoral relacionado às vias de sinalização do p53 e do Rb), baixa expressão de miRNAs (supressores tumorais) e alta expressão de oncomirs em somatotrofinomas sugerem um papel desses na tumorigênese somatotrófica.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABS, R. et al. Cabergoline in the treatment of acromegaly: a study in 64 patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, n. 2, p. 374-378, 1998.
- ADAMS, E. et al. Biochemical characteristics of human pituitary somatotropinomas with and without gsp mutations: in vitro cell culture studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 80, n. 7, p. 2077-2081, 1995.
- ALVARO, V. et al. Invasive human pituitary tumors express a point-mutated alpha-protein kinase-C. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 77, n. 5, p. 1125-1129, 1993.
- AMARAL, F. C. et al. MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 94, n. 1, p. 320-323, 2009.
- AQEILAN, R. I.; CALIN, G. A.; CROCE, C. M. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. **Cell Death Differ.**, v. 17, n. 2, p. 215-220, 2010.
- ASA, S. L.; EZZAT, S. The pathogenesis of pituitary tumors. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 4, p. 97-126, 2009.
- ASA, S. L. et al. A case for hypothalamic acromegaly: a clinicopathological study of six patients with hypothalamic gangliocytomas producing growth hormone-releasing factor. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 58, n. 5, p. 796-803, 1984.
- ATTANASIO, R. et al. Gamma-Knife Radiosurgery in Acromegaly: A 4-Year Follow-Up Study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, n. 7, p. 3105-3112, 2003
- BALLARE, E. et al. Activating mutations of the Gs alpha gene are associated with low levels of Gs alpha protein in growth hormone-secreting tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, n. 12, p. 4386-4390, 1998.
- BALLARE, E. et al. Mutation of somatostatin receptor type 5 in an acromegalic patient resistant to somatostatin analog treatment. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 8, p. 3809-3814, 2001.
- BARKAN, A. et al. Management of acromegaly in Latin America: expert panel recommendations. **Pituitary**, v. 13, n. 2, p. 168-175, 2010.
- BARLIER, A. et al. Pronostic and therapeutic consequences of Gs alpha mutations in somatotroph adenomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, n. 5, p. 1604-1610, 1998.
- BARLIER, A. et al. Impact of gsp oncogene on the expression of genes coding for Gsalpha, Pit-1, Gi2alpha, and somatostatin receptor 2 in human somatotroph adenomas: involvement in octreotide sensitivity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, n. 8, p. 2759-2765, 1999.

BARLIER, A. et al. Mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene are not highly prevalent among subjects with sporadic pituitary adenomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 92, n. 5, p. 1952-1955, 2007.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, Jan. 2004.

BECKERS, A. et al. Familial Isolated Pituitary Adenomas (FIPA) and the Pituitary Adenoma Predisposition due to Mutations in the Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein (AIP) Gene. **Endocr. Rev.**, v. 34, n. 2, p. 239-277, 2013.

BECKERS, A.; ROSTOMYAN, L.; DALY, A. F. Overview of genetic testing in patients with pituitary adenomas. **Ann. Endocrinol.**, v. 73, n. 2, p. 62-64, 2012.

BEN-SHLOMO, A.; MELMED, S. Pituitary somatostatin receptor signaling. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 21, n. 3, p. 123-133, 2010.

BEN-SHLOMO, A. et al. Clinical, quality of life, and economic value of acromegaly disease control. **Pituitary**, v. 14, n. 3, p. 284-294, 2011.

BERTHERAT, J.; CHANSON, P.; MONTMINY, M. The cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive factor CREB is constitutively activated in human somatotroph adenomas. **Mol. Endocrinol.**, v. 9, n. 7, p. 777-783, 1995.

BHAYANA, S. et al. The implication of somatotroph adenoma phenotype to somatostatin analog responsiveness in acromegaly. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, n. 11, p. 6290-6295, 2005

BOIKO, A. D. et al. A systematic search for downstream mediators of tumor suppressor function of p53 reveals a major role of BTG2 in suppression of Ras-induced transformation. **Genes Dev.**, v. 20, n. 2, p. 236-252, 2006.

BOIKOS, S. A.; STRATAKIS, C. A. Molecular genetics of the cAMP-dependent protein kinase pathway and of sporadic pituitary tumorigenesis. **Hum. Mol. Genet.**, v. 16, n. spec. 1, p. R80-87, 2007.

BONCI, D. et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. **Nat. Med.**, v. 14, n. 11, p. 1271-1277, 2008.

BOS, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res.**, v. 49, n. 17, p. 4682-4689, 1989.

BOTTONI, A. et al. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. **J. Cell Physiol.**, v. 204, n. 1, p. 280-285, 2005.

BOTTONI, A. et al. Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. **J. Cell. Physiol.**, v. 210, n. 2, p. 370-377, 2007.

BUCHFELDER, M. et al. Clinical correlates in acromegalic patients with pituitary tumors expressing GSP oncogenes. **Pituitary**, v. 1, n. 3/4, p. 181-185, 1999.

BUHK, J. H. et al. Tumor volume of growth hormone-secreting pituitary adenomas during treatment with pegvisomant: a prospective multicenter study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, n. 2, p. 552-558, 2010.

BUTZ, H. et al. MicroRNA profile indicates downregulation of the TGFbeta pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. **Pituitary**, v. 14, n. 2, p. 112-124, 2011.

CAI, W. Y. et al. ras mutations in human prolactinomas and pituitary carcinomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 78, n. 1, p. 89-93, 1994

CALENDER, A. [Multiple endocrine neoplasia: genetic aspects]. **Bull. Acad. Natl. Med.**, v. 194, n. 1, p. 81-95, 2010.

CALIN, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, n. 24, p. 15524-15529, 2002.

CALLENDER, G. G.; RICH, T. A.; PERRIER, N. D. Multiple endocrine neoplasia syndromes. **Surg. Clin. N. Am.**, v. 88, n. 4, p. 863-895, 2008.

CAZABAT, L. et al. Germline AIP Mutations in Apparently Sporadic Pituitary Adenomas: Prevalence in a Prospective Single-Center Cohort of 443 Patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 97, n. 4, p. E663-E670, 2012

CAZABAT, L. et al. Mutations of the gene for the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in pituitary adenomas. **Horm. Res.**, v. 71, n. 3, p. 132-141, 2009.

CHAHAL, H. S. et al. Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA). **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 21, n. 7, p. 419-427, 2010.

CHAHAL, H. S. et al. Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA). **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 21, n. 7, p. 419-427, 2010.

CHAHAL, H. S. et al. Somatostatin analogs modulate AIP in somatotroph adenomas: the role of the ZAC1 pathway. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 97, n. 8, p. E1411-E1420, 2012.

CHANSON, P.; SALENAVE, S. Acromegaly. **Orphanet J. Rare Dis.**, v. 3, n. 1, p. 17, 2008.

CIMMINO, A. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, n. 39, p. 13944-13949, 2005.

COLAO, A. et al. Gender-and age-related differences in the endocrine parameters of acromegaly. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 25, n. 6, p. 532-538, 2002.

COLAO, A. et al. Partial surgical removal of growth hormone-secreting pituitary tumors enhances the response to somatostatin analogs in acromegaly. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 1, p. 85-92, 2006.

COPPOLA, V. et al. BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial-mesenchymal transition. **Oncogene**, v. 21, n. 10, p. 194, 2012.

COZZI, R. et al. Cabergoline addition to depot somatostatin analogues in resistant acromegalic patients: efficacy and lack of predictive value of prolactin status. **Clin. Endocrinol.**, v. 61, n. 2, p. 209-215, 2004.

DALY, A. F. et al. Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 9, p. 3316-3323, 2006.

DALY, A. F. et al. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 12, p. 4769-4775, 2006.

DALY, A. F. et al. Clinical characteristics and therapeutic responses in patients with germ-line AIP mutations and pituitary adenomas: an international collaborative study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, n. 11, p. E373-383, 2010.

DALY, A. F. et al. Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 92, n. 5, p. 1891-1896, 2007.

DE LIMA, D. S. et al. SAGE analysis highlights the putative role of underexpression of ribosomal proteins in GH-secreting pituitary adenomas. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 167, n. 6, p. 759-768, 2012.

DIAZ, A.; DANON, M.; CRAWFORD, J. McCune-Albright syndrome and disorders due to activating mutations of GNAS1. **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.**, v. 20, n. 8, p. 853-880, 2007.

DONANGELO, I.; GADELHA, M. [Molecular basis of pituitary adenomas with emphasis on somatotropinomas]. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 48, n. 4, p. 464-479, 2004.

DONATO, L. J.; SUH, J. H.; NOY, N. Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling. **Cancer Res.**, v. 67, n. 2, p. 609-615, 2007.

DU, Y. et al. Down-regulation of miR-141 in gastric cancer and its involvement in cell growth. **J. Gastroenterol.**, v. 44, n. 6, p. 556-561, 2009.

ELIAS, P. et al. Discordant nadir GH after oral glucose and IGF-I levels on treated acromegaly: refining the biochemical markers of mild disease activity. **Hormone Metab. Res.**, v. 42, n. 1, p. 50-55, 2009.

FAGLIA, G.; AROSIO, M.; BAZZONI, N. Ectopic acromegaly. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 21, n. 3, p. 575, 1992.

FAGLIA, G.; AROSIO, M.; SPADA, A. Gs protein mutations and pituitary tumors: Functional correlates and possible therapeutic implications. **Metabolism**, v. 45, p. 117-119, 1996.

FARIOLI-VECCHIOLI, S. et al. Inhibition of medulloblastoma tumorigenesis by the antiproliferative and pro-differentiative gene PC3. **FASEB J.**, v. 21, n. 9, p. 2215-2225, 2007.

FEELDERS, R. A. et al. Medical therapy of acromegaly: efficacy and safety of somatostatin analogues. **Drugs**, v. 69, n. 16, p. 2207-2226, 2009.

FERONE, D. et al. Correlation of in vitro and in vivo somatotropic adenoma responsiveness to somatostatin analogs and dopamine agonists with immunohistochemical evaluation of somatostatin and dopamine receptors and electron microscopy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 93, n. 4, p. 1412-1417, 2008.

FOUGNER, S. L. et al. The clinical response to somatostatin analogues in acromegaly correlates to the somatostatin receptor subtype 2a protein expression of the adenoma. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, v. 68, n. 3, p. 458-465, Mar. 2008.

FOUGNER, S. L. et al. Adenoma granulation pattern correlates with clinical variables and effect of somatostatin analogue treatment in a large series of patients with acromegaly. **Clin. Endocrinol.**, v. 76, n. 1, p. 96-102, 2012.

FRANKEL, L. B. et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 2, p. 1026-1033, 2008.

FREDA, P. U. et al. Analysis of GNAS mutations in 60 growth hormone secreting pituitary tumors: correlation with clinical and pathological characteristics and surgical outcome based on highly sensitive GH and IGF-I criteria for remission. **Pituitary**, v. 10, n. 3, p. 275-282, 2007.

FU, M. et al. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5439-5447, 2004.

GADELHA, M. R.; KASUKI, L.; KORBONITS, M. Novel pathway for somatostatin analogs in patients with acromegaly. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 25, n. 12, p. 00217-2, 2012.

GAIDDON, C. et al. Constitutively active G (S) alpha-subunits stimulate Pit-1 promoter activity via a protein kinase A-mediated pathway acting through deoxyribonucleic acid binding sites both for Pit-1 and for adenosine

3', 5'-monophosphate response element-binding protein. **Endocrinology**, v. 137, n. 4, p. 1286-1291, 1996.

GEJMAN, R.; SWEARINGEN, B.; HEDLEY-WHYTE, E. T. Role of Ki-67 proliferation index and p53 expression in predicting progression of pituitary adenomas. **Hum. Pathol.**, v. 39, n. 5, p. 758-766, 2008.

GEORGITSI, M. MEN-4 and other multiple endocrine neoplasias due to cyclin-dependent kinase inhibitors (p27^{Kip1} and p18^{INK4C}) mutations. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 24, n. 3, p. 425-437, 2010.

GEORGITSI, M. et al. Germline CDKN1B/p27Kip1 mutation in multiple endocrine neoplasia. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 92, n. 8, p. 3321-3325, 2007.

GIUSTINA, A. et al. Criteria for cure of acromegaly: a consensus statement. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, n. 2, p. 526-529, 2000.

GIUSTINA, A. et al. A consensus on criteria for cure of acromegaly. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, n. 7, p. 3141-3148, 2010.

GOLA, M. et al. Neuroendocrine tumors secreting growth hormone-releasing hormone: Pathophysiological and clinical aspects. **Pituitary**, v. 9, n. 3, p. 221-229, 2006.

HAYWARD, B. E. et al. Imprinting of the G(s)alpha gene GNAS1 in the pathogenesis of acromegaly. **J. Clin. Invest.**, v. 107, n. 6, p. R31-36, 2001.

HERMAN, V. et al. Molecular screening of pituitary adenomas for gene mutations and rearrangements. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 77, n. 1, p. 50-55, 1993.

HERMAN, V. et al. Clonal origin of pituitary adenomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 71, n. 6, p. 1427-1433, 1990.

HIBBERTS, N. A. et al. Analysis of cyclin D1 (CCND1) allelic imbalance and overexpression in sporadic human pituitary tumors. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, n. 8, p. 2133-2139, 1999.

HOLDAWAY, I.; RAJASOORYA, C. Epidemiology of acromegaly. **Pituitary**, v. 2, n. 1, p. 29-41, 1999.

HOLDAWAY, I. M.; RAJASOORYA, R. C.; GAMBLE, G. D. Factors influencing mortality in acromegaly. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 2, p. 667-674, 2004.

IRONSIDE, J. W. Best Practice No 172: pituitary gland pathology. **J. Clin. Pathol.**, v. 56, n. 8, p. 561-568, 2003.

JAFFRAIN-REA, M.-L.; ROTONDI, S.; ALESSE, E. New Insights in the Pathogenesis of Pituitary Tumours. In: FEDELE, M. (Ed.). **Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases**. 2013. Disponível em:<
<http://www.intechopen.com/books/hot-topics-in-endocrine-and-endocrine-related->

diseases/new-insights-in-the-pathogenesis-of-pituitary-tumours>. Acesso em: 2 Dec. 2013.

JALLAD, R. S. et al. Treatment of acromegaly with octreotide-LAR: extensive experience in a Brazilian institution. **Clin. Endocrinol.**, v. 63, n. 2, p. 168-175, 2005.

JANE JR, J. A. et al. Endoscopic transsphenoidal surgery for acromegaly: remission using modern criteria, complications, and predictors of outcome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 96, n. 9, p. 2732-2740, 2011.

JAQUET, P. et al. Human somatostatin receptor subtypes in acromegaly: distinct patterns of messenger ribonucleic acid expression and hormone suppression identify different tumoral phenotypes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, n. 2, p. 781-792, 2000.

JIANG, Z.; GUI, S.; ZHANG, Y. Analysis of differential gene expression by bead-based fiber-optic array in growth-hormone-secreting pituitary adenomas. **Exp. Therap. Med.**, v. 1, n. 5, p. 905, 2010.

JOHNSON, C. D. et al. The let-7 MicroRNA Represses Cell Proliferation Pathways in Human Cells. **Cancer Res.**, v. 67, n. 16, p. 7713-7722, 2007.

JOHNSON, M. C. et al. Gps mutations in Chilean patients harboring growth hormone-secreting pituitary tumors. **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.**, v. 12, n. 3, p. 381-387, 1999.

KARGA, H. J. et al. Ras mutations in human pituitary tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 74, n. 4, p. 914-919, 1992.

KARHU, A.; AALTONEN, L. A. Susceptibility to pituitary neoplasia related to MEN-1, CDKN1B and AIP mutations: an update. **Hum. Mol. Genet.**, v. 16, n. spec. 1, p. R73-79, 2007.

KASUKI JOMORI DE PINHO, L. et al. Low aryl hydrocarbon receptor-interacting protein expression is a better marker of invasiveness in somatotropinomas than Ki-67 and p53. **Neuroendocrinology**, v. 94, n. 1, p. 39-48, 2011.

KASUKI, L. et al. Resistance to octreotide LAR in acromegalic patients with high SSTR2 expression: analysis of AIP expression. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 56, p. 501-506, 2012.

KIM, H. J. et al. Prevalence of Gs alpha mutations in Korean patients with pituitary adenomas. **J. Endocrinol.**, v. 168, n. 2, p. 221-226, 2001.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 10, n. 2, p. 126-139, 2009.

KNUDSON, A. G. Hereditary cancer: two hits revisited. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 122, n. 3, p. 135-140, 1996.

KORBONITS, M.; STORR, H.; KUMAR, A. V. Familial pituitary adenomas—who should be tested for AIP mutations? **Clin. Endocrinol.**, v. 77, n. 3, p. 351-356, 2012.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nat. Rev. Genet.**, v. 11, n. 9, p. 597-610, 2010.

LANDIS, C. A. et al. Clinical characteristics of acromegalic patients whose pituitary tumors contain mutant Gs protein. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 71, n. 6, p. 1416-1420, 1990.

LANDIS, C. A. et al. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. **Nature**, v. 340, n. 6236, p. 692-696, 1989.

LANIA, A. et al. Effects of hypothalamic neuropeptides on extracellular signal-regulated kinase (ERK1 and ERK2) cascade in human tumoral pituitary cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, n. 4, p. 1692-1696, 2003.

LANIA, A.; MANTOVANI, G.; SPADA, A. Genetics of pituitary tumors: focus on G-protein mutations. **Exp. Biol. Med.**, v. 228, n. 9, p. 1004-1017, 2003.

LANIA, A. et al. Constitutively active Gs alpha is associated with an increased phosphodiesterase activity in human growth hormone-secreting adenomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, n. 5, p. 1624-1628, May 1998.

LANIA, A.; SPADA, A. G-protein and signalling in pituitary tumours. **Horm. Res. Paediatr.**, v. 71, Suppl. 2, p. 95-100, 2009.

LANIA, A. G. et al. Evolution of an aggressive prolactinoma into a growth hormone secreting pituitary tumor coincident with GNAS gene mutation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, n. 1, p. 13-17, 2010.

LARKIN, S. J. et al. Granulation pattern, but not GSP or GHR mutation is associated with clinical characteristics in somatostatin naive patients with somatotroph adenomas. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 168, p. 491-499, 2013.

LARSSON, C. et al. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. **Nature**, v. 332, p. 85 - 87, 1988.

LEI, T. et al. Relationship between protein kinase C and adenylyl cyclase activity in the regulation of growth hormone secretion by human pituitary somatotrophinomas. **Neurosurgery**, v. 39, n. 3, p. 569-576, 1996.

LEVY, A. Is monoclonality in pituitary adenomas synonymous with neoplasia? **Clin. Endocrinol.**, v. 52, n. 4, p. 393-397, 2000.

LIDHAR, K. et al. Low expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, n. 10, p. 3823-3830, 1999.

LIM, I. K. TIS21/BTG2/PC3 as a link between ageing and cancer: cell cycle regulator and endogenous cell death molecule. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 132, n. 7, p. 417-426, 2006.

LIU, M. et al. Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma. **Cell Res.**, v. 19, n. 7, p. 828-837, 2009.

LU, Z. et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. **Oncogene**, v. 27, n. 31, p. 4373-4379, 2008.

LÜDECKE, D. K.; ABE, T. Transsphenoidal microsurgery for newly diagnosed acromegaly: a personal view after more than 1,000 operations. **Neuroendocrinology**, v. 83, n. 3-4, p. 230-239, 2006.

LYONS, J. et al. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. **Science**, v. 249, n. 4969, p. 655-659, 1990.

MACHADO, E. O. et al. Prevalence of discordant GH and IGF-I levels in acromegalics at diagnosis, after surgical treatment and during treatment with octreotide LAR. **Growth Horm. IGF Res.**, v. 18, n. 5, p. 389-393, 2008.

MANTOVANI, G. et al. The galpha gene: predominant maternal origin of transcription in human thyroid gland and gonads. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 10, p. 4736-4740, 2002.

MANTOVANI, G. et al. Parental origin of Galpha mutations in the McCune-Albright syndrome and in isolated endocrine tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 6, p. 3007-3009, Jun. 2004.

MANTOVANI, G. et al. Biallelic expression of the Galpha gene in human bone and adipose tissue. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 12, p. 6316-6319, Dec. 2004.

MANTOVANI, G.; LANIA, A. G.; SPADA, A. GNAS imprinting and pituitary tumors. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 326, n. 1/2, p. 15-18, Sept. 2010.

MANTOVANI, G. et al. Mutational analysis of GNAS1 in patients with pseudohypoparathyroidism: identification of two novel mutations. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, n. 11, p. 4243-4248, Nov. 2000.

MARAZUELA, M. et al. Long-term treatment of acromegalic patients resistant to somatostatin analogues with the GH receptor antagonist pegvisomant: its efficacy in relation to gender and previous radiotherapy. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 160, n. 4, p. 535-542, 2009.

MCCABE, C. J. et al. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 9, p. 4238-4244, 2002.

MCCABE, C. J. et al. Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, v. 58, n. 2, p. 141-150, 2003.

MELMED, S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 11, p. 1603-1618, 2003.

MELMED, S. Acromegaly pathogenesis and treatment. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 11, p. 3189-3202, 2009.

MELMED, S. **The Pituitary (Third edition)**. [S.l.]: Elsevier, 2010.

MELMED, S. et al. Acromegaly due to secretion of growth hormone by an ectopic pancreatic islet-cell tumor. **N. Engl. J. Med.**, v. 312, n. 1, p. 9-17, 1985.

MENDOZA, V. et al. GSPalpha mutations in Mexican patients with acromegaly: potential impact on long term prognosis. **Growth Horm. IGF Res.**, v. 15, n. 1, p. 28-32, 2005

METE, O.; EZZAT, S.; ASA, S. L. Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 49, n. 2, p. R69-R78, 2012.

MIRNEZAMI, A. H. et al. MicroRNAs: key players in carcinogenesis and novel therapeutic targets. **Eur. J. Surg. Oncol.**, v. 35, n. 4, p. 339-347, Apr. 2009.

NAKABAYASHI, H.; SUNADA, I.; HARA, M. Immunohistochemical analyses of cell cycle-related proteins, apoptosis, and proliferation in pituitary adenomas. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 49, n. 9, p. 1193-1194, 2001.

NAKASHIMA, M.; TAKANO, K.; MATSUNO, A. Analyses of factors influencing the acute effect of octreotide in growth hormone-secreting adenomas. **Endocr. J.**, v. 56, n. 2, p. 295, 2009.

NEGRINI, M.; NICOLOSO, M. S.; CALIN, G. A. MicroRNAs and cancer—new paradigms in molecular oncology. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 21, n. 3, p. 470-479, 2009.

PARKINSON, C.; RYDER, W. D. J.; TRAINER, P. J. The relationship between serum GH and serum IGF-I in acromegaly is gender-specific. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 11, p. 5240-5244, 2001.

PEI, L.; MELMED, S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). **Mol. Endocrinol.**, v. 11, n. 4, p. 433-441, Apr. 1997.

PELLEGATA, N. S. et al. Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 42, p. 15558-15563, 2006.

PERSANI, L. et al. Relevant cAMP-specific phosphodiesterase isoforms in human pituitary: effect of Gs(alpha) mutations. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 8, p. 3795-3800, 2001.

PETERSENN, S. et al. Results of surgical and somatostatin analog therapies and their combination in acromegaly: a retrospective analysis of the German Acromegaly Register. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 159, n. 5, p. 525-532, 2008.

PETROSSIANS, P. et al. Gross total resection or debulking of pituitary adenomas improves hormonal control of acromegaly by somatostatin analogs. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 152, n. 1, p. 61-66, 2005.

PIECHA, G.; CHUDEK, J.; WIĘCEK, A. Multiple endocrine neoplasia type 1. **Eur. J. Int. Med.**, v. 19, n. 2, p. 99-103, 2008. .

RAITILA, A. et al. No evidence of somatic aryl hydrocarbon receptor interacting protein mutations in sporadic endocrine neoplasia. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 14, n. 3, p. 901-906, 2007.

REID, T. J. et al. Features at diagnosis of 324 patients with acromegaly did not change from 1981 to 2006: acromegaly remains under-recognized and under-diagnosed. **Clin. Endocrinol.**, v. 72, n. 2, p. 203-208, 2010.

ROLSTON, J. D.; BLEVINS, L. S. Gamma Knife Radiosurgery for Acromegaly. **Int. J. Endocrinol.**, v. 2012, 2012.

ROUAULT, J.-P. et al. Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. **Nat. Genet.**, v. 14, n. 4, p. 482-486, 1996.

SAEGER, W. et al. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 156, n. 2, p. 203-216, 2007.

SALVATORI, R. et al. Absence of mutations in the growth hormone (GH)-releasing hormone receptor gene in GH-secreting pituitary adenomas. **Clin. Endocrinol.**, v. 54, n. 3, p. 301-307, 2001.

SANDRET, L.; MAISON, P.; CHANSON, P. Place of cabergoline in acromegaly: a meta-analysis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 96, n. 5, p. 1327-1335, 2011.

SHI, X. et al. MicroRNAs-based network: A novel therapeutic agent in pituitary adenoma. **Med. Hypotheses**, v. 78, n. 3, p. 380-384, 2012.

SHI, Y. et al. Detection of gsp oncogene in growth hormone-secreting pituitary adenomas and the study of clinical characteristics of acromegalic patients with gsp-positive pituitary tumors. **Chin Med. J.**, v. 111, n. 10, p. 891-894, 1998.

SHIMON, I. et al. Somatostatin receptor (SSTR) subtype-selective analogues differentially suppress in vitro growth hormone and prolactin in human pituitary

adenomas. Novel potential therapy for functional pituitary tumors. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 9, p. 2386, 1997.

STERGIOPOULOS, S. G. et al. Pituitary pathology in Carney complex patients. **Pituitary**, v. 7, n. 2, p. 73-82, 2004.

STRATAKIS, C. A. et al. The role of germline AIP, MEN1, PRKAR1A, CDKN1B and CDKN2C mutations in causing pituitary adenomas in a large cohort of children, adolescents, and patients with genetic syndromes. **Clin. Genet.**, v. 78, n. 5, p. 457-463, Nov. 2010.

TABOADA, G. F. et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 156, n. 1, p. 65-74, 2007.

TABOADA, G. F. et al. Prevalence of gsp oncogene in somatotropinomas and clinically non-functioning pituitary adenomas: our experience. **Pituitary**, v. 12, n. 3, p. 165-169, 2009.

TAKEI, M. et al. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor (SSTR) subtypes 2A and 5 in pituitary adenoma from acromegalic patients: good correlation with preoperative response to octreotide. **Endocr. Pathol.**, v. 18, n. 4, p. 208-216, 2007.

TAKINO, H. et al. Purine-binding factor (nm23) gene expression in pituitary tumors: marker of adenoma invasiveness. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 80, n. 5, p. 1733-1738, May 1995.

TICHOMIROWA, M. A.; DALY, A. F.; BECKERS, A. Familial pituitary adenomas. **J. Intern. Med.**, v. 266, n. 1, p. 5-18, Jul. 2009.

TICHOMIROWA, M. A. et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B) gene variants in AIP mutation-negative familial isolated pituitary adenoma kindreds. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 19, n. 3, p. 233-241, 2012.

TOLEDO, R. A. et al. Germline mutation in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene in familial somatotropinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 92, n. 5, p. 1934-1937, 2007.

TRIVELLIN, G. et al. MicroRNA miR-107 is overexpressed in pituitary adenomas and inhibits the expression of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in vitro. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 303, n. 6, p. E708-E719, 2012.

VAN DER LELY, A. et al. Long-term safety of pegvisomant in patients with acromegaly: comprehensive review of 1288 subjects in ACROSTUDY. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 97, n. 5, p. 1589-1597, 2012.

VANDEVA, S. et al. The genetics of pituitary adenomas. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 24, n. 3, p. 461-476, 2010.

VERGÈS, B. et al. Pituitary Disease in MEN Type 1 (MEN1): Data from the France-Belgium MEN1 Multicenter Study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 2, p. 457-465, 2002.

VIEIRA NETO, L. et al. Recomendações do Departamento de Neuroendocrinologia da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia para o diagnóstico e tratamento da acromegalia no Brasil. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 55, n. 2, p. 91-105, 2011.

VIEIRA NETO, L. et al. Acromegaly secondary to growth hormone-releasing hormone secreted by an incidentally discovered pheochromocytoma. **Endocr. Pathol.**, v. 18, n. 1, p. 46-52, 2007.

VIERIMAA, O. et al. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. **Science**, v. 312, n. 5777, p. 1228-1230, 2006.

VOLINIA, S. et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 7, p. 2257-2261, Feb. 2006.

WANG, D. et al. Expression of bcl-2 oncoprotein in pituitary tumours: comparison with c-myc. **J. Clin. Pathol.**, v. 49, n. 10, p. 795-797, 1996.

WEINSTEIN, L. S. et al. Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5459-5464, Dec. 2004.

WEISS, D. E. et al. Ectopic acromegaly due to a pancreatic neuroendocrine tumor producing growth hormone-releasing hormone. **Endocr. Pract.**, v. 17, n. 1, p. 79-84, Jan./Feb. 2011.

XU, N. et al. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 137, n. 4, p. 647-658, 2009.

YANG, I. et al. Characteristics of gsp-positive growth hormone-secreting pituitary tumors in Korean acromegalic patients. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 134, n. 6, p. 720-726, 1996.

YASUFUKU-TAKANO, J. et al. Does the prevalence of gsp mutations in GH-secreting pituitary adenomas differ geographically or racially? Prevalence of gsp mutations in Japanese patients revisited. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, v. 64, n. 1, p. 91-96, Jan. 2006.

ZAMAN, M. S. et al. Inhibition of PTEN Gene Expression by Oncogenic miR-23b-3p in Renal Cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50203, 2012.

ZHANG, H. et al. Genome-wide functional screening of miR-23b as a pleiotropic modulator suppressing cancer metastasis. **Nat. Commun.**, v. 2, p. 554, 2011.

ZHANG, L. et al. microRNA-141 is involved in a nasopharyngeal carcinoma-related genes network. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 4, p. 559-566, 2010.

ZHANG, L. et al. Impact of BTG2 expression on proliferation and invasion of gastric cancer cells in vitro. **Mol. Biol. Rep.**, v. 37, n. 6, p. 2579-2586, 2010.

ZHANG, X. et al. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). **Mol. Endocrinol.**, v. 13, n. 1, p. 156-166, Jan. 1999.

ZHANG, Z. et al. MicroRNAs Regulate Pituitary Development, and MicroRNA 26b Specifically Targets Lymphoid Enhancer Factor 1 (Lef-1), Which Modulates Pituitary Transcription Factor 1 (Pit-1) Expression. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 45, p. 34718-34728, 2010.

ZOU, H. et al. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. **Science**, v. 285, n. 5426, p. 418-422, 1999.

Apêndices

Tabela 1- Expressão relativa individual do gene *GNAS* em adenomas produtores de (GH) e tecido hipofisário normal (HN).

Amostra	Ct_{BTG2}		Ct_{mCE}		ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GH-1-310	23,8	± 0,01	24,2	± 0,32	-0,33	3,14	0,11
GH-2-311	22,7	± 0,49	22,5	± 0,01	0,26	3,73	0,08
GH-3-312/1394	23,6	± 0,09	23,9	± 0,11	-0,30	3,17	0,11
GH-4-313	22,0	± 0,35	22,9	± 0,18	-0,83	2,65	0,16
GH-5-314	19,7	± 0,10	24,2	± 0,25	-4,48	-1,01	2,01
GH-6-510/511	22,6	± 0,41	24,4	± 0,12	1,92	1,65	0,32
GH-7-512/513	22,7	± 0,83	24,1	± 0,11	1,40	2,07	0,24
GH-8-514	22,2	± 1,03	25,7	± 0,08	3,42	0,05	0,97
GH-9-515	22,7	± 0,43	22,8	± 0,15	-0,16	3,32	0,10
GH-10-518	20,5	± 0,44	22,9	± 0,87	-2,46	1,01	0,50
GH-11-519	22,8	± 0,28	22,7	± 0,10	0,11	3,59	0,08
GH-12-520	21,2	± 0,46	24,6	± 0,09	-3,41	0,06	0,96
GH-13-521	23,9	± 0,36	25,0	± 0,31	-1,15	2,32	0,20
GH-14-818	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-15-819	23,9	± 0,10	24,0	± 0,19	-0,39	3,08	0,12
GH-16-1397	23,2	± 1,11	23,7	± 0,11	-0,51	2,97	0,13
GH-17-1393	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-18-1402	23,7	± 0,80	23,1	± 0,33	0,56	2,03	0,06
GH-19-1400	22,6	± 0,32	23,9	± 0,01	-1,26	2,22	0,22
GH-20-1399	22,5	± 0,04	23,7	± 0,01	-1,19	2,28	0,21
GH-21-1396	23,2	± 0,21	24,0	± 0,19	-0,80	2,67	0,16
GH-22-1392	20,0	± 0,10	22,6	± 0,24	-2,55	0,92	0,53
GH-23-1401	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-24-516/517	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-25-1398	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-26-1391	22,4	± 0,14	23,1	± 0,07	-0,69	2,78	0,15
X ± SD					-0,61±1,75	2,13±1,27	0,35±0,46
Mínimo					-4,48	-1,01	0,06
Máximo					3,42	3,73	2,01
Mediana					-0,51	2,32	0,16
HN -1	18,1	± 0,07	22,5	± 0,27	-4,44	-0,97	1,96
HN -2	20,0	± 0,04	24,0	± 0,07	-3,96	-0,49	1,41
HN -3	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
HN -4	18,6	± 0,27	23,3	± 0,01	-4,65	1,17	2,26
HN -5	20,6	± 0,20	23,5	± 0,32	-2,98	0,49	0,71
HN -6	21,0	± 0,09	23,0	± 0,06	-2,08	1,40	0,38
HN -7	20,7	± 0,02	23,5	± 0,11	-2,73	0,75	0,60
X ± SD					-3,47±1,03	0,39±0,94	1,22±0,78
Mínimo					-4,65	-0,97	0,38
Máximo					-2,08	1,40	2,26
Mediana					-3,47	0,62	1,06

Tabela 2- Expressão relativa individual do gene *BTG2* em adenomas produtores de (GH) e tecido hipofisário normal (HN)

Amostra	Ct_{GNAS}		Ct_{mCE}		ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GH-1-310	16,3	± 0,03	24,2	± 0,32	-7,90	-0,10	1,05
GH-2-311	14,9	± 0,19	22,5	± 0,01	-7,60	0,20	0,87
GH-3-312/1394	15,7	± 0,08	23,9	± 0,11	-8,20	-0,40	1,33
GH-4-313	15,5	± 0,27	22,9	± 0,18	-7,40	0,50	0,73
GH-5-314	15,8	± 0,38	24,2	± 0,25	-8,40	-0,60	1,52
GH-6-510/511	18,4	± 0,13	24,4	± 0,12	-6,10	1,70	0,30
GH-7-512/513	16,3	± 0,30	24,1	± 0,11	-7,80	0,00	1,03
GH-8-514	16,7	± 0,12	25,7	± 0,08	-9,00	-1,20	2,29
GH-9-515	15,0	± 0,13	22,8	± 0,15	-7,90	-0,10	1,04
GH-10-518	15,8	± 0,68	22,9	± 0,87	-7,20	0,60	0,66
GH-11-519	15,6	± 0,06	22,7	± 0,10	-7,00	0,80	0,59
GH-12-520	16,7	± 0,52	24,6	± 0,09	-7,9	-0,10	1,06
GH-13-521	16,2	± 0,24	25,0	± 0,31	-8,80	-1,00	2,05
GH-14-818	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-15-819	16,3	± 0,32	24,0	± 0,19	-7,60	0,20	0,88
GH-16-1397	15,7	± 0,55	23,1	± 0,11	-8,00	-0,20	1,16
GH-17-1393	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-18-1402	15,7	± 0,72	23,1	± 0,33	-7,40	-7,40	0,77
GH-19-1400	ND	± ND	ND	± 0,01	ND	ND	ND
GH-20-1399	16,9	± 0,21	23,7	± 0,01	-6,80	-6,80	0,50
GH-21-1396	15,1	± 0,08	24,0	± 0,19	-8,90	-8,90	2,16
GH-22-1392	15,5	± 0,11	22,6	± 0,24	-7,00	-7,00	0,59
GH-23-1401	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-24-516/517	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-25-1398	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-26-1391	15,6	± 0,15	23,1	± 0,07	-7,50	-7,50	0,80
X ± SD					-7,70±0,70	-1,90±3,40	1,07±0,55
Mínimo					-9,00	-8,90	0,30
Máximo					-6,10	1,70	2,29
Mediana					-7,70	-0,10	0,96
HN -1	15,2	± 0,09	22,5	± 0,27	-7,30	-7,30	0,71
HN -2	16,3	± 0,06	24,0	± 0,07	-7,70	-7,70	0,91
HN- 3	17,1	± 0,06	24,0	± 0,04	-6,90	-6,90	0,53
HN -4	15,6	± 0,23	23,3	± 0,01	-7,90	-7,90	1,10
HN -5	15,7	± 0,10	23,5	± 0,32	-7,80	-7,80	1,00
HN -6	14,9	± 0,01	23,0	± 0,06	-8,20	-8,20	1,30
HN -7	17,4	± 0,08	23,5	± 0,11	-8,10	-8,10	1,22
X ± SD					-7,70±0,40	-7,70±0,40	0,97±0,28
Mínimo					-8,20	-8,20	1,30
Máximo					-6,90	-6,90	0,53
Mediana					-7,80	-7,80	1,00

Tabela 3 - Expressão relativa individual do gene *MiR-7a* em adenomas produtores de (GH) e tecido hipofisário normal (HN)

Amostra	Ct_{MiR-7a}		Ct_{mCE}		ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GH-1-310	24,9	± 0,18	30,9	± 0,26	-5,90	1,10	0,47
GH-2-311	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-3-312/1394	27,8	± 0,30	32,5	± 0,58	-4,80	2,30	0,21
GH-4-313	24,2	± 0,16	30,9	± 0,75	-6,50	0,30	0,81
GH-5-314	24,0	± 0,16	31,9	± 0,57	-7,90	-0,90	1,81
GH-6-510/511	24,8	± 0,06	31,4	± 0,13	-6,90	0,40	0,74
GH-7-512/513	23,7	± 0,22	28,0	± 0,17	-4,30	2,70	0,15
GH-8-514	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-9-515	21,9	± 0,08	29,0	± 0,03	-7,10	-0,10	1,04
GH-10-518	23,0	± 0,08	32,2	± 0,17	-9,20	-2,20	4,50
GH-11-519	22,2	± 0,04	28,2	± 0,07	-6,00	1,10	0,47
GH-12-520	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-13-521	25,8	± 0,11	31,0	± 0,37	-5,20	1,80	0,28
GH-14-818	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-15-819	23,6	± 0,10	30,5	± 0,03	-6,90	0,10	0,91
GH-16-1397	23,7	± 0,10	31,4	± 0,04	-7,70	-0,7	1,62
GH- 17-1393	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-18-1402	23,8	± 0,16	30,0	± 0,37	-6,30	0,80	0,59
GH-19-1400	23,8	± 0,04	29,8	± 0,19	-6,00	1,00	0,48
GH-20-1399	23,5	± 0,10	30,0	± 0,18	-6,40	0,60	0,67
GH-21-1396	24,9	± 0,03	28,3	± 0,12	-3,50	3,60	0,08
GH-22-1392	23,1	± 0,15	30,4	± 0,23	-7,10	-0,20	1,19
GH-23-1401	24,6	± 0,15	27,7	± 0,21	-3,10	3,90	0,07
GH-24-516/517	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-25-1398	23,9	± 0,19	32,2	± 0,07	-8,30	-1,20	2,36
GH-26-1391	24,2	± 0,11	30,5	± 0,08	-6,30	0,70	0,60
X ± SD					-6,30±1,50	0,80±1,60	0,95±1,03
Mínimo					-9,20	-2,02	0,07
Máximo					-3,10	3,90	4,50
Mediana					-6,40	0,70	0,64
HN -1	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
HN -2	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
HN- 3	21,6	± 0,35	26,3	± 0,11	-4,70	2,30	0,20
HN -4	18,1	± 0,17	26,5	± 0,52	-8,40	-1,40	2,61
HN -5	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
HN -6	20,3	± 0,06	26,9	± 0,23	-6,60	0,50	0,72
HN -7	19,6	± 0,03	27,1	± 0,17	-7,50	-0,50	1,38
X ± SD					-6,80±1,60	0,20±1,60	1,23±1,04
Mínimo					-8,40	-1,40	0,20
Máximo					-4,70	2,30	2,61
Mediana					-7,10	0,00	1,05

Tabela 4- Expressão relativa individual do gene *MiR-15a* em adenomas produtores de (GH) e tecido hipofisário normal (HN)

Amostra	Ct _{MiR-15a}		Ct _{mCE}		ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
GH-1-310	25,01	± 0,07	26,64	± 0,33	-1,63	-0,12	1,10
GH-2-311	26,94	± 0,47	26,82	± 0,33	0,12	1,63	0,30
GH-3-312/1394	29,09	± 1,02	29,23	± 0,26	-0,14	1,37	0,40
GH-4-313	28,16	± 1,11	26,84	± 0,06	1,32	2,83	0,10
GH-5-314	25,99	± 0,06	28,29	± 0,05	-2,30	-0,79	1,70
GH-6-510/511	29,16	± 0,05	28,22	± 0,17	0,93	2,44	0,20
GH-7-512/513	27,37	± 0,51	25,53	± 0,14	1,84	3,35	0,10
GH-8-514	24,32	± 0,30	25,72	± 0,06	-1,40	0,11	0,90
GH-9-515	23,31	± 0,10	25,57	± 0,11	-2,26	-0,76	1,70
GH-10-518	24,87	± 0,07	27,08	± 0,19	-2,21	-0,70	1,60
GH-11-519	25,33	± 0,06	25,28	± 0,11	0,05	1,56	0,30
GH-12-520	24,60	± 0,18	24,99	± 0,05	-0,39	1,12	0,50
GH-13-521	27,53	± 0,20	27,97	± 0,18	-0,44	1,07	0,50
GH-14-818	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-15-819	27,60	± 0,04	30,5	± 0,32	-3,94	-2,43	5,40
GH-16-1397	29,2	± 0,58	31,4	± 0,62	-2,50	-2,10	4,40
GH-17-1393	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-18-1402	29,7	± 0,94	28,5	± 0,45	1,30	1,60	0,30
GH-19-1400	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-20-1399	29,6	± 0,23	29,4	± 0,80	0,30	0,60	0,70
GH-21-1396	28,8	± 0,96	28,3	± 0,17	-0,80	-0,50	1,40
GH-22-1392	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-23-1401	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-24-516/517	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-25-1398	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-26-1391	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
X ± SD					-0,68±1,58	0,57±1,61	1,20±1,46
Mínimo					-3,94	-2,43	0,10
Máximo					1,84	3,35	5,40
Mediana					-0,42	0,84	0,60
HN -1	28,4	± 0,26	28,1	± 0,52	0,40	0,70	0,60
HN -2	27,3	± 0,72	27,2	± 0,13	-0,30	0,00	1,00
HN- 3	26,7	± 0,71	25,7	± 0,16	1,00	1,30	0,40
HN -4	25,9	± 0,21	26,9	± 0,49	-1,00	-0,70	1,60
HN -5	25,7	± 1,01	27,1	± 0,53	-1,40	-1,10	2,20
HN -6	28,6	± 0,76	28,5	± 0,15	0,10	0,50	0,70
HN -7	26,7	± 0,43	27,2	± 0,32	-0,50	-0,10	1,10
X ± SD					-0,24±0,82	0,09±0,83	1,09±0,63
Mínimo					-1,40	-1,10	0,40
Máximo					1,00	1,30	2,20
Mediana					-0,30	0,00	1,00

Tabela 5 - Expressão relativa individual do gene *MiR-16* em adenomas produtores de (GH) e tecido hipofisário normal (HN)

Amostra	Ct_{MiR-16}		Ct_{mCE}		ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GH-1-310	21,95	± 0,73	26,64	± 0,33	-4,69	5,06	0,00
GH-2-311	21,40	± 0,30	26,82	± 0,33	-5,42	4,34	0,10
GH-3-312/1394	23,15	± 0,13	29,23	± 0,26	-6,08	3,62	0,10
GH-4-313	21,80	± 0,06	26,84	± 0,06	-5,05	4,71	0,00
GH-5-314	22,02	± 0,05	28,29	± 0,05	-6,27	3,48	0,10
GH-6-510/511	22,82	± 0,19	28,22	± 0,17	-5,41	4,34	0,10
GH-7-512/513	21,56	± 0,14	25,53	± 0,14	-3,97	5,78	0,00
GH-8-514	21,17	± 0,00	25,72	± 0,06	-4,55	5,21	0,00
GH-9-515	19,25	± 0,31	25,57	± 0,11	-6,32	3,43	0,10
GH-10-518	19,72	± 0,26	27,08	± 0,19	-7,36	2,40	0,20
GH-11-519	19,49	± 0,05	25,28	± 0,11	-5,80	3,95	0,10
GH-12-520	19,72	± 0,15	24,99	± 0,05	-5,27	4,48	0,00
GH-13-521	22,91	± 0,39	27,97	± 0,18	-5,06	4,69	0,00
GH-14-818	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-15-819	20,23	± 0,18	31,53	± 0,32	-11,30	-1,55	2,90
GH-16-1397	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-17-1393	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-18-1402	20,7	± 0,05	28,5	± 0,45	-7,8	0,9	0,50
GH-19-1400	19,6	± 0,61	30,2	± 0,29	-10,6	-2,0	4,00
GH-20-1399	19,2	± 0,81	29,4	± 0,80	-10,2	-1,5	2,90
GH-21-1396	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-22-1392	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-23-1401	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-24-516/517	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-25-1398	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-26-1391	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
X ± SD					-6,54±2,21	3,02±2,51	0,65±1,27
Mínimo					-11,30	-2,00	0,00
Máximo					-3,97	5,78	4,00
Mediana					-5,80	3,95	0,10
HN -1	19,4	± 0,23	28,1	± 0,52	-8,60	0,00	1,00
HN -2	18,9	± 0,05	27,2	± 0,13	-8,70	-0,10	1,10
HN- 3	17,6	± 0,31	25,7	± 0,16	-8,10	-0,50	0,70
HN -4	18,0	± 0,31	26,9	± 0,49	-8,90	-0,20	1,20
HN -5	17,5	± 0,24	27,1	± 0,53	-9,70	-1,10	2,10
HN -6	20,0	± 0,00	28,5	± 0,15	-8,40	0,20	0,90
HN -7	18,8	± 0,36	27,2	± 0,32	-8,40	0,20	0,90
X ± SD					-8,69±0,51	-0,21±0,46	1,13±0,46
Mínimo					-9,70	-1,10	0,70
Máximo					-8,10	0,20	2,10
Mediana					-8,60	-0,10	1,00

Tabela 6 - Expressão relativa individual do gene *miR-21* em adenomas produtores de (GH) e tecido hipofisário normal (HN)

Amostra	Ct _{MIR-21}		Ct _{mCE}		ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
GH-1-310	22,4	± 0,32	30,9	± 0,26	-8,50	-3,10	8,50
GH-2-311	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-3-312/1394	23,5	± 0,06	32,5	± 0,58	-9,10	-3,70	12,80
GH-4-313	20,3	± 0,06	30,9	± 0,75	-10,60	-5,30	38,20
GH-5-314	22,1	± 0,05	31,9	± 0,57	-9,80	-4,40	21,10
GH-6-510/511	26,2	± 0,15	31,4	± 0,31	-5,20	0,10	0,90
GH-7-512/513	19,4	± 0,00	28,0	± 0,17	-8,70	-3,30	9,60
GH-8-514	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-9-515	21,1	± 0,00	29,0	± 0,03	-7,90	-2,50	5,60
GH-10-518	21,6	± 0,34	32,2	± 0,17	-10,60	-5,20	36,70
GH-11-519	20,5	± 0,12	28,2	± 0,07	-7,60	-2,20	4,70
GH-12-520	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-13-521	23,2	± 0,07	31,0	± 0,37	-7,70	-2,30	5,10
GH-14-818	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-15-819	19,6	± 0,12	30,5	± 0,03	-10,90	-5,50	45,70
GH-16-1397	20,8	± 0,09	31,4	± 0,04	-10,60	-5,20	37,90
GH- 17-1393	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-18-1402	21,8	± 0,03	30,0	± 0,37	-8,20	-2,80	6,90
GH-19-1400	20,1	± 0,02	29,8	± 0,19	-9,60	-4,20	18,90
GH-20-1399	22,7	± 0,09	30,0	± 0,18	-7,30	-1,90	3,80
GH-21-1396	23,2	± 0,21	28,3	± 0,12	-5,10	0,30	0,80
GH-22-1392	29,6	± 0,01	30,4	± 0,23	-10,90	-5,40	42,00
GH-23-1401	21,2	± 0,11	27,7	± 0,21	-6,50	-1,10	2,20
GH-24-516/517	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-25-1398	21,0	± 0,00	32,2	± 0,07	-11,20	-5,80	56,40
GH-26-1391	19,6	± 0,10	30,5	± 0,08	-10,90	-5,50	45,40
X ± SD					-8,90±1,90	-3,50±1,90	20,16±18,48
Mínimo					-11,20	-5,80	0,80
Máximo					-5,10	0,30	56,40
Mediana					-8,90	-3,50	11,20
HN -1	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
HN -2	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
HN- 3	23,9	± 0,55	26,3	± 0,11	-2,4	3,0	0,10
HN -4	18,2	± 0,02	26,5	± 0,52	-8,4	-3,0	7,80
HN -5	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
HN -6	22,0	± 0,08	26,9	± 0,23	-4,8	0,5	0,70
HN -7	21,1	± 0,10	27,1	± 0,17	-5,9	-0,5	1,50
X ± SD					-5,40±2,50	0,00±2,50	2,53±3,56
Mínimo					-8,4	-3,0	0,10
Máximo					-2,4	3,0	7,80
Mediana					-5,4	0,0	1,10

Tabela 7 - Expressão relativa individual do gene *miR-23a* em adenomas produtores de (GH) e tecido hipofisário normal (HN)

Amostra	Ct _{miR-23a}		Ct _{mCE}		Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
GH-1-310	25,73	± 0,57	26,64	± 0,33	-0,91	0,50	0,71
GH-2-311	25,39	± 0,48	26,82	± 0,33	-1,43	-0,01	1,01
GH-3-312/1394	26,19	± 0,20	29,23	± 0,26	-3,05	-1,64	3,11
GH-4-313	24,13	± 0,13	26,84	± 0,06	-2,71	-1,30	2,46
GH-5-314	24,69	± 0,05	28,29	± 0,05	-3,61	-2,19	4,57
GH-6-510/511	29,10	± 0,08	28,22	± 0,17	0,87	2,29	0,20
GH-7-512/513	25,40	± 0,01	25,53	± 0,14	-0,13	1,28	0,40
GH-8-514	25,33	± 0,07	25,72	± 0,06	-0,39	1,02	0,49
GH-9-515	24,24	± 0,32	25,57	± 0,11	-1,33	0,08	0,95
GH-10-518	23,42	± 0,18	27,08	± 0,19	-3,66	-2,25	4,75
GH-11-519	23,98	± 0,23	27,89	± 0,11	-1,30	0,11	0,93
GH-12-520	23,57	± 0,12	24,99	± 0,05	-1,42	-0,01	1,00
GH-13-521	26,90	± 0,21	27,97	± 0,18	-1,07	0,34	0,79
GH-14-818	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-15-819	29,46	± 0,34	31,53	± 0,32	-2,07	-0,66	1,59
GH-16-1397	27,5	± 0,04	31,7	± 0,62	-4,20	-2,40	5,40
GH-17-1393	27,1	± 1,03	29,1	± 0,30	-2,00	-0,30	1,20
GH-18-1402	27,4	± 0,24	28,5	± 0,45	-1,10	0,70	0,60
GH-19-1400	26,9	± 0,95	30,2	± 0,29	-3,30	-6,10	2,90
GH-20-1399	27,5	± 0,55	29,4	± 0,80	-1,80	-0,10	1,10
GH-21-1396	28,3	± 1,56	29,6	± 0,17	-1,40	0,40	0,80
GH-22-1392	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-23-1401	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-24-516/517	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-25-1398	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-26-1391	27,4	± 0,71	29,8	± 0,62	-2,30	-0,60	1,50
X ± SD					-1,82±1,27	-0,52±1,75	1,74±1,54
Mínimo					-4,20	-6,10	0,21
Máximo					0,87	2,29	5,40
Mediana					-1,43	-0,01	1,01
HN -1	26,7	± 0,29	28,1	± 0,52	-1,60	1,02	0,90
HN -2	26,3	± 0,02	27,6	± 0,13	-1,30	0,40	0,70
HN- 3	25,9	± 0,15	25,7	± 0,16	0,20	1,90	0,30
HN -4	24,8	± 0,32	26,9	± 0,49	-2,00	-0,30	1,20
HN -5	24,8	± 0,15	27,1	± 0,53	-2,30	-0,60	1,50
HN -6	26,6	± 0,04	28,5	± 0,15	-1,90	-0,20	1,10
HN -7	25,4	± 0,03	27,2	± 0,32	-1,70	0,00	1,00
X ± SD					-1,51±0,82	0,32±0,88	0,96±0,38
Mínimo					-2,30	-0,60	0,30
Máximo					0,20	1,90	1,50
Mediana					-1,70	0,00	1,00

Tabela 8- Expressão relativa individual do gene *miR-23* bem adenomas produtores de (GH) e tecido hipofisário normal (HN)

Amostra	$Ct_{miR-23b}$		Ct_{mCE}		ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Amostra	21,75	± 0,72	26,64	± 0,33	-4,89	0,93	0,53
GH-1-310	19,68	± 0,59	26,82	± 0,33	-7,14	1,32	2,50
GH-2-311	22,84	± 0,08	29,23	± 0,26	-6,39	0,58	1,49
GH-3-312/1394	20,99	± 0,18	26,84	± 0,06	-5,85	-0,04	1,03
GH-4-313	21,59	± 0,03	28,29	± 0,05	-6,71	-0,89	1,86
GH-5-314	23,30	± 0,05	28,22	± 0,17	-4,92	0,89	0,54
GH-6-510/511	22,64	± 0,17	25,53	± 0,14	-2,89	2,93	0,13
GH-7-512/513	28,23	± 9,48	25,72	± 0,06	2,52	8,33	0,00
GH-8-514	20,00	± 0,54	25,57	± 0,11	-5,57	0,24	0,85
GH-9-515	20,92	± 1,35	27,08	± 0,19	-6,16	-0,35	1,27
GH-10-518	19,62	± 0,02	25,28	± 0,11	-5,36	0,46	0,73
GH-11-519	20,07	± 0,29	24,99	± 0,05	-4,92	0,89	0,54
GH-12-520	21,50	± 0,08	27,97	± 0,18	-6,47	-0,66	1,57
GH-13-521	24,72	± 0,05	31,53	± 0,32	-6,82	-1,00	2,00
GH-14-818	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-15-819	26,0	± 1,01	31,7	± 0,62	-5,60	-0,50	1,38
GH-16-1397	22,9	± 0,26	29,1	± 0,30	-6,10	-0,90	1,93
GH-17-1393	26,2	± 0,80	28,5	± 0,45	-2,20	2,90	0,13
GH-18-1402	25,2	± 0,26	30,2	± 0,29	-5,10	0,10	0,93
GH-19-1400	27,7	± 0,43	29,4	± 0,80	-4,60	0,50	0,69
GH-20-1399	25,9	± 0,18	29,6	± 0,17	-3,50	1,40	0,37
GH-21-1396	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-22-1392	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-23-1401	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-24-516/517	24,9	± 0,15	31,2	± ND	-6,30	-1,10	2,15
GH-25-1398	25,0	± 0,53	29,8	± 0,62	-4,80	0,40	0,75
GH-26-1391					-4,99±2,09	0,75±2,02	1,06±0,71
X ± SD					-7,14	-1,10	0,00
Minimo					2,52	8,33	2,50
Maximo					-5,47	0,43	0,89
Mediana	22,9	± 0,05	28,1	± 0,52	-5,2	0,0	1,00
HN -1	22,6	± 0,13	27,6	± 0,13	-5,0	0,2	0,88
HN -2	21,9	± 0,15	25,7	± 0,16	-3,8	1,4	0,38
HN -3	21,1	± 0,09	26,9	± 0,49	-5,7	-0,6	1,47
HN -4	20,8	± 0,20	27,1	± 0,53	-6,3	-1,1	2,13
HN -5	23,6	± 0,54	28,5	± 0,15	-4,9	0,3	0,80
HN -6	21,2	± 0,13	27,2	± 0,32	-6,0	-0,8	1,73
HN -7					-5,27±0,83	-0,09±0,84	1,20±0,62
X ± SD					-6,30	-1,10	0,38
Minimo					-3,80	1,40	2,17
Máximo					-5,20	0,00	1,00

Tabela 9 - Expressão relativa individual do gene *miR-24-2a* em adenomas produtores de (GH) e tecido hipofisário normal (HN)

Amostra	Ct _{MIR-24-2a}		Ct _{mCE}		ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
GH-1-310	29,46	± 0,36	26,64	± 0,33	2,82	0,32	0,80
GH-2-311	28,78	± 0,03	26,82	± 0,33	1,97	-0,54	1,45
GH-3-312/1394	29,54	± 0,66	29,23	± 0,26	0,31	-2,20	4,58
GH-4-313	27,10	± 0,29	26,84	± 0,06	0,26	-2,27	4,75
GH-5-314	28,20	± 0,07	28,29	± 0,05	-0,10	-2,60	6,05
GH-6-510/511	23,59	± 0,91	28,22	± 0,17	5,37	2,87	0,14
GH-7-512/513	29,35	± 0,06	25,53	± 0,14	3,82	1,32	0,40
GH-8-514	29,75	± 0,64	25,72	± 0,06	4,03	1,53	0,35
GH-9-515	30,42	± 0,94	25,57	± 0,11	4,85	2,35	0,20
GH-10-518	26,24	± 0,17	27,08	± 0,19	-0,84	-3,34	10,14
GH-11-519	27,69	± 0,08	25,28	± 0,11	2,32	-0,19	1,14
GH-12-520	26,97	± 0,14	24,99	± 0,05	1,98	-0,52	1,43
GH-13-521	30,09	± 0,04	27,97	± 0,18	2,12	-0,32	1,30
GH-14-818	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-15-819	32,41	± 0,18	31,53	± 0,32	0,88	-1,63	3,09
GH-16-1397	30,7	± 0,71	31,7	± 0,62	-1,00	-3,00	3,94
GH-17-1393	30,0	± 0,33	29,1	± 0,30	0,90	-1,10	2,15
GH-18-1402	28,6	± 0,43	28,5	± 0,45	0,20	-1,90	3,62
GH-19-1400	30,0	± 0,19	30,2	± 0,29	0,20	2,30	4,78
GH-20-1399	29,4	± 0,89	29,4	± 0,80	0,00	-2,00	4,08
GH-21-1396	29,6	± 0,59	29,6	± 0,17	0,00	-2,00	3,94
GH-22-1392	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-23-1401	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-24-516/517	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-25-1398	30,1	± 0,64	31,2	± 0,57	-1,10	-3,10	8,56
GH-26-1391	32,3	± 0,59	29,8	± 0,62	2,50	0,50	0,69
X ± SD					1,43±1,89	-0,71±1,89	3,07±2,72
Mínimo					-1,10	-3,34	0,14
Máximo					5,37	2,87	10,14
Mediana					0,89	-0,82	2,62
HN -1	30,1	± 0,04	28,1	± 0,52	2,00	0,00	1,00
HN -2	30,3	± 0,09	27,6	± 0,13	2,70	0,70	0,63
HN- 3	29,6	± 0,21	25,7	± 0,16	3,90	1,90	0,27
HN -4	28,8	± 0,34	26,9	± 0,49	1,90	-0,10	1,06
HN -5	28,6	± 0,58	27,1	± 0,53	1,50	-0,50	1,43
HN -6	30,3	± 0,47	28,5	± 0,15	1,90	-0,20	1,12
HN -7	29,4	± 0,49	27,2	± 0,32	2,20	0,20	0,86
X ± SD					2,30±0,79	0,29±0,80	0,91±0,37
Mínimo					1,50	-0,50	0,27
Máximo					3,90	1,90	1,43
Mediana					2,00	0,00	1,00

Tabela 10 - Expressão relativa individual do gene *miR-141* em adenomas produtores de (GH) e tecido hipofisário normal (HN)

Amostra	$Ct_{miR-141}$		Ct_{mCE}		ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GH-1-310	27,68	± 0,13	26,64	± 0,33	1,04	5,37	0,02
GH-2-311	28,00	± 0,13	26,82	± 0,33	1,19	5,52	0,02
GH-3-312/1394	29,69	± 0,18	29,23	± 0,26	0,15	4,49	0,00
GH-4-313	28,19	± 0,06	26,84	± 0,06	1,37	5,69	0,02
GH-5-314	28,80	± 0,17	28,29	± 0,05	0,51	4,85	0,04
GH-6-510/511	33,31	± 1,22	28,22	± 0,17	5,09	9,42	0,00
GH-7-512/513	28,13	± 0,12	25,53	± 0,14	2,60	6,94	0,01
GH-8-514	29,84	± 0,25	25,72	± 0,06	4,13	8,46	0,00
GH-9-515	28,86	± 0,15	25,57	± 0,11	3,29	7,62	0,01
GH-10-518	29,98	± 0,14	27,08	± 0,19	1,91	6,24	0,01
GH-11-519	31,51	± 0,51	25,28	± 0,11	6,23	10,57	0,00
GH-12-520	27,90	± 0,15	24,99	± 0,05	2,91	7,25	0,01
GH-13-521	29,64	± 0,36	27,97	± 0,18	1,67	6,00	0,02
GH-14-818	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-15-819	33,63	± 0,87	31,53	± 0,32	2,10	6,44	0,01
GH-16-1397	31,1	± 0,05	31,7	± 0,62	-0,60	4,70	0,00
GH-17-1393	27,9	± 0,33	29,1	± 0,30	1,10	4,20	0,10
GH-18-1402	22,4	± 0,02	28,5	± 0,45	-6,10	-0,8	1,70
GH-19-1400	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-20-1399	20,0	± 0,28	29,4	± 0,80	-5,40	-0,10	1,10
GH-21-1396	27,8	± 0,02	29,6	± 0,17	-1,80	3,50	0,10
GH-22-1392	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-23-1401	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-24-516/517	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-25-1398	29,4	± 0,44	31,2	± 0,57	-1,80	3,50	0,10
GH-26-1391	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
X ± SD					0,98±3,07	5,49±2,75	0,16±0,44
Mínimo					-6,10	-0,80	0,00
Máximo					6,23	10,57	1,70
Mediana					1,28	5,61	0,02
HN -1	22,8	± 0,87	28,1	± 0,52	-5,30	0,00	1,00
HN -2	23,8	± 0,41	27,6	± 0,13	-3,80	1,50	0,30
HN- 3	21,7	± 0,11	25,7	± 0,16	-4,10	1,20	0,40
HN -4	21,9	± 0,25	26,9	± 0,49	-5,00	0,30	0,80
HN -5	20,7	± 0,19	27,1	± 0,53	-6,40	-1,10	2,20
HN -6	23,1	± 0,16	28,7	± 0,15	-5,30	-0,00	1,00
HN -7	21,7	± 0,22	27,2	± 0,32	-5,50	-0,2	1,10
X ± SD					-5,06±0,88	0,24±0,88	0,97±0,62
Mínimo					-6,40	-1,10	0,30
Máximo					-3,80	1,50	2,20
Mediana					-5,30	0,00	1,00

Tabela 11 - Expressão relativa individual do gene *miR-143* em adenomas produtores de (GH) e tecido hipofisário normal (HN)

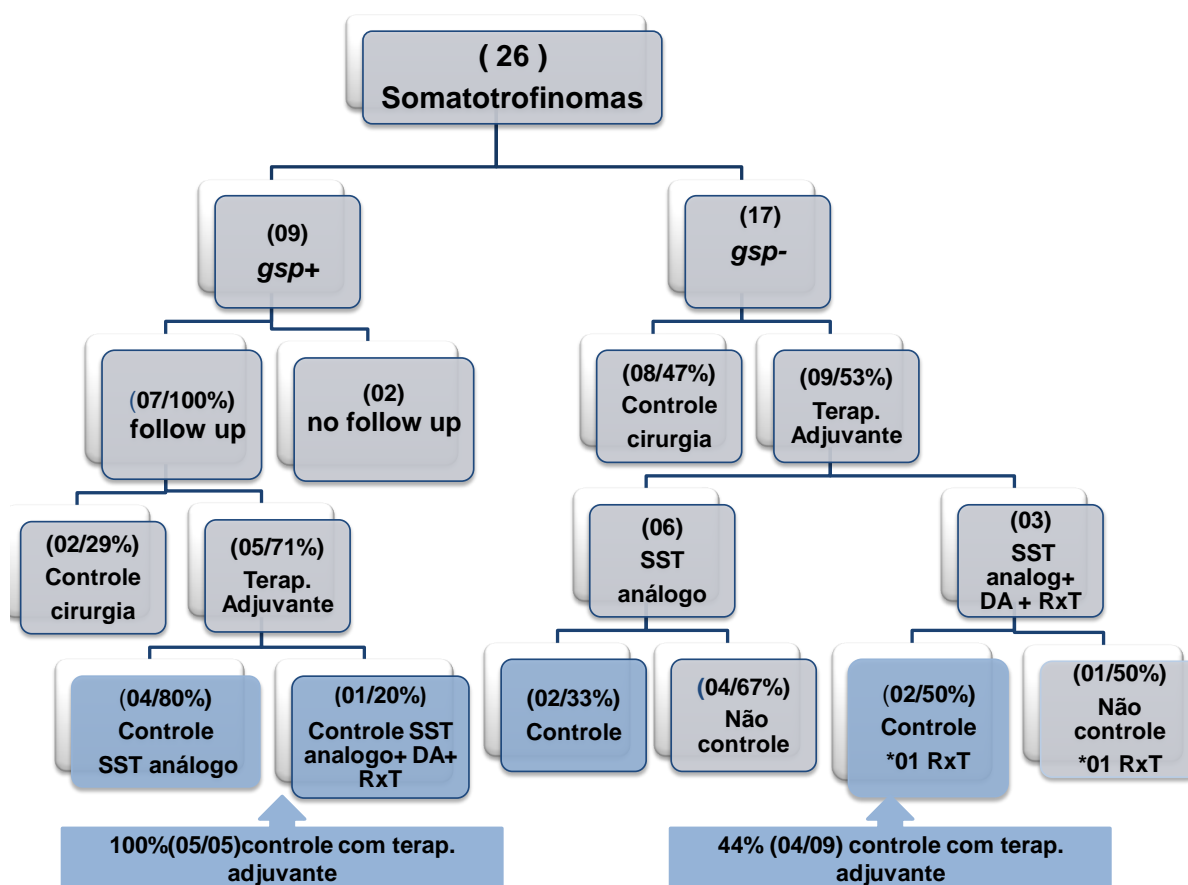
Amostra	$Ct_{miR-143}$		Ct_{mCE}		ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GH-1-310	22,5	± 0,17	26,7	± 0,54	-4,2	0,63	0,65
GH-2-311	21,6	± 0,09	26,5	± 0,10	-4,9	-0,05	1,04
GH-3-312/1394	22,8	± 0,49	29,5	± 0,21	-6,6	-1,77	3,40
GH-4-313	19,7	± 0,30	26,7	± 0,19	-7,0	-2,14	4,39
GH-5-314	22,3	± 0,30	28,7	± 0,40	-6,4	-1,49	2,81
GH-6-510/511	28,0	± 0,16	29,8	± 0,33	-1,9	2,98	0,13
GH-7-512/513	21,6	± 0,10	26,4	± 0,41	-4,8	0,06	0,96
GH-8-514	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-9-515	23,4	± 0,32	26,1	± 0,26	-2,8	2,09	0,23
GH-10-518	22,2	± 0,07	28,1	± 0,18	-6,0	-1,11	2,15
GH-11-519	22,2	± 0,15	26,0	± 0,57	-3,8	1,06	0,48
GH-12-520	22,5	± 0,13	26,5	± 0,32	-4,1	0,80	0,57
GH-13-521	25,1	± 0,20	30,6	± 0,50	-5,6	-0,73	1,66
GH-14-818	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-15-819	25,8	± 0,08	32,9	± 0,94	-7,1	-2,23	4,68
GH-16-1397	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-17-1393	24,0	± 0,28	29,1	± 0,90	-5,1	-0,22	1,16
GH-18-1402	22,9	± 0,25	28,5	± 0,76	-5,6	-0,77	1,70
GH-19-1400	23,1	± 0,15	30,2	± 0,71	-7,1	-2,28	4,84
GH-20-1399	23,2	± 0,28	29,4	± 0,15	-6,2	-1,35	2,55
GH-21-1396	25,5	± 1,72	29,6	± 0,61	-4,1	0,75	0,59
GH-22-1392	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-23-1401	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-24-516/517	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-25-1398	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-26-1391	25,4	± 0,14	29,8	± 0,19	-4,4	0,45	0,72
X ± SD					-5,1 ± 1,4	-0,28±1,47	1,83±1,54
Mínimo					-7,1	-2,28	0,13
Máximo					-1,9	2,98	4,84
Mediana					-5,1	-0,22	1,16
HN -1	23,2	± 0,00	28,1	± 0,52	-4,9	0,00	1,00
HN -2	23,1	± 0,10	27,6	± 0,13	-4,5	0,38	0,77
HN -3	21,9	± 0,23	25,7	± 0,16	-3,8	1,06	0,48
HN -4	21,5	± 0,00	26,9	± 0,49	-5,4	-0,56	1,47
HN -5	23,0	± 0,09	27,1	± 0,63	-4,1	0,72	0,61
HN -6	22,6	± 0,06	28,5	± 0,15	-5,8	-0,97	1,96
HN -7	21,6	± 0,24	27,2	± 0,32	-5,6	-0,76	1,70
X ± SD					-4,9±0,8	-0,02±0,78	1,14±0,57
Mínimo					-5,8	-0,97	0,48
Máximo					-3,8	1,06	1,96
Mediana					-4,9	0,00	1,00

Tabela 12 - Expressão relativa individual do gene *miR-145* em adenomas produtores de (GH) e tecido hipofisário normal (HN)

Amostra	$Ct_{miR-145}$		Ct_{mCE}		ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GH-1-310	21,9	± 0,20	26,7	± 0,54	4,90	1,00	0,52
GH-2-311	20,6	± 0,43	26,5	± 0,10	-5,90	-0,10	1,09
GH-3-312/1394	21,7	± 0,24	29,5	± 0,21	-7,70	-1,90	3,81
GH-4-313	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-5-314	20,9	± 0,74	28,7	± 0,40	-7,80	-2,00	3,95
GH-6-510/511	25,5	± 0,53	29,8	± 0,33	-4,30	1,50	0,36
GH-7-512/513	20,5	± 0,04	26,4	± 0,41	-5,90	-0,10	1,10
GH-8-514	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-9-515	21,2	± 0,31	26,1	± 0,26	-4,90	0,90	0,54
GH-10-518	20,4	± 0,43	28,1	± 0,18	-7,70	-1,90	3,71
GH-11-519	21,6	± 0,04	26,0	± 0,57	-4,40	1,40	0,38
GH-12-520	22,0	± 0,12	26,5	± 0,32	-4,60	1,20	0,42
GH-13-521	23,0	± 0,85	30,6	± 0,50	-7,70	-1,90	3,67
GH-14-818	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-15-819	24,9	± 0,33	32,9	± 0,94	-8,00	-2,20	4,45
GH-16-1397	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-17-1393	22,8	± 1,0	29,1	± 0,9	-4,30	-0,50	1,39
GH-18-1402	25,2	± 0,01	28,5	± 0,76	-3,30	2,50	0,17
GH-19-1400	23,2	± 1,57	30,2	± 0,71	-7,00	-1,20	2,36
GH-20-1399	24,0	± 0,32	29,4	± 0,15	-5,40	0,40	0,76
GH-21-1396	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-22-1392	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-23-1401	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-24-516/517	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-25-1398	ND	± ND	ND	± ND	ND	ND	ND
GH-26-1391	25,1	± 0,25	29,8	± 0,19	-4,70	1,10	0,47
X ± SD					-5,22±3,02	-0,11±1,51	1,71±1,56
Mínimo					-8,00	-2,20	0,17
Máximo					4,90	2,50	4,45
Mediana					-5,40	-0,10	1,09
HN -1	21,4	± 0,39	28,1	± 0,52	-6,60	-0,80	1,79
HN -2	22,3	± 0,22	27,6	± 0,13	-5,30	0,50	0,70
HN- 3	21,0	± 0,78	25,7	± 0,16	-4,50	1,10	0,47
HN -4	21,6	± 0,10	26,9	± 0,49	-5,80	0,00	1,00
HN -5	23,2	± 0,21	27,1	± 0,53	-3,90	1,90	0,27
HN -6	22,5	± 0,08	28,5	± 0,15	-5,90	-0,10	1,10
HN -7	20,9	± 0,38	27,2	± 0,32	-6,30	-0,50	1,39
X ± SD					-5,47±0,97	0,30±0,94	0,96±0,53
Mínimo					-6,60	-0,80	0,27
Máximo					-3,90	1,90	1,79
Mediana					-5,80	0,00	1,00

APÊNDICE B

FLUXOGRAMA



Resposta as terapêuticas instituídas

Anexos

ANEXO A

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 04 de julho de 2007

Ofício nº 2196/2007
CEP/SPC

Prezado Senhor,

O trabalho intitulado **“EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM TUMORES HIPOFISÁRIOS SECRETORES DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 249ª Reunião Ordinária realizada em 02/07/2007, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 5283/2007.

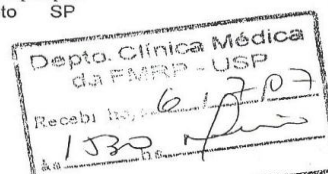
Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.


PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
DEISON SOARES DE LIMA
PROFª DRª MARGARET DE CASTRO (Orientadora)
Depto. de Clínica Médica
Laboratório de Endocrinologia

Comitê de Ética em Pesquisa HC e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA - 0000 2733; IRB - 0000 2186
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP



ANEXO B



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 11 de outubro de 2011

Ofício nº 3651/2011
CEP/MGV

182

A

PROCESSO HCRP nº 5283/2007

Prezada Professora,


O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 334ª Reunião Ordinária realizada em 10/10/2011, tomou ciência da saída do pesquisador Deison Soares de Lima, assim como tomou ciência da entrada da pesquisadora Drª Ana Rosa Pinto Quidute, referente ao projeto intitulado **"EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM TUMORES HIPOFISÁRIOS SECRETORES DE HORMÔNIOS DE CRESCIMENTO"**. O CEP aprovou a continuidade da pesquisa.

Atenciosamente.


DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
PROFª DRª MARGARET DE CASTRO
Depto. de Clínica Médica - Laboratório de Endocrinologia

ANEXO C

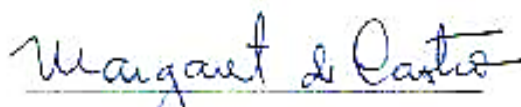
	Universidade de São Paulo
	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
	Departamento de Clínica Médica
	Av. Bandeirantes, 3900. Cep 14049-900 - Ribeirão Preto – SP, Brasil Tel.: +55(16) 3602-2573 - FAX: +55(16) 3602-2700

Ribeirão Preto, 07 de fevereiro de 2012.

Declaração

Declaro para os devidos fins, que a Dra Ana Rosa Pinto Quidute, aluna de doutorado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, com matrícula de nº **324344**, vem desenvolvendo o projeto de doutorado "Expressão Gênica Diferencial em Tumores Hipofisários Secretores de Hormônio de Crescimento" (proc nº 5283/2007), no laboratório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, sob minha orientação. Estabelecendo assim, intercâmbio científico, com o programa de pós-graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Atenciosamente,



Margaret de Castro

Profa Titular do Depto de Clínica Médica

Coordenadora do Laboratório de Endocrinologia