Renata Kikuchi Foltran

**Estudo molecular dos genes *GNAS*, *PTTG*, *AIP*, *CDKN1B* e
MEG3 em adenomas hipofisários esporádicos**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Dr.^a Raquel Soares
Jallad

São Paulo
2015

Renata Kikuchi Foltran

**Estudo molecular dos genes *GNAS*, *PTTG*, *AIP*, *CDKN1B* e
MEG3 em adenomas hipofisários esporádicos**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Dr.^a Raquel Soares
Jallad

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Foltran, Renata Kikuchi

Estudo molecular dos genes *GNAS*, *PTTG*, *AIP*, *CDKN1B* e *MEG3* em adenomas hipofisários esporádicos / Renata Kikuchi Foltran. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Raquel Soares Jallad.

Descritores: 1.Doenças da hipófise 2.Adenoma hipofisário secretor de GH
3.Adenoma hipofisário secretor de ACT 4. Prolactinoma 5.Tumorigênese 6.Expressão gênica 7.Mutação 8.Oncogenes 9.Genes supressores de tumor

USP/FM/DBD-494/15

Dedico esta dissertação de mestrado aos meus pais Renato e Isaura, pelo apoio incondicional, por terem acreditado em meu sonho, me dando carinho, suporte e estrutura para morar longe de casa, compreendendo todas as vezes em que tive que me ausentar.

Agradecimentos

Na realização deste trabalho tive ajuda de muitas pessoas que contribuíram significativamente para a conclusão deste trabalho. Em especial, agradeço muito minha orientadora Dr.^a Raquel Soares Jallad, por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade e a honra de ser sua primeira aluna de pós-graduação. Obrigada por toda atenção e dedicação que teve comigo, por todas as vezes que me corrigiu para que eu pudesse evoluir, por todas as tardes de leitura e discussão de artigos, por todo o aprendizado que adquirimos juntas.

Agradeço a Dr.^a Ericka Trarbach, pela importante contribuição neste trabalho, por compartilhar seus conhecimentos de biologia molecular, me corrigindo e me ensinando com carinho.

Agradeço à toda unidade de neuroendocrinologia do HCFMUSP por toda contribuição que tiveram neste trabalho. Obrigada Prof. Dr. Marcello Bronstein, Profa. Dr.^a Maria Cândida B. V. Fragoso, Dr.^a Andrea Glezer, Dr.^a Thais Sickler, Dr. Marcio C. Machado, Dr. Felipe Gaia, Dr.^a Cristina Formiga e Dr.^a Ane Caroline Thé B. Freire.

Um agradecimento especial aos funcionários do LIM25: Maria Elisângela, Graça, Rosana, Andrea pela assistência, e aos amigos de pós-graduação adquiridos ao longo dessa jornada: Amanda, Paulo, Isabella e Leonardo, pela amizade, momentos de descontração e conhecimentos compartilhados.

Agradeço o departamento de patologia LIM14, principalmente Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves e Dr. Juliano Dettoni pela contribuição nas análises imunohistoquímica.

E um agradecimento especial à toda minha família, principalmente meus pais Renato e Isaura e meu irmão Rodrigo, meu namorado Bruno e as minhas amigas, por terem me apoiado e vivido esse sonho comigo, por terem compreendido todas as vezes que tive que me ausentar.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Hipófise	1
1.2.	Tumores hipofisários	4
1.3.	Tumorigênese hipofisária	9
1.3.1.	Células-tronco e tumorigênese hipofisária	10
1.3.2.	Bases moleculares da tumorigênese hipofisária	11
1.3.2.1.	Proto-oncogenes e oncogenes	12
1.3.2.2.	Genes supressores tumorais	13
1.4.	Genes envolvidos na tumorigênese de adenomas hipofisários esporádicos e em síndromes genéticas	14
1.4.1.	Gene <i>GNAS</i>	14
1.4.2.	Gene <i>PTTG</i>	17
1.4.3.	Gene <i>AIP</i>	19
1.4.4.	Gene <i>CDKN1B</i>	23
1.4.5.	Gene <i>MEG3</i>	25
2.	OBJETIVOS	28
3.	CASUÍSTICA	29
3.1.	Considerações éticas	29
3.2.	População do estudo	29
3.2.1.	Critérios de inclusão e de exclusão	29
3.2.2.	Pacientes selecionados	30
4.	METODOLOGIA	31
4.1.	Análise clínica	31
4.2.	Avaliação laboratorial	31
4.3.	Avaliação por exames de imagem	32

4.4.	Análise histológica diagnóstica	32
4.5.	Análise imunohistoquímica das proteínas Ki-67 e p53.....	32
4.6.	Análise Molecular	34
4.6.1.	Extração de DNA e RNA de tecido hipofisário	35
4.6.2.	Confecção do cDNA complementar	35
4.6.3.	Estudo dos genes <i>GNAS</i> , <i>AIP</i> e <i>CDKN1B</i>	35
4.6.4.	Sequenciamento automático.....	37
4.6.5.	Análise <i>in silico</i> das variantes <i>missenses</i>	39
4.6.5.1.	SIFT	39
4.6.5.2.	PANTHER	40
4.6.5.3.	Mutation Taster	40
4.6.5.4.	Polyphen-2	41
4.6.6.	Estudo da expressão gênica do gene <i>PTTG</i> , <i>CDKN1B</i> e <i>MEG3</i>	41
4.7.	Análise Estatística	43
5.	RESULTADOS	45
5.1.	Caracterização da casuística	45
5.2.	Análise imunohistoquímica de Ki-67 e P53	49
5.3.	Análise mutacional	50
5.3.1.	Análise de mutações no gene <i>GNAS</i>	50
5.3.2.	Análise de mutações no gene <i>AIP</i>	53
5.3.3.	Análise de mutações no gene <i>CDKN1B</i>	54
5.4.	Análise <i>in silico</i> das variantes missense	54
5.5.	Estudo de expressão gênica	55
5.5.1.	Análise de <i>cluster</i> hierárquico do padrão de expressão dos genes <i>CDKN1B</i> , <i>PTTG</i> e <i>MEG3</i>	59
6.	DISCUSSÃO	62
7.	CONCLUSÕES	73
8.	ANEXOS	75
9.	REFERÊNCIAS.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

%ULNR-IGF-1	Percentual acima do limite superior do intervalo normal de IGF-1 para idade
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AHR	Receptor aril hidrocarbono
AIP	Gene "Aryl hydrocarbon receptor interacting protein"
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CDK	Cinases Dependentes de Ciclina
cDNA	DNA complementar
CDNK1B	Gene "cyclin-dependent kinase inhibitor 1 B"
CIP/KIP	Proteína inibidora de quinase
CNC	Complexo de Carney
Ct	"Threshold cycle"
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ER	Receptor de estrogênio
F	Cortisol sérico
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FIPA	Adenoma hipofisário familiar isolado
FSH	Hormônio folículo estimulante
FU	Cortisol urinário
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDF15	Fator de diferenciação de crescimento-15
GDP	Difosfato de guanosina
GH	Hormônio do crescimento
GHRH	Hormônio Liberador do GH
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GNAS	Guanine nucleotide binding protein alpha stimulating
GTP	Trifosfato de guanosina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ID	Identificação
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IHQ	Imunohistoquímica
IL-8	Interleucina-8
INK4	Inibidor de CDK
LH	Hormônio luteinizante
lncRNAs	"Long noncoding RNA"
LOH	Perda de heterozigose
MDM2	"Mouse double minute 2 homolog"
MEG3	Gene "Maternally expressed 3"
MEN1	Neoplasia endócrina múltipla do tipo 1
MEN4	Neoplasia endócrina múltipla do tipo 4

MENX	Neoplasia endócrina múltipla em ratos
PBS	Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE	Fosfodiesterase
Pit-1	Fator de transcrição positivo pituitário específico 1
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PRL	Prolactina
Prop-1	“Prophet of Pit-1”
PTTG	Pituitary tumor transforming gene
Rb1	Retinoblastoma 1
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RQ	Quantificação relativa
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SF	Fator esteroideogênico
ACNF	Tumor clinicamente não funcionante
TE	Tampão tris-edta
TEF	Fator tireotrófico embriogênico
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TPR	Tetratíopeptídeo
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
XRE	Elementos de resposta a xenobióticos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação clínico-patológica e incidência dos adenomas hipofisários	6
Tabela 2. Oligonucleotídeos sintetizados para amplificação dos éxons 7 a 10 do gene <i>GNAS</i> (ENST00000371100).	36
Tabela 3. Oligonucleotídeos sintetizados para amplificação dos éxons do gene <i>AIP</i> (ENST00000279146).....	37
Tabela 4. Oligonucleotídeos sintetizados para amplificação dos éxons 1 e 2 do gene <i>CDKN1B</i> (ENST00000228872).	37
Tabela 5. Dados clínicos dos pacientes.	47
Tabela 6. Análise de <i>cluster</i> hierárquico do padrão de expressão de Ki-67 e P53.....	50
Tabela 7. Mutações identificadas em <i>GNAS</i> nos tumores hipofisários	51
Tabela 8. Comparação dos dados categóricos entre os tumores <i>gsp⁺</i> e <i>gsp⁻</i> ..	52
Tabela 9. Comparação dos dados contínuos entre os tumores <i>gsp⁺</i> e <i>gsp⁻</i>	52
Tabela 10. Polimorfismos identificados em <i>AIP</i> nos tumores hipofisários.....	53
Tabela 11. Polimorfismos identificados em <i>CDKN1B</i> nos tumores hipofisários	54
Tabela 12. Análise in silico das variantes missense.....	55
Tabela 13. Classificação dos resultados de expressão dos genes <i>CDKN1B</i> , <i>PTTG</i> e <i>MEG3</i>	58
Tabela 14. Análise de <i>cluster</i> hierárquico do padrão de expressão dos genes <i>CDKN1B</i> , <i>PTTG</i> e <i>MEG3</i>	59
Tabela 15. Tipos de adenoma hipofisário mais frequente em cada <i>cluster</i>	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia da glândula hipofisária	3
Figura 2. Citodiferenciação da adenohipófise	11
Figura 3. Mecanismos envolvidos na tumorigênese hipofisária	12
Figura 4. Esquema do papel das mutações <i>Gsa</i> na tumorigênese hipofisária através da ativação constitutiva da adenilato ciclase	16
Figura 5. Função da securina e aneuploidia causada por hiperexpressão de <i>PTTG</i>	19
Figura 6. Esquema do papel de <i>AIP</i> na via de sinalização de xenobióticos.....	20
Figura 7. Esquema demonstrando como a ausência de <i>AIP</i> pode levar a tumorigênese hipofisária através da deficiência da sinalização da via <i>Gqi-AMPC</i>	22
Figura 8. Reguladores do ciclo celular envolvidos na tumorigênese hipofisária	24
Figura 9. Esquema do papel de <i>MEG3</i> na ativação da via de supressão tumoral dependente de <i>p53</i>	26
Figura 10. Boxplot da expressão de <i>CDKN1B</i> nos tumores ACTH, GH e ACNF	56
Figura 11. Boxplot da expressão de <i>PTTG</i> nos tumores ACTH, GH e ACNF ..	56
Figura 12. Boxplot da expressão de <i>MEG3</i> nos tumores ACTH, GH e ACNF .	57
Figura 13. Box plot da análise de cluster hierárquico do padrão de expressão dos genes <i>CDKN1B</i> , <i>PTTG</i> e <i>MEG3</i>	60
Figura 14. Principais moléculas envolvidas na desregulação do ciclo celular nos adenomas hipofisários.	71

RESUMO

Foltran RK. *Estudo molecular dos genes GNAS, PTTG, AIP, CDKN1B e MEG3 em adenomas hipofisários esporádicos* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: Os adenomas hipofisários são neoplasias benignas que representam cerca de 15% das neoplasias intracranianas. Em sua maioria ocorre de forma esporádica. Estudos moleculares desses adenomas identificaram anormalidades genéticas que podem ter um papel na sua tumorigênese. Dentre alguns desses genes foram descritos os oncogenes *GNAS* e *PTTG* e os genes supressores tumorais *AIP*, *CDKN1B* e *MEG3*.

OBJETIVO: realizar estudo molecular dos genes associados a tumorigênese através da pesquisa de mutações nos genes *GNAS*, *AIP* e *CDKN1B* e o estudo de expressão gênica de *CDKN1B*, *PTTG* e *MEG3* em adenomas aparentemente esporádicos, correlacionando com os dados clínicos e laboratoriais, em pacientes acompanhados no serviço de Endocrinologia do HCFMUSP. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Compreendeu 96 adenomas hipofisários aparentemente esporádicos: 41 somatotropinomas, 27 corticotropinomas, 21 adenomas clinicamente não funcionantes (ACNF) e 7 prolactinomas. Foi realizada avaliação retrospectiva dos dados clínicos e laboratoriais ao diagnóstico. Após a análise histológica por hematoxilina-eosina, foi realizada análise imunohistoquímica das proteínas Ki-67 e p53 e molecular do DNA genômico e RNA, extraídos do tecido tumoral. Análise mutacional das regiões codificantes de *AIP* e *CDKN1B* e dos hotspots de *GNAS* nos éxons 8 e 9 foi realizada através de amplificação por PCR e sequenciamento automático. A quantificação relativa do RNAm de *CDKN1B*, *MEG3* e *PTTG* foi avaliada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ por PCR em tempo real. **RESULTADOS:** Presença de mutações somáticas no gene *GNAS* (gsp⁺) em 14,5% dos adenomas. Não houve diferenças significativas clínicas e laboratoriais entre os adenomas gsp⁺ e gsp⁻. Variantes com potencial patogênico não foram identificadas nos genes *AIP* e *CDKN1B*. A análise imunohistoquímica do Ki-67 apresentou média de 1,32% (0,9-4,5) e do p53

média de 1,04 (1,0-1,8). O gene *CDKN1B* apresentou expressão média de ,12 $\pm$ 0,74 (0,1-3,1), com expressão mais baixa nos corticotropinomas. O gene *PTTG* apresentou expressão média de 2,49 $\pm$ 3,10 (0,2–19,0), com maior expressão nos corticotropinomas. O gene *MEG3* apresentou expressão média de 0,95 $\pm$ 1,38 (0,0-8,8), com valores mais baixos nos ACNF. Três padrões de *cluster* nos níveis de expressão de RNAm dos genes *CDKN1B*, *PTTG* e *MEG3* foram identificados: *cluster A* = *CDKN1B* $\geq$ 1,85/ *PTTG* $\geq$ 1,25/ *MEG3* $\geq$ 0,65 foi observado em 100% dos corticotropinomas; *cluster B*= *CDKN1B* $\geq$ 0,95/ *PTTG* $\geq$ 2,25/ *MEG3* $\geq$ 0,65 observado apenas nos somatotropinomas (32%) e o *cluster C*= *CDKN1B* $\geq$ 0,95/ *PTTG* $\geq$ 1,25/ *MEG3* $\geq$ 0,05 observado na maioria dos ACNF (73%). CONCLUSÕES: A maioria dos adenomas apresentaram índices de Ki-67 menor do que 3%. Em conformidade com este achado, a imunohistoquímica para p53 não se mostrou estatisticamente significativa. A mutação ativadora na proteína Gs α (gsp⁺) foi a mutação mais frequente em adenomas hipofisários esporádicos, principalmente em somatotropinomas. Não foram identificadas variantes com potencial patogênico nos genes *AIP* e *CDKN1B*, portanto, parece ser um evento raro em adenomas esporádicos. A expressão gênica aumentada do gene *PTTG* foi identificada principalmente nos corticotropinomas. No entanto, ela não foi preditiva de subtipo de adenoma. A expressão gênica do *CDKN1B* estava diminuída na maioria dos corticotropinomas e normal na maioria dos somatotropinomas e ACNF. A expressão gênica do *MEG3* estava diminuída na maioria dos adenomas ACNF e corticotropinomas e normal na maioria dos somatotropinomas. Na análise de *cluster* hierárquico, foram identificados três padrões de expressão gênica que se correlacionaram com subtipo de adenoma hipofisário.

Descritores: doenças da hipófise; adenoma hipofisário secretor de GH; adenoma hipofisário secretor de ACT; prolactinoma; tumorigênese; expressão gênica; mutação; oncogenes; genes supressores de tumor.

ABSTRACT

Foltran RK. *Molecular study of GNAS, PTTG, AIP, CDKN1B and MEG3 genes in sporadic pituitary adenomas* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

BACKGROUND: Pituitary adenomas are benign tumors that account for about 15% of intracranial tumors. Mostly occurs sporadically. Molecular studies of these adenomas identified genetic abnormalities that may have a role in tumorigenesis. Some of these genes have been described as the oncogenes *GNAS* and *PTTG* and tumor suppressor genes *AIP*, *CDKN1B* and *MEG3*. **OBJECTIVE:** perform a molecular study of genes related in tumorigenesis to evaluate presence of mutations in *GNAS*, *AIP* and *CDKN1B* genes and gene expression analysis of *CDKN1B*, *PTTG* and *MEG3* genes in apparently sporadic adenomas, correlating with the clinical and laboratory data from patients treated at the Endocrinology service of HCFMUSP. **SUBJECTS AND METHODS:** 96 apparently sporadic adenomas was included: 41 somatotropinomas, 27 corticotropinomas, 21 clinically nonfunctioning pituitary adenomas (NFPA) and seven prolactinomas. Retrospective evaluation of clinical and laboratory data from diagnosis. After histological analysis by hematoxylin-eosin staining, it was performed immunohistochemical analysis of Ki-67 and p53 proteins and molecular analysis of genomic DNA and RNA extracted from tumor tissue. Mutational analysis of coding regions of *AIP* and *CDKN1B* and hotspots exons 8 and 9 of *GNAS* was performed by PCR and automatic sequencing. Relative quantification of mRNA *CDKN1B*, *MEG3* and *PTTG* was evaluated by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using Real Time PCR. **RESULTS:** Presence of somatic mutations on *GNAS* gene (gsp⁺) in 14,5% of pituitary adenomas. There were no clinical and laboratorial differences between gsp⁺ and gsp⁻ somatotropinomas. Variants with pathogenic potencial were not identified in *AIP* and *CDKN1B* genes. Immunohistochemical analysis showed mean of 1,32% (0,9-4,5) for Ki-67 and mean of 1,04% (1,0-1,8) for p53. Gene expression of *CDKN1B* presented a mean of $1,12 \pm 0,74$ (0,1-3,1) with lower expression in corticotropinomas. Gene expression of *PTTG* presented a mean

of $2,49 \pm 3,10$ (0,2-19,0) with higher expression in corticotropinomas. Gene expression of *MEG3* presented a mean of $0,95 \pm 1,38$ (0,0-8,8) with lower expression in NFPA. Three cluster patterns in the levels of mRNA expression of genes *CDKN1B*, *PTTG* and *MEG3* were identified: cluster A = *CDKN1B* $\geq 1,85$ / *PTTG* $\geq 1,25$ / *MEG3* $\geq 0,65$ observed in 100% of corticotropinomas; cluster B= *CDKN1B* $\geq 0,95$ / *PTTG* $\geq 2,25$ / *MEG3* $\geq 0,65$ observed only in somatotropinomas (32%) and cluster C= *CDKN1B* $\geq 0,95$ / *PTTG* $\geq 1,25$ / *MEG3* $\geq 0,05$ observed in most of NFPA (73%). CONCLUSIONS: Most of the adenomas showed Ki -67 index lower than 3%. In accordance with this finding, immunohistochemistry for p53 was not statistically significant. The activating mutation in the Gs α protein (gsp⁺) was the most common mutation in sporadic pituitary adenomas, particularly in somatotropinomas. Variants with pathogenic potential have not been identified in the *AIP* and *CDKN1B* gene therefore seems to be a rare event in sporadic adenomas. Increased gene expression of *PTTG* was primarily identified in corticotropinomas. However, it was not predictive of adenoma subtype. The gene expression of *CDKN1B* was decreased in most corticotropinomas and normal in most somatotropinomas and NFPA. The gene expression of *MEG3* was decreased in most of NFPA and corticotropinomas, and normal in most somatotropinomas. In hierarchical cluster analysis was identified three patterns of gene expression that correlated with pituitary adenoma subtype.

Descriptors: pituitary diseases; growth hormone-secreting pituitary adenoma; ACTH-secreting pituitary adenoma; prolactinoma; tumorigenesis; gene expression; mutation; oncogenes; genes, tumor suppressor.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipófise

A glândula hipofisária tem um tamanho médio de 13 mm e localiza-se na linha média da base do cérebro no interior de uma área do osso esfenóide referida como a sela túrcica que a circunda inferiormente e lateralmente. A hipófise está em contato superiormente com o quiasma óptico e hipotálamo, bilateralmente com os seios cavernosos, e inferiormente pelo osso selar. A intercomunicação entre o hipotálamo e adenohipófise é conseguido através de uma rede veia porta (1).

São diversos os fatores e vias de sinalização envolvidos no processo de embriogênese e organogênese hipofisária. Para a determinação e diferenciação das células adenohipofisárias é necessária a expressão de fatores de transcrição específicos, tais como: O gene Pit-1 (Fator de transcrição positivo pituitário específico 1) ligado ao prop-1 está envolvido na diferenciação e proliferação de somatotrofos (GHRH) , lactotrofos (PRL) e tireotrofos (TSH); o SF1 (fator Introdução esteroidogênico 1) em gonadotrofos e o T-pit (Fator T Box relacionado a Brachyury (T)) em corticotrofos (2). As células hipofisárias diferenciadas sintetizam e secretam hormônios tróficos específicos, em resposta aos sinais de retroalimentação provenientes do sistema nervoso central e de órgãos periférico (3).

O gene Lhx3 (*LIM Homeobox Protein 3*) é um fator de expressão encontrado na hipófise (4). Camundongos transgênicos com alteração do Lhx3

possuem alterações no desenvolvimento hipofisário em fases muito precoces da formação glandular (5).

O gene Hes1 (*Hairy and Enhancer of Split 1*) é um efector essencial da via Notch, e, por sua vez, regula a manutenção das células indiferenciadas (células-tronco) (6).

O gene Otx2 (*Orthodenticle Homeobox 2*) codifica um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento normal do cérebro, cerebelo, glândula pineal e olho. Parece ter função direta no desenvolvimento do hipotálamo, da haste hipofisária e nos derivados da bolsa de Rathke (7).

O gene Prop1 (*Prophet Of Pit1, Paired-Like Homeodomain Transcription Factor*) é um fator de transcrição específico da hipófise. Além de ser necessário para iniciar a expressão do Pou1f1, também tem ação primordial na regulação inibitória da expressão do Hesx1, funcionando, portanto, como fator transcricional ativador e repressor, dependendo dos cofatores associados (8). Muitas linhas de evidências têm indicado que o Prop1 participaria continuamente não apenas do processo de desenvolvimento glandular hipofisário normal, especificação das linhagens celulares, mas também da proliferação celular após o nascimento (9). Alguns autores constataram a coexistência transitória de PROP1 com PIT1 (POU1F1), aventa a possibilidade de haver uma condição intermediária entre a fase de células progenitoras e a fase inicial de diferenciação. Assim, o Prop1 poderia funcionar como ativador precoce do gene Pou1f1 (10). Um dado que reforça a possibilidade de expressão do fator Prop1 na vida adulta é o seu envolvimento no processo de tumorigênese hipofisária. Observou-se maior expressão de PROP1 em tumores hipofisários produtores de ACTH (corticotropinomas) (11).

O gene *Pou1f1* (*POU Class 1 Homeobox 1*), também denominado *Pit1*, é um fator de transcrição hipofisário específico pertencente à família de homeodomínio POU. Ele é necessário para o desenvolvimento dos somatotrofos, lactotrofos e tireotrofos na hipófise anterior. Em humanos, mutações no *POU1F1* apresentam-se com deficiência de GH, PRL e graus variados de TSH, com hipoplasia do lobo anterior sendo identificada na maioria dos casos (5).

A hipófise pode ser dividida anatomicamente e funcionalmente em dois lobos: neurohipófise (posterior) e adenohipófise (anterior) (Figura 1). Através da imunohistoquímica e microscopia eletrônica foi possível identificar os diversos tipos celulares na adenohipófise, que são regulados por fatores hipotalâmicos liberadores ou inibidores. As células específicas e os hormônios que elas secretam são: somatotrofos que secretam o hormônio do crescimento (GH); lactotrofos que secretam prolactina (PRL), gonadotrofas que são secretoras do hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), tireotróficas que secretam o hormônio estimulador da tireóide (TSH) e as células corticotróficas, secretoras do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (12).

Figura 1. Anatomia da glândula hipofisária. LA= lobo anterior; LP= lobo posterior; LI= lobo intermediário. Fonte: Adaptado de Asa & Ezzat, 2009 (12).

1.2. Tumores hipofisários

Na região selar ocorre um conjunto diverso de patologias, como os tumores da hipófise, que condicionam uma grande variedade de doenças endócrinas, sendo fundamental o conhecimento dos seus aspectos fisiopatológicos, clínicos, de diagnóstico, de tratamento e de prognóstico (13).

Os tumores hipofisários representam cerca de 10% a 25% das neoplasias intracranianas (13). São compostos por células da hipófise anterior, sendo histologicamente benignos (adenomas) na sua quase totalidade, embora cerca de 5% a 20% destas neoplasias apresentem comportamento invasivo (14).

Os adenomas hipofisários malignos, carcinomas hipofisários, são raros e por não apresentarem um padrão histológico capaz de indicar malignidade são diagnosticados pela presença de metástases (15).

Os tumores da hipófise podem ser classificados de acordo com critérios de produção hormonal (classificação funcional), com critérios morfológicos (classificação anatômica e radiológica) e com critérios histoquímicos (classificação anátomo-patológica) (14).

Clinicamente, os adenomas hipofisários podem ser classificados em funcionantes e não funcionantes, dependendo da sua atividade hormonal (Tabela 1) (16, 17). Aproximadamente dois terços dos tumores diagnosticados são clinicamente funcionantes, e são responsáveis por síndromes clínicas características: os prolactinomas, que secretam PRL, acarretam galactorréia e hipogonadismo; os somatotropinomas, que produzem GH, levam à acromegalia

ou gigantismo; e, finalmente, os corticotropinomas, que hipersecretam ACTH, levam à doença de Cushing.

Raramente, os adenomas hipofisários produzem TSH, LH ou, também, FSH. Como já mencionado, podem também ser pluri-hormonais, onde a co-secreção mais comum é a de PRL e GH. Estes podem ser subdivididos em: secretores de prolactina/PRL (prolactinomas- disfunção gonadal e galactorréia), secretores de hormônio do crescimento/GH (somatotropinomas-acromegalia e gigantismo), secretores de hormônio corticotrófico/ACTH (corticotropinomas- doença de Cushing e síndrome Nelson), secretores de hormônio tireotrófico/TSH (tireotrofinomas- hipertireoidismo central) e secretores de gonadotrofinas (gonadotrofinomas-disfunção gonadal) (18).

Os adenomas clinicamente não funcionantes (ACNF) não apresentam quadro clínico de hipersecreção hormonal, porém na imunohistoquímica e na microscopia eletrônica, a maioria apresenta grânulos secretórios com conteúdo hormonal variado, que não se acompanha de secreção hormonal ou essa é tão pequena que não causa elevação dos níveis hormonais circulantes, sendo chamados de adenomas silenciosos. Uma minoria dos ACNF não apresenta evidência de produção hormonal pela imunohistoquímica, o que os classifica como adenomas *null cells*.

Tabela 1. Classificação clínico-patológica e incidência dos adenomas hipofisários

Adenomas funcionantes	Adenomas não funcionantes
Família GH/PRL/TSH	
1) Secreção de GH (14%) Somatotrofinoma densamente granulado Somatotrofinoma esparsamente granulado Mamossomatotrofinoma	Somatotrofinoma silencioso
2) Secreção de PRL (29%) Prolactinoma densamente granulado Prolactinoma esparsamente granulado Adenoma de células-tronco acidofílico	Lactotrofinoma silencioso
3) Secreção de TSH (1%) Tireotrofinoma (β TSH e subunidade α)	Tireotrofinoma silencioso
Família ACTH (13%) Secreção de ACTH: Corticotrofinoma	Corticotrofinoma silencioso
Família dos gonadotrofos (13%) Secreção de β FSH, β LH e subunidade α : Gonadotrofinomas	Gonadotrofinoma silenciosos
Outros adenomas (30%) Adenomas plurihormonais Adenomas não classificados	Adenomas null cell Oncocitomas Adenoma silencioso subtipo 3

Adaptado de Ironside, 2003 (17).

A classificação morfológica se baseia na dimensão e no grau de expansão e/ou invasão tumoral. Sob o ponto de vista dimensional, os adenomas são classificados em microadenomas (<10 mm) e macroadenomas ($\geq$ 10 mm) (14) e entre estes, há ainda os designados, adenomas gigantes (> 40 mm) (19).

Os tumores hipofisários podem expandir para três direções: supra-selar (para cima), infra-selar (para baixo) e parasselar (lateral). As razões para as diferenças no comportamento dos tumores hipofisários são pouco

compreendidas e não existem, até o momento, mecanismos confiáveis para prever sua invasibilidade. Vários biomarcadores têm sido investigados, incluindo alterações cromossômicas e microRNAs, marcadores de proliferação, oncogenes, genes supressores tumorais, fatores de crescimento e seus receptores e fatores relacionados a angiogênese e adesão celular. Entretanto, ainda não foi encontrado nenhum biomarcador único capaz de prever de forma independente o comportamento agressivo dos tumores hipofisários (20).

O estudo imunohistoquímico das proteínas Ki-67 e p53 tem sido amplamente utilizado como marcadores de proliferação celular, correlacionando principalmente com crescimento tumoral, invasividade e prognóstico dos adenomas hipofisários (21). A mais recente classificação de tumores endócrinos da WHO (*World Health Organization*) define como atípico os adenomas hipofisários com índice de Ki-67 maior que 3%, extensa positividade de p53 e elevado índice mitótico (22), porém o real valor desses fatores ainda é controverso. Uma razão para isso, é que tumores com índice de ki-67 maior que 3% e uma expressão extensa de p53 não são frequentes, mesmo em tumores com progressão pós-cirúrgica ou comportamento agressivo. Da mesma forma, a ausência destes dois fatores não excluiu comportamento agressivo clinicamente relevante (23).

O Ki-67, uma proteína nuclear presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) e ausente nas células quiescentes (G0), cuja função ainda é pobremente compreendida. Diversos estudos corroboram com a associação de recorrência tumoral e a imunoexpressão do Ki-67 em adenomas hipofisários. Nakabayashi *et al* (24) evidenciaram uma maior expressão de Ki-67 em tumores recorrentes em relação àqueles que não recorreram num

período de seguimento de 5 anos após cirurgia. Thapar *et al* (25) demonstraram que o índice Ki-67 foi menor em adenomas não-invasivos, três vezes maior em adenomas com invasão macroscópica e positivo (>3%) em cerca de 12% dos carcinomas hipofisários. Ao utilizar como ponto de corte do índice Ki-67, o valor de 3%, a sensibilidade e especificidades para diferenciação entre adenomas e carcinomas hipofisários foram de 72,7% e de 97,3%, respectivamente.

O *TP53* é um gene que codifica a proteína p53 e que participa na regulação do *checkpoint* no estágio G1 do ciclo celular, tendo, portanto, fundamental importância na manutenção da integridade do genoma ao permitir ações de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose (26). Embora mutações no p53 tenham sido raramente documentadas em adenomas hipofisários, a imunoreatividade à p53 tem sido descrita com boa correlação à invasividade tumoral. Em estudo prévio Thapar *et al* (27) evidenciaram expressão positiva da proteína p53 em 100% dos carcinomas hipofisários, 15% dos adenomas invasivos e nula nos tumores não-invasivos. Corroborando com estes dados, Shreiber *et al* (23), avaliando 160 adenomas clinicamente não-funcionantes, relataram que a p53 esteve presente em 20% desses tumores, todos eles com caráter invasivo. Ozer *et al* (28) demonstraram ainda que a expressão aumentada de p53 em tumores hipofisários poderia ser um indicador independente de recorrência local, sugerindo que o *status* do p53 pode estar associado à progressão tumoral

1.3. Tumorigênese hipofisária

A patogênese da formação tumoral na hipófise anterior tem sido intensamente estudada, porém, os mecanismos causais envolvidos na transformação das células hipofisárias normais e progressão da neoplasia permanecem pouco esclarecidos(29).

Os adenomas hipofisários são compostos por uma população celular de origem monoclonal (30). A origem monoclonal dos tumores pode ser analisada por meio do estudo do mecanismo de inativação do cromossomo X em células de mulheres, no qual a inativação de um dos cromossomos X, ou o de origem paterna ou materna, ocorre ao acaso, mas tem seu padrão mantido, ou seja, todos os descendentes clonais daquela célula terão o mesmo X inativado. Portanto, a observação de um mesmo padrão de inativação do cromossomo X nas células de um tumor, sugere que este tenha sido formado a partir da expansão clonal de uma única célula transformada, definindo sua origem como monoclonal (29).

Apesar da sua natureza monoclonal, estes tumores apresentam uma significativa diversidade e imprevisibilidade de comportamento biológico (30). Assim sendo, múltiplos esforços têm sido efetuados no para avaliação dos fatores de indução tumoral e da sua correlação com os estudos clínico-patológicos.

1.3.1. Células-tronco e tumorigênese hipofisária

A adenohipófise (hipófise anterior) possui origem na ectoderme oral e embriologicamente deriva da bolsa de Rathke, sendo composta de células que especificamente secretam hormônios, que são os corticotrofos, somatotrofos, gonadotrofos, mamosomatotrofo, tireotrofo e lactotrofo (31). Recentemente, diversas evidências demonstraram a presença de células-tronco/ progenitoras na glândula hipofisária (32), caracterizadas pela expressão de diversos fatores embriogênicos e de transcrição, proteínas de adesão celular e marcadores neuronais, podendo se diferenciar em cada linhagem da hipófise anterior (33). Já que as vias de desenvolvimento normal frequentemente estão desreguladas nas neoplasias, a relação da célula-tronco adulta com a tumorigênese dos adenomas hipofisários passou a ser estudada (34).

O modelo representado por Asa e Ezzat (12) (Figura 2) demonstra a ação de fatores de transcrição específicos implicados no desenvolvimento dos diferentes tipos celulares que possivelmente desempenham papel relevante na determinação da atividade hormonal, assim como na citodiferenciação dos adenomas hipofisários.

Figura 2. Citodiferenciação da adenohipófise. A adenohipófise deriva da ectoderme oral em um processo definido por uma série de fatores de transcrição que determina sua origem da bolsa de Rathke e três linhagens distintas de citodiferenciação. A diferenciação do corticotrofo e gonadotrofo é um processo terminal, mas as células da família Pit-1 podem sofrer uma transdiferenciação para somatotrofo, tireotrofo e lactotrofo. FONTE: Adaptado de Asa & Ezzat, 2009 (12).

1.3.2. Bases moleculares da tumorigênese hipofisária

A tumorigênese hipofisária parece resultar de uma complexa interação entre fatores genéticos e hormonais, que induzem alterações em diferentes vias de sinalização celular e que ligam o meio extracelular ao núcleo e à possível regulação da formação tumoral. Existe um número de eventos moleculares que aumenta a expressão de oncogenes ou que silenciam genes de supressão tumoral (35) (Figura 3). As alterações a nível genético podem também refletir desregulação hormonal hipotalâmica e hipofisária levando à hipersecreção de hormônios hipotalâmicos e fatores de crescimento (29). Apesar de cada vez mais ser evidenciado o papel dos reguladores do ciclo celular, supressores de tumor e oncogenes, ainda não está claro o mecanismo molecular inicial subjacente à tumorigênese destes tumores (34).

A maioria dos tumores da hipófise é esporádica, embora alguns casos possam ocorrer em contexto familiar e serem uma das manifestações de uma

síndrome de linhagem germinativa. Entre estas condições temos: a neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (MEN1), a síndrome com fenótipo *MEM1-like* (MEN4), o complexo de Carney (CNC) e as síndromes de tumores hipofisários isolados familiares (FIPA). Alguns genes específicos foram identificados na predisposição dessas síndromes, mas estes raramente estão envolvidos na patogênese dos tumores esporádicos (36).

Figura 3. Mecanismos envolvidos na tumorigênese hipofisária. FONTE: Adaptado de Melmed, 2011 (35).

1.3.2.1. Proto-oncogenes e oncogenes

Os proto-oncogenes, normalmente envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular, são genes que quando têm um ganho de função seja por aumento de expressão, mutação ou por translocação cromossômica, entre outros mecanismos, passam a ser denominados oncogenes e podem contribuir para a transformação neoplásica.

Diferente dos genes supressores tumorais, os produtos resultantes da ativação destes genes atuam de forma dominante, isto é, um único alelo mutante poderá ser suficiente para conferir à célula uma vantagem em termos de crescimento ou transformação, levando à neoplasia em uma série de tecidos humano, fazendo, assim, parte da tumorigênese (37).

1.3.2.2. Genes supressores tumorais

Os genes supressores tumorais geralmente codificam proteínas que inibem a proliferação celular e a perda de um ou mais desses genes reguladores podem contribuir para o desenvolvimento de diversos tumores malignos (37).

Geralmente, uma mutação em um gene supressor tumoral não ocorre perda de função completa do gene. Assim, atua de forma recessiva, isto é, ambos os alelos devem ser perdidos ou inativados para promover o desenvolvimento neoplásico, conforme hipótese de Knudson conhecida como teoria *two hit* ou dos dois eventos mutacionais: o primeiro evento é uma mutação germinativa em heterozigose no gene herdada de um parental (casos familiares) ou desenvolvida em um estágio embriogênico primário (casos esporádicos). No segundo evento, o alelo não afetado sofre uma alteração somática, caracterizando a perda da heterozigose (LOH) desse gene. A ocorrência desses dois eventos leva à inativação completa da proteína supressora de tumor o que resulta no descontrole do ciclo celular e, por fim, no desenvolvimento de neoplasias. Assim, uma mutação em heterozigose em gene supressor tumoral predispões o paciente à doença, mas esta desenvolve-

se somente após a inativação somática do segundo alelo nas células do tecido-alvo (38).

1.4. Genes envolvidos na tumorigênese de adenomas hipofisários esporádicos e em síndromes genéticas

Atualmente alguns genes já estão bem descritos na literatura na tumorigênese de adenomas hipofisários esporádicos. Dentre eles estão os proto-oncogenes *GNAS* e *PTTG*, e os supressores tumorais *AIP*, *CDKN1B* e *MEG3*.

1.4.1. Gene *GNAS*

O proto-oncogene *GNAS*, clonado em 1988 por Kosaza e cols.(39), possui tamanho de 20KB e localiza-se no braço longo do cromossomo 20 na região 13.1-13.2. Inicialmente a sequência de nucleotídeos foi descrita como contendo 13 éxons e 4 *splicing* alternativos localizados nos éxons 3 e 4 (39). Apresenta 95% de similaridade com a região codificante de seu homólogo em ratos (*Gnas*), e alta complexidade com múltiplos *splicing* alternativos formando transcritos que codificam várias proteínas e transcritos não traduzidos. Utilizando promotores alternativos, os principais produtos transcritos pelo gene *GNAS* são: a conhecida proteína $G_{s\alpha}$, a proteína neuroendócrina secretória 55 (NESP55), uma proteína semelhante à cromogranina com expressão em tecidos neuroendócrinos (medula adrenal, hipófise, hipotálamo, e outras regiões do cérebro); e as proteínas XLas (XLN1a e XLN1b), isoformas longas

da proteína $G_{s\alpha}$, que apresentam também expressão em tecidos neuroendócrinos (hipófise, adrenal, coração, pâncreas) com funções biológicas ainda não determinadas (39-42). Em humanos e camundongos, a região promotora do NESP55 sofre metilação do alelo paterno, sendo o alelo materno transcrito. Contrariamente, a região promotora da XLas está metilada no alelo materno com geração de transcritos a partir somente do alelo paterno. Estudos do padrão de metilação em ratos e fetos humanos, da região promotora do gene da proteína $G_{s\alpha}$, mostraram expressão bialélica em alguns tecidos (ossos), e monoalélica em outros (túbulo proximal do nefron) com *imprinting* paterno e expressão do alelo materno (43).

O gene *GNAS* codifica a subunidade α do complexo heterotrimérico da proteína G, $G_{s\alpha}$. Em nível hipofisário, a proteína G_s é necessária para a ativação da adenilato ciclase e para a produção de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) em células somatotróficas e corticotróficas em resposta ao hormônio do crescimento (GH) e ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), respectivamente (44). A ação estimulatória da proteína G_s reduz a atividade de GTPase, resultando no aumento da formação de cAMP (45).

A mutação ativadora na proteína $G_{s\alpha}$ (oncogene *gsp*) já foi identificada em somatotropinomas, corticotropinomas e adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes (46-50). Corresponde a uma mutação pontual do tipo *missense* em heterozigose em um dos dois *hotspots* da subunidade α da proteína G: códon 201 no éxon 8 ou códon 227 no éxon 9. A mutação no códon 201 é a mais frequente. O códon 201 CGT codifica para arginina e pode ser mutado para TGT (cisteína) ou CAT (histidina). O códon 227 CAG codifica para glutamina e pode ser mutado para CGG (Arginina) ou CTG (leucina). Estes

aminoácidos são essenciais para a atividade de GTPase intrínseca da proteína G_{α} (46). Essas mutações inibem a atividade de GTPase de G_{α} , com consequente diminuição da hidrólise de GTP e ativação ligante-independente (constitutiva) do GHRH (hormônio liberador de GH), com elevação do AMPc, e hipersecreção de GH e outros hormônios (51) (Figura 4).

Figura 4. Esquema do papel das mutações G_{α} na tumorigênese hipofisária através da ativação constitutiva da adenilato ciclase. FONTE: Adaptado de Dumitrescu & Collins, 2008 (52).

A prevalência do oncogene *gsp* tem sido bastante estudada em somatotropinomas e na maioria dos estudos aproximadamente 40% dos pacientes apresentam uma mutação (53-60). Porém esta prevalência atingiu 15% em um estudo brasileiro (61). Apenas quatro estudos avaliaram a prevalência do oncogene *gsp* em adenomas clinicamente não funcionantes que foi de cerca de 10% (49, 50, 53, 62).

Estudos demonstraram melhor resposta aos análogos de somatostatina em pacientes com tumores *gsp*⁺ (59, 63, 64). Esses resultados são

consistentes com estudos *in vitro* que demonstraram maior sensibilidade a análogos de somatostatina em células obtidas de tumores *gsp*⁺ e a ocorrência de resistência ao medicamento apenas nos adenomas *gsp*⁻ (56, 63).

Mutações ativadoras em G_sα também estão relacionadas com a síndrome genética McCune-Albright, uma síndrome em que ocorre hipersecreção de GH e de PRL em, respectivamente, 27% e 15% dos casos em associação com hiperplasia somatotrófica e/ou mamosomatotrófica ou somatotropinomas (36, 51). Ela foi identificada em todos os tecidos acometidos pela síndrome (osso, hipófise, ovário, pele, etc) e fibrodisplasia óssea (65, 66).

1.4.2. Gene PTTG

O gene *PTTG* (*pituitary tumor transforming gene*), localizado no cromossomo 5 região q33 foi isolado de tumores hipofisários de ratos, através da técnica de *differential RNA display*. A hiperexpressão do cDNA do *PTTG* murino causou transformação celular *in vitro* e indução *in vivo* de tumores em camundongos atímicos (67). A clonagem molecular do correspondente humano do *PTTG* também induziu transformação celular *in vitro* e *in vivo*, mostrando comportamento sugestivo de um oncogene (68). O *PTTG* expressou-se em tecidos humanos normais, principalmente em testículo, timo, cólon e intestino delgado, sugerindo o seu envolvimento no controle de funções normais de alguns órgãos, mas houve expressão abundante do seu mRNA em diversas linhagem celulares malignas humanas (68). A expressão do *PTTG* em 54 adenomas hipofisários foi estudada através de RT-PCR e foram demonstrados níveis aumentados na maioria dos tumores quando comparados aos tecidos

hipofisários normais. Foi observado também que a maior expressão de *PTTG* estava relacionada com a invasividade tumoral, mostrando que a hiperexpressão de *PTTG* é um marcador molecular de agressividade em adenomas hipofisários e que possui importante papel na tumorigênese hipofisária (69). Alguns estudos sugerem que o *PTTG* desempenha um papel vital na angiogênese tumoral.

O mecanismo exato pelo qual o *PTTG* provoca transformação celular permanece desconhecido. Alguns estudos sugerem que o *PTTG* pode induzir a expressão do fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (70, 71), do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (70, 72), e /ou da interleucina-8 (IL-8) (70). Um mecanismo adicional seria pela sua ação durante o ciclo celular. O *PTTG* atua no ciclo celular como securina, no checkpoint mitótico na interface metáfase-anáfase bloqueando a separação das cromátides irmãs através da sua ligação com a separina, prevenindo a degradação da coesina, e, assim, levando a aneuploidia e à instabilidade genômica (73, 74). Após, o *PTTG* é degradado, reaparecendo no início da fase S e atingindo um pico de expressão entre G2 e M (74). A instabilidade genética poderia, portanto, ser a causa dos efeitos transformadores e tumorigênicos da hiperexpressão de *PTTG*, bem como sua associação com a agressividade do tumor (Figura 5). A Instabilidade cromossômica de células hipofisárias hiperplásicas poderia proporcionar uma vantagem de crescimento na progressão tumoral (75). Adicionalmente, possui papel na modulação da transição das fases G1/S, interagindo com o fator de transcrição Sp1 e regulando a atividade transcricional do promotor da ciclina D3 (76).

Figura 5. Função da securina e aneuploidia causada por hiperexpressão de *PTTG*. Adaptado de Melmed, 2003 (75).

1.4.3. Gene *AIP*

O gene *AIP* localizado no braço longo do cromossomo 11, região q13 (77), é formado por 330 aminoácidos totalizando 6 éxons codificantes, não sofre *imprinting* e é expresso de forma ubíqua (78). A proteína resultante é um supressor tumoral que possui 37kDa e localiza-se no citoplasma celular (79). Três domínios tetratricopeptídeo (TPR) foram identificados na porção C-terminal da proteína AIP, e, de acordo com esses trabalhos, são essas regiões que caracterizam as interações e funções do AIP (80).

A proteína AIP também conhecida como XAP2 ou ARA9, foi identificada por dois grupos que buscavam ligantes da proteína de virulência X do vírus da

hepatite B (proteína X) e do receptor aril hidrocarbono (AHR ou receptor de dioxina) (78, 81). A função mais bem caracterizada de AIP é a estabilização do complexo citoplasmático formado por AHR e a proteína chaperona Hsp-90 (proteína de choque térmico 90) (82, 83). Esse complexo é desestabilizado na presença de agentes cancerígenos (como as dioxinas) ou na ausência de AIP, fazendo com que ocorra a migração do complexo para o núcleo. No núcleo, AIP se desprende do complexo multiproteico e retorna para o citoplasma, enquanto que o AHR interage diretamente com regiões de DNA promotoras XRE (elementos de resposta a xenobióticos) realizando a transcrição de genes específicos (82, 83). Na presença de mutação no gene *AIP* e formação de um receptor mutado, ocorre sequestro do AHR e inibição de sua função transcricional. Dessa forma, disruptores endócrinos como as dioxinas e outros poluentes ambientais poderiam atuar potencialmente como fatores levando à disfunção hipofisária (83) (Figura 6).

Figura 6. Esquema do papel de *AIP* na via de sinalização de xenobióticos. Fonte: Adaptado de Beckers *et al*, 2013 (84).

Além de estabilizar AHR, AIP também parece estar envolvido na via de sinalização do AMPc. A capacidade de interação de AIP com a PDE4A5 (uma fosfodiesterase dependente de AMPc) foi demonstrada *in vitro* (85). Essa fosfodiesterase atua na regulação dos níveis de AMPc através de sua degradação, regulando, assim, processos como a proliferação celular. Em um estudo, foi observado que a proteína AIP mutante perde a sua capacidade de interação com PDE4A5, possivelmente interferindo na cascata intracelular de AMPc (86).

Outro estudo recente (87), demonstrou que a ausência da proteína AIP causa um aumento na concentração de AMPc através da deficiência da sinalização de $G\alpha_i$ e o subsequente rompimento de diversos processos celulares, promovendo a desregulação de diversos processos biológicos como resposta imuno-inflamatória (Figura 7). A proteína $G\alpha_i$ é um inibidor do adenilato ciclase, e suas isoformas estão envolvidas na inibição da síntese de AMPc. Através de imunohistoquímica foi revelada em somatotropinomas com mutação no gene *AIP* significativa redução da expressão de $G\alpha_{i-2}$, isoforma mais predominante. Ainda não está claro porque a ausência de AIP causou a deficiência de $G\alpha_i$.

Figura 7. Esquema demonstrando como a ausência de AIP pode levar a tumorigênese hipofisária através da deficiência da sinalização da via G α i-AMPc. FONTE: Adaptado de Tuominen *et al*, 2015 (87).

O gene *AIP* está relacionado com o adenoma hipofisário familiar isolado (FIPA), uma síndrome rara que engloba somatotrofinomas familiares isolados (IFS) e a síndrome de predisposição ao adenoma hipofisário (PAP) (36). Apesar da possibilidade da ocorrência em qualquer tipo de adenoma hipofisário, o prolactinoma é o mais comum, compreendendo 40% de todos os tumores de FIPA. Somatotrofinomas correspondem a 30% dos tumores de FIPA e mamosomatotrofinomas a 7% (88). De acordo com estudos, portadores de FIPA com mutação *AIP* são pacientes mais jovens ao diagnóstico e com maior frequência de macroadenomas quando comparados aos pacientes sem mutação no *AIP* e aos adenomas esporádicos (83, 89).

A presença de mutação germinativa no gene *AIP* em adenomas hipofisários esporádicos é rara, podendo ocorrer entre 0 a 3% dos casos, não sendo relatada a presença de mutações somáticas dos tumores analisados (90-94). Um estudo de colaboração internacional de 36 centros, demonstrou que a mutação germinativa em *AIP* é predominante em pacientes masculinos,

jovens ao diagnóstico, com macroadenomas e invasibilidade em 93% e 56% dos casos, respectivamente (95). Em pacientes portadores de somatotropinomas, a mutação germinativa em *AIP* também predomina nos mais jovens ao diagnóstico e portadores de macroadenomas (95, 96)

1.4.4. Gene *CDKN1B*

O gene *CDKN1B* está localizado no braço curto do cromossomo 12 região 13.1 e codifica uma proteína nuclear denominada p27^{kip1}, composta de 198 aminoácidos, que atua como supressora tumoral, agindo como inibidora de quinase dependente de ciclina, regulando a progressão do ciclo celular (97, 98). A proteína p27^{kip1}, juntamente com p21^{kip1} e p57^{kip1}, fazem parte da família Cip/Kip (proteínas inibidoras de quinase dependentes de ciclinas), e possui diferentes funções dependendo do complexo ciclina-CDK em que está ligado. Atua regulando negativamente o ciclo celular, quando associado com o complexo ciclina-CDK2 e ciclina-CDK1, bloqueando as suas atividades, e quando associado aos complexos ciclina-CDK4 e ciclina-CDK6, regula positivamente o ciclo celular, aumentando as suas atividades (99) (Figura 8).

Figura 8. Reguladores do ciclo celular envolvidos na tumorigênese hipofisária. FONTE: Adaptado de Quereda e Malumbres, 2009 (100).

Estudos de animais *knock out* para esse gene indicaram a sua associação com a tumorigênese hipofisária ao demonstrar nesses animais, o desenvolvimento de hiperplasia/ tumor hipofisário aos 3 meses de idade e gigantismo (aumento de diversos órgãos) (101, 102).

Uma mutação em homozigose no gene *Cdkn1b* foi identificada em ratos e foi considerada responsável pela síndrome MENX, uma síndrome *MEN1-like* recessiva em ratos e como consequência, os animais afetados com MENX apresentaram grande redução da expressão da proteína p27Kip1(103). Neste mesmo estudo investigaram se a presença da mutação no homólogo humano *CDKN1B* poderia explicar alguns casos de “MEN1-like” que não apresentavam mutações no gene *MEN1*. Assim, mutação nonsense germinativa em heterozigose no gene *CDKN1B* foi identificada pela primeira vez em um paciente acromegálico sem mutação no gene *MEN1* e que apresentava tumor

hipofisário e hiperparatireoidismo (103). Como consequência deste achado foram realizados diversos estudos nos quais foram identificados outros tipos de mutações germinativas no gene *CDKN1B* de pacientes com características sugestivas de MEN1. Como resultado, uma nova síndrome MEN foi reconhecida pela OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) com o nome de MEN4 (104).

Posteriormente, mutação germinativa do tipo *frameshift* foi descrita em *CDKN1B* em uma paciente portadora de carcinoma de cervix, corticotropinoma e hiperparatireoidismo (105). No entanto, a prevalência de mutação no gene *CDKN1B* foi baixa em um estudo envolvendo 456 casos sem mutações no gene *MEN1* (106). Desta forma, a mutação somática no *CDKN1B* é muito rara tanto na acromegalia familiar quanto na esporádica (105, 107).

A proteína p27^{kip1} tem papel essencial na regulação do ciclo celular, e a sua expressão reduzida foi frequentemente observada em diversas neoplasias humanas, e uma significativa correlação entre baixa expressão de p27 e maior grau tumoral tem sido descrita (108). Foi sugerido que o p27 possui importante papel na tumorigênese de adenomas hipofisários humanos, devido a deficiência de p27 em camundongos mostrar uma específica propensão para o desenvolvimento de adenomas hipofisários, decorrentes do lobo intermediário e secretores de ACTH (101, 102, 109, 110).

1.4.5. Gene MEG3

O gene *MEG3* (*maternally expressed gene 3*) está localizado no braço longo cromossomo 14 região 32, e sofre *imprinting* no alelo paterno (111). Este

gene é um exemplo de lncRNAs (*long noncoding RNAs*), uma classe de genes, cujos produtos são longos RNAs não codificadores com tamanhos maiores que 200 nucleotídeos, que poderiam ter um importante papel na supressão tumoral (112).

MEG3 atua como gene supressor tumoral, aumentando a expressão da proteína supressora de tumor p53, e seletivamente ativando os genes alvo de p53. Zhou *et al* (113) verificou que *MEG3* promove ativação de p53, através do bloqueio da sua degradação mediada pela via MDM2 (Figura 9), estimulando a expressão de GDF15 (fator de diferenciação de crescimento-15), uma proteína da família TGF- β , que demonstrou inibir a proliferação de diversas linhagens celulares de câncer (114-117). Foi demonstrado também que *MEG3* pode inibir a proliferação celular sem a ativação de p53 e GDF15, indicando que *MEG3* pode atuar como supressor tumoral através de duas vias, uma dependente de p53 e outra independente (113).

Figura 9. Esquema do papel de MEG3 na ativação da via de supressão tumoral dependente de p53. FONTE: Garitano-Trojaola *et al*, 2013 (118).

Em humanos, *MEG3* é expresso em diversos tecidos normais, entretanto, há perda de expressão em adenomas hipofisários e em diversos

outras linhagens celulares de câncer, porém a re-expressão de *MEG3* inibiu a proliferação tumoral *in vitro* (113). Em um estudo (119), enquanto a hipófise normal apresentou expressão de *MEG3*, não houve expressão em nenhum somatotropinoma e adenomas não funcionantes. No entanto, em outro trabalho (120), demonstrou-se em tumores esporádicos que houve perda de expressão de *MEG3* em 78% de 14 adenomas clinicamente não funcionantes, e nos outros tipos de adenomas secretores sendo que em alguns casos de somatotropinomas, prolactinomas e corticotropinomas, o gene *MEG3* foi expresso em diferentes níveis, com hiperexpressão em alguns casos.

Resultados similares foram encontrados em um estudo no qual obtiveram perda de expressão de *MEG3*, com hipermetilação nas ilhas CpG da região promotora do gene, em adenomas hipofisários não funcionantes, e expressão de *MEG3* nos adenomas funcionantes (121). Em outro trabalho, hipermetilação na região promotora de *MEG3* também foi demonstrada, bem como sua associação à perda de expressão do gene, em adenomas hipofisários não funcionantes (122). Ainda neste estudo um tratamento de células cancerosas humanas com um agente demetilante resultou na expressão de *MEG3* nessas células.

2. OBJETIVOS

- Realizar uma avaliação molecular de genes relacionados a tumorigênese de adenomas hipofisários esporádicos, em pacientes acompanhados pelo serviço de Endocrinologia do HCFMUSP:
 1. Pesquisa de mutações nos genes *GNAS*, *CDKN1B* e *AIP*;
 2. Estudo da expressão gênica do gene *PTTG*, *MEG3* e *CDKN1B*;
- Correlacionar as alterações genéticas encontradas com as características clínicas (sexo, idade, quadro clínico, tamanho e/ou expansão tumoral) e grau de agressividade dos adenomas hipofisários, expressão imunohistoquímica de Ki-67 e P53.

3. CASUÍSTICA

3.1. Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (registro 11284, parecer nº 749.766/14). Os pacientes foram esclarecidos quanto aos objetivos e procedimentos e assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo 1).

3.2. População do estudo

3.2.1. Critérios de inclusão e de exclusão

Como critérios de inclusão os pacientes deveriam ter dados clínicos disponíveis que permitissem a coleta de dados para as correlações clínicas. As amostras teciduais de adenomas hipofisários ressecados foram selecionados pelos seguintes critérios:

- Confirmação histopatológica de adenoma hipofisário e imunohistoquímica positiva que confirmasse o diagnóstico do adenoma hipofisário suspeito;
- Amostra tecidual em quantidade e qualidade adequadas que permitem a avaliação proposta;

Foram excluídos os pacientes em que a análise imunohistoquímica da amostra tecidual foi compatível com hipófise normal.

3.2.2. Pacientes selecionados

Foram incluídos 96 pacientes portadores de adenomas hipofisários, submetidos à cirurgia transesfenoidal para retirada do tumor, acompanhados no serviço de Endocrinologia do HCFMUSP, subdivididos em quatro grupos:

- Grupo GH: 41 pacientes com somatotrofinoma;
 - Grupo ACTH: 27 pacientes com corticotrofinoma;
 - Grupo ACNF: 21 pacientes com adenoma clinicamente não funcionante;
 - Grupo PRL: 7 pacientes com prolactinoma;
- Em 96 foi realizado sequenciamento dos genes *GNAS*, *CDKN1B* e *AIP*;
 - Em 68 foi realizada expressão gênica dos genes *PTTG*, *CDKN1B* e *MEG3*
 - Em 77 foi realizada a técnica de imunohistoquímica do Ki-67 e P53

4. METODOLOGIA

4.1. Análise clínica

A caracterização da população do estudo envolveu análise de dados retrospectivos e prospectivos. Retrospectivamente, foram coletados dados relativos à idade ao diagnóstico, sexo, avaliação hormonal (GH, IGF-I, %ULNR-IGF-1, F, FU, PRL), tamanho tumoral, presença de quadro clínico de expansão tumoral, e evolução pós-operatória a curto (no primeiro ano pós-cirúrgico) e a longo prazo (após o primeiro ano de evolução pós-operatória). Nos pacientes submetidos à cirurgia foram coletados dados relativos aos níveis hormonais após cirurgia, diagnóstico imuno-histotológico e presença de recidiva. Avaliações referentes aos diversos tratamentos realizados também foram coletadas através de prontuário eletrônico e pelo sistema de dados de exames HCMED do HCFMUSP.

4.2. Avaliação laboratorial

As dosagens bioquímicas e hormonais foram realizadas no Laboratório Central e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42 do HCFMUSP.

4.3. Avaliação por exames de imagem

Os exames de imagem foram realizados pelo Instituto de Radiologia (InRad) do HCFMUSP.

4.4. Análise histológica diagnóstica

O exame anátomo-patológico de todos os tumores foi realizado rotineiramente na Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP. O tecido foi corado com hematoxilina-eosina para diagnosticar a presença de adenoma. Análise imunohistoquímica do tecido tumoral foi realizada para avaliar a presença dos hormônios hipofisários GH, PRL, LH, FSH, TSH e ACTH.

4.5. Análise imunohistoquímica das proteínas Ki-67 e p53

As proteínas Ki-67 e p53 foram estudadas por imunohistoquímica através da reação de imunoperoxidase, por dois patologistas, na Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP. Foram realizados os seguintes procedimentos: 1) desparafinização dos cortes de 3 μ de espessura, do material incluído em parafina através de incubação com xilol a 60°C por 15 minutos seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 15 minutos; 2) hidratação dos cortes em concentrações de etanol a 100% com 3 banhos de 30 segundos cada, etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada; 3) recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de ácido cítrico 10mM pH 6,0 (Merck, E.U.A.) em panela a

vapor (após a fervura da água da panela, colocar a cuba com as lâminas em solução de recuperação), por 40 minutos. Deixar esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente. Lavagens em água corrente e água destilada; 4) bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H_2O_2) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada; lavagens em água corrente e água destilada; lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10mM pH 7,4 por 5 minutos; 5) bloqueio de proteínas com Cas Block (Zymed) por 10 minutos a 37°C. Após escorrer, foi feita incubação com o anticorpo primário; 6) incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (SIGMA, E.U.A.) a 1,0% e azida sódica NaN_3 (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 min. a 37°C e, em seguida, 18 horas (overnight) a 4°C; lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada; 7) incubação com o bloqueador pós-primário (Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Newcastle, Reino Unido), por 30 minutos a 37°C. Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 3 a 5 minutos cada. 8) incubação com NovoLink (Polímero) do mesmo kit por 30 minutos a 37°C; 9) revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, E.U.A.) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfoxido (Labsynth) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37 °C; lavagens em água corrente e água destilada; 10) contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada; desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol

absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol e montagem em meio permanente (Entellan Merck) com lamínula.

Os controles utilizados na reação imunohistoquímica compreendem, um controle positivo sabidamente positivo para o anticorpo em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imunohistoquímicos.

A reação imunohistoquímica das proteínas Ki-67 e P53 foi realizada utilizando os anticorpos *Monoclonal Mouse Anti-Human Ki67 Antigen* (clone MIB-1, DAKO, cod. M7240) e *Monoclonal Rabbit Anti-Human p53 Protein* (clone 318-6-11, DAKO, cod. M3629).

A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico, onde foram observadas 100 células de 5 campos com aumento de 400X, escolhidos ao acaso. As leituras das lâminas de Ki-67 e p53 foram cegadas e realizadas em quintuplicatas por 2 avaliadores independentes. Dos 10 valores obtidos para cada paciente foram observados os valores mínimo, médio e máximo, sendo avaliadas de forma independente.

4.6. Análise Molecular

Os tumores foram coletados à fresco em condições estéreis durante o ato operatório e colocados imediatamente em tubo de polipropileno estéril para congelamento. Os tumores ficaram congelados em nitrogênio líquido e armazenados para uso posterior. A análise molecular foi processada no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, LIM25.

4.6.1. Extração de DNA e RNA de tecido hipofisário

O DNA e o RNA de tecido foram obtidos utilizando o AllPrep DNA/RNA kit® (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante. A concentração e qualidade dos ácidos nucleicos, foram analisados através da eletroforese em gel de agarose 1%, para avaliação das bandas (presença das bandas 18S e 28S ribossomais), e as concentrações das amostras foram avaliadas a partir da leitura em espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Scientific), com leituras consideradas satisfatórias para DNA e RNA com razão 260/280 entre 1,8-1,9 e 1,8-2,0, respectivamente. Assim, as amostras de RNA aprovadas prosseguirão com a confecção de cDNA.

4.6.2. Confecção do cDNA complementar

A confecção de cDNA foi realizada a partir das amostras de RNA total extraídas dos tecidos hipofisários dos pacientes, utilizando o kit *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen), seguindo o protocolo do fornecedor.

4.6.3. Estudo dos genes *GNAS*, *AIP* e *CDKN1B*

Todas as amostras de DNA genômico obtidas foram utilizadas na análise mutacional dos genes *GNAS*, *AIP* e *CDKN1B* utilizando amplificação por PCR seguida de sequenciamento automático. Todos os genes foram amplificados utilizando oligonucleotídeos específicos desenhados com o auxílio do programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Os oligonucleotídeos

foram analisados no programa *Gene Runner* para verificação da formação de possíveis estruturas internas (dímeros, *hairpin loops*, *bulge loops* e loops internos) e foi verificado também a especificidade dos primers utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do site do *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/>).

As reações de PCR foram levadas ao termociclador contendo um volume final de 25 µl utilizando-se 100-200 ng de DNA genômico, 200 µmol/L de dNTPs, 5 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 5,0 µl de tampão de PCR 5X e 1,25 U de *Taq polimerase*. As condições iniciais de ciclagem utilizadas na padronização foram: 96°C por 6 minutos, em seguida 30 ciclos de 94° por 30 segundos, temperatura de anelamento (especifica para cada par de oligonucleotídeos) por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, e 10 minutos a 72°C de extensão final. Os produtos da PCR foram corados com Blue Green Loading Dye I Safe (LGC) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% juntamente com o marcador de peso molecular, para verificação do tamanho do fragmento gerado sob luz ultravioleta.

As respectivas temperaturas de anelamento utilizadas na PCR de cada um dos éxons foram determinadas empiricamente e estão descritas nas tabelas 2, 3 e 4, juntamente com o tamanho do produto amplificado.

Tabela 2. Oligonucleotídeos sintetizados para amplificação dos éxons 7 a 10 do gene *GNAS* (ENST00000371100).

Éxons	Sequência (5'→ 3')	Fragmento	T anel. (°C)
7-10	AACTGTGGGACGGTCACTTC (S) TGCACGGGGTTCTTCTCTAT (AS)	830	57

S: senso; AS: Antisenso; T anel.: Temperatura de anelamento

Tabela 3. Oligonucleotídeos sintetizados para amplificação dos éxons do gene *AIP* (ENST00000279146).

Éxon	Sequência (5' → 3')	Fragmento	T anel. (°C)
1	GCCCCGAGACATTCCTAG (S) GTCGAGTTCTGCATGTGAGC (AS)	461	54
2	AGCCCCGTCCCTTATGCC (S) AGAAAGCGGGTGGCAGTCTAG (AS)	394	59
3	GAGTAGGGTCCCAGTTGTCAC (S) GGTCCTGCACAGGTTTTCTT (AS)	472	56
4-5	TCTGCTGCTGGTGTGTGATG (S) GCCTGCCGAGTAGAGGCATTTAGTCA (AS)	687	56
6	CCAATGAAGCATGAATGGTG (S) GGAGGGGCTAGGATTTGAAC (AS)	593	57

S: senso; AS: Antisenso; T anel.: Temperatura de anelamento

Tabela 4. Oligonucleotídeos sintetizados para amplificação dos éxons 1 e 2 do gene *CDKN1B* (ENST00000228872).

Éxons	Sequência (5' → 3')	Fragmento	T anel. (°C)
1	GTCGGGGTCTGTGTCTTTTG (S) GCCGAAAAGCAAGCTAAGG (AS)	699	57
2	GGGTGGAGGTAGTGGGTTTT (S) GCCTTCCCCATTGCTACTT (AS)	392	57

S: senso; AS: Antisenso; T anel.: Temperatura de anelamento

4.6.4. Sequenciamento automático

Cerca de 2,5 uL de cada produto de PCR foram purificados com 1 uL da mistura de enzimas *Shrimp* e *exonuclease I* (Amersham Science). Essa mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos, 85°C por 15 minutos e depois mantida no

gelo. Para a reação de sequenciamento foram misturados de 1-2uL de PCR purificado, 1,0uL de oligonucleotídeo (senso ou antisenso à 5 pmol), 2,0uL de Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem), contendo didesoxinucleotídeos terminadores marcados com compostos fluorescentes, e água desionizada estéril para um volume final de 10uL. A reação foi levada ao termociclador a 96°C por 2 minutos, seguindo-se de 36 ciclos: 96°C por 30 segundos, 58°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos.

Ao término do tempo de reação, o produto foi precipitado adicionando-se 25uL de isopropanol 100% (preparado antes do uso) 1uL de acetato de sódio a 3M e 1uL de EDTA a 125 mM e incubado por 15 min à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 4200 rpm a 4°C por 45 min e o sobrenadante descartado. Ao tubo foram adicionados 35uL de etanol 70% e centrifugado a mesma velocidade por mais 15min. O etanol foi completamente descartado invertendo-se o tubo sobre papel toalha e deixado secar sobre a bancada ao abrigo da luz.

A reação foi então ressuspensa em 3uL de formamida e submetido ao sequenciamento automático no equipamento *ABI3100xl Genetic Analyser* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com as seqüências de seus respectivos genes presentes na base de dados do *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/>) com o auxílio do software comercial *SequencherTM* (Gene Codes).

4.6.5. Análise *in silico* das variantes *missenses*

As variantes *missenses* identificadas foram submetidas a uma análise *in silico* através de softwares de predição. Foram utilizados dois programas que se baseiam na conservação evolucionária, SIFT (<http://sift.jcvi.org>) e PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>), e dois programas que se baseiam na estrutura e função protéica, Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>) e Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>).

4.6.5.1. SIFT

SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) é uma ferramenta computacional baseada na homologia, que classifica substituições de aminoácidos como tolerante ou intolerante e prediz se uma substituição em uma posição específica de uma proteína terá um efeito fenotípico. O algoritmo utilizado pela ferramenta é baseado na premissa de que a evolução proteica está correlacionada com a função proteica. Portanto, o alinhamento de proteínas de uma mesma família deve mostrar a conservação de resíduos de aminoácidos localizados em posições importantes para a função proteica (123).

Usando a matriz de valores posição-específica gerada, o algoritmo calcula as probabilidades normalizadas para todas as substituições de resíduos de aminoácidos possíveis em cada posição do alinhamento. As substituições que apresentam um valor de tolerância menor do que 0,05 são preditas intolerantes ou deletérias, enquanto aquelas que apresentam um valor maior do que 0,05 são preditas tolerantes (123, 124).

4.6.5.2. PANTHER

Panther é uma ferramenta de análise proteica através da conservação evolucionária, que estima o provável impacto funcional na proteína causado por uma determinada variante *missense* (125). Panther calcula o escore subPSEC (*substitution position-specific evolutionary conservation*), baseado em um alinhamento de proteínas evolutivamente relacionadas. O algoritmo utiliza o valor absoluto para que possa se obter um escore simétrico e então multiplica por -1 para aderir à convenção da matriz de substituição que quanto mais negativo o escore mais severa a substituição. Valores de subPSEC=0, são interpretados como funcionalmente neutro, enquanto que quanto mais negativo o valor de predição de subPSEC, mais deletéria é a substituição. O ponto de corte subPSEC=-3 indica uma substituição deletéria (126).

4.6.5.3. Mutation Taster

Mutation Taster é uma ferramenta utilizada para avaliação do potencial de causar doença de alterações na sequência do DNA. Integra informações de diferentes bancos de dados biomédicos e utiliza ferramentas de análise estabelecidas. As análises compreendem a conservação evolutiva, as alterações em sítios de *splicing*, a perda de características da proteína e mudanças que possam afetar a concentração de RNAm (127).

Utilizando a classificação de Naïve Bayes, Mutation Taster pode prever a alteração em causadora de doença (provavelmente deletéria), causadora de doença automático (conhecidamente deletéria), polimorfismo (provavelmente

inofensivo), polimorfismo automático (conhecidamente inofensivo). O valor de probabilidade próximo de 1 indica a alta segurança da predição(127).

4.6.5.4. Polyphen-2

PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*) é uma ferramenta usada na predição do impacto funcional e estrutural de substituições de aminoácidos em proteínas, utilizando considerações físicas e comparativas. PolyPhen-2 utiliza oito características baseadas na sequência e três características baseadas na estrutura, que são selecionadas automaticamente por um minucioso algoritmo iterativo. A maioria dessas características envolvem a comparação do alelo selvagem com o alelo mutante, definindo a substituição aminoácida. A significância funcional de uma substituição alélica é predita por características individuais através da classificação de Naïve Bayes. Uma variante poderá ser classificada como “provavelmente prejudicial” (escore maior que 0.85), “possivelmente prejudicial” (escore maior que 0.15 e menor que 0.85) e “benigna” (escore menor que 0.15) (128).

4.6.6. Estudo da expressão gênica do gene *PTTG*, *CDKN1B* e *MEG3*

O estudo da expressão gênica por PCR em tempo real foi realizado utilizando o kit de reação *QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen) e os primers de interesse PTTG (Hs_PTTG1_1_SG Cat. QT00044037), CDKN1B (Hs_CDKN1B_2_SG Cat. QT00998445) e MEG3 (RT2 qPCR, Cat. 330001).

O gene referência determinado para esse estudo foi o *GAPDH* (Hs_GAPDH_1_SG Cat. QT00079247), e a amostra calibradora utilizada foi um “pool” comercial de RNA de tecido hipofisário normal *Human Pituitary Gland Poly A+ RNA* (Clontech, Palo Alto, CA, EUA).

A corrida e leitura da reação ocorreram no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®), e os valores de quantificação relativa foram expressos como RQ (*relative quantification*), utilizando o *StepOne™ Software v2.3*.

Para avaliação da expressão gênica utilizou-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ na qual o RQ é o valor final (129). Com esse método, foi atribuída a média dos C_t (*threshold cycle*) das replicatas de todas as amostras, e os valores de cada amostra para cada gene de interesse foi normalizado pela média do C_t do gene referência *GAPDH*, representando a diferença de expressão (ΔC_t) entre a média das replicatas do gene alvo e a média do gene referência, e então foi feita a razão desse valor pelo dado da normalização da amostra calibradora (pool de tecido hipofisário normal) pelo gene referência, obtendo $\Delta\Delta C_t$, corresponde a diferença entre o ΔC_t de uma amostra tumoral e o ΔC_t da amostra calibradora, e finalmente é aplicada a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para o valor de RQ. Para a amostra calibradora, o valor de RQ atribuído será sempre 1, e os das demais amostras serão relativos a este. A hiperexpressão de um gene foi definida por um valor de expressão, número de vezes em que o gene alvo está expresso no tecido tumoral em relação ao tecido normal, maior ou igual a 2. A hipoexpressão foi definida por um valor de expressão menor ou igual a 0,5. E a expressão normal entre 0,5 e 2,0.

4.7. Análise Estatística

Os dados contínuos e semi-contínuos das variáveis foram comparados com a curva de Gauss e determinados como não paramétricos através do teste de Distância K-S (Kolmogorov-Smirnov) e pelo teste de Chapiro-Wilks e por isso poderão ser representados por média e desvio padrão (dados paramétricos) da amostra mediana e percentis 25 e 75 (dados não paramétricos), também poderá ser utilizada média geométrica quando a amostra apresentar alta frequência de valores modais (>20%).

Os dados determinados como não paramétricos na comparação de dois grupos independentes foram analisados utilizando o teste de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni, quando comparado três ou mais grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com a correção de Bonferroni e o pós-teste de contraste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

Os dados das variáveis de RNA tiveram seus valores absolutos ajustados utilizando a lógica “Fuzzy” assumindo o grau de pertinência um (01) ao valor calculado pelo percentil 75% de cada variável, transformando assim os valores em uma escala de pertinência, possibilitando a comparação das diferentes variáveis entre si.

Os dados categóricos foram representados por frequência absoluta (n) e relativa (%) sendo que as matrizes de contingência foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado de Pearson, sendo que as matrizes complexas (2x3, 3x4...) foram particionadas em matrizes simples para melhor determinação da causalidade.

As variáveis relacionadas a expressão proteica foram categorizadas utilizando a Curva ROC para determinação da variável de melhor acurácia frente aos desfechos clínicos e histopatológicos, para tal foi utilizada a área sob a curva (AUC), tanto a área total como a semi-área para comportamentos bimodais por análise visual da topografia da curva quanto ao seu comportamento assintótico. O ponto e nota de corte de cada variável foi determinado pelo maior valor da soma entre a sensibilidade e a especificidade em que corresponde ao ponto de maior inflexão da curva ROC.

A análise de cluster hierárquica é um processo em que partindo de uma população heterogênea, os elementos são agrupados de acordo com o padrão de semelhança e assim determina-se uma distância de corte para definir a formação dos grupos. Esta análise foi realizada para identificar semelhanças individuais na resposta clínica e outras características fenotípicas por técnica de cluster de k agrupamentos.

O método “Two Step” foi utilizado para pontuar a qualidade da clusterização com valores entre 0 e 1: valor adimensional. Quanto mais próximo a 1, melhor é a clusterização, com menos casos sendo deixados à margem dos clusters identificados.

Foi considerado para todo o estudo risco alfa menor ou igual a 5% de cometer erro tipo I ou de 1ª espécie e risco beta menor ou igual a 20% de cometer erro tipo II ou de 2ª espécie.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da casuística

Os pacientes foram provenientes do ambulatório de Neuroendocrinologia do HCFMUSP. A casuística deste estudo compreendeu 96 adenomas hipofisários aparentemente esporádicos, sem histórico familiar tumores hipofisários, separados em quatro grupos:

- Somatotropinomas- Grupo GH: consiste de 41 tumores (27 mulheres e 14 homens), com média de idade ao diagnóstico de 40,2 anos ($\pm 15,2$), sendo 37 macroadenomas e 4 microadenomas, com média de GH de 75,6 ng/mL ($\pm 199,1$), IGF-I de 964,5 ng/mL ($\pm 280,6$), % ULNR-IGF-1 (percentual acima do limite do superior do normal do IGF-I) de 364,1% (± 136) (Anexo 2).
- Corticotropinomas Grupo ACTH: consiste de 27 tumores (26 mulheres e 1 homem), todos casos confirmados de Cushing, com média de idade ao diagnóstico de 34,8 anos ($\pm 12,3$), sendo 13 macroadenomas e 14 microadenomas, com média de F 8h de 24,3 $\mu\text{g/dl}$ ($\pm 8,1$) e FU de 599,9 $\mu\text{g/24h}$ ($\pm 293,2$) (Anexo 3).
- Adenomas clinicamente não funcionantes- Grupo ACNF: consiste de 21 tumores (14 mulheres e 7 homens), com média de idade ao diagnóstico de 48,1 anos (± 11), sendo todos macroadenomas (Anexo 4).
- Prolactinomas-Grupo PRL: consiste de 7 tumores (5 mulheres e 2 homens), todos com indicação cirúrgica, com média de idade ao

diagnóstico de 20 anos ($\pm 7,5$), sendo 6 macroadenomas e 1 microadenoma, com média de PRL inicial de 1432 ng/mL (mediana= 500) (Anexo 5).

Na avaliação por ressonância magnética (RM) hipofisária, 95 (99%) dos adenomas foram visualizados. Apenas, um paciente (paciente de ID = C06) apresentou RM normal. Este paciente permaneceu no estudo, porque o exame anatomo-patológico do material ressecado foi de adenoma e o exame imunohistoquímico foi positivo para ACTH. Adicionalmente, o paciente evoluiu com remissão hormonal após cirurgia.

Na análise da imagem hipofisária, 80% foram classificados como macroadenomas, 24% com expansão infraselar, 51% com expansão supraselar, 46% com expansão paraselar (Tabela 5).

A cirurgia foi tratamento primário em 83%, enquanto no restante o tratamento primário foi medicamentoso como análogo de somatostatina (5%), bromocriptina (4%) e cabergolina (7%). Após o tratamento primário, 52% obtiveram remissão da doença, sendo que 48 pacientes haviam se submetido à cirurgia e um ao tratamento com cabergolina (Tabela 5).

Tratamento medicamentoso com análogo de somatostatina foi realizado em 24 pacientes com acromegalia e em um paciente com síndrome de Cushing, (28%). O agonista dopaminérgico, cabergolina, foi administrado em 22 pacientes portadores de acromegalia, sete pacientes portadores de síndrome de Cushing, nove portadores de tumor clinicamente não funcionante e sete prolactinomas (47%). Os tratamentos com cetoconazol (48%), mitotane (4%) e adrenalectomia (11%) foram realizados apenas nos pacientes com síndrome de Cushing. Tratamento secundário com radioterapia foi realizado em

7% dos casos. No último seguimento 66% dos pacientes haviam alcançado controle hormonal e 65% controle tumoral (Tabela 5).

Tabela 5. Dados clínicos dos pacientes.

		n	%
Tipo de tumor	ACTH	27	28%
	GH	41	43%
	PRL	7	7%
	ACNF	21	22%
Sexo	Feminino	72	75%
	Masculino	24	25%
Tamanho tumoral ao diagnóstico	Macroadenoma	77	80%
	Microadenoma	19	20%
Expansão Infraselar	Não	73	76%
	Sim	23	24%
Expansão Supraselar	Não	47	49%
	Sim	49	51%
Expansão Paraselar	Não	52	54%
	Sim	44	46%
Tratamento primário	AS	5	5%
	Brc	4	4%
	Cab	7	7%
	CIR	79	83%
Remissão da doença após tto primário	Não	46	48%
	Sim	49	52%
Nº Cirurgias	Uma	82	85%
	Duas ou mais	14	15%
Remissão da doença após cirurgia	Não	59	61%
	Sim	37	39%
Uso de análogo da somatostatina	Não	64	72%
	Sim	25	28%
Uso de Cabergolina	Não	51	53%
	Sim	45	47%
Uso de Cetoconazol	Não	14	52%
	Sim	13	48%
Uso de Mitotane	Não	26	96%
	Sim	1	4%
Adrenalectomia	Não	24	89%
	Sim	3	11%
Radioterapia	Não	89	93%
	Sim	7	7%
Controle hormonal final	Não	20	34%
	Sim	39	66%

Controle tumoral final	Não	28	35%
	Sim	52	65%

Tto =tratamento

Não foi possível incluir o grupo dos prolactinomas nas análises estatísticas devido ao tamanho amostral pequeno (n=7).

Ao correlacionar os dados clínicos dos pacientes entre os grupos de adenomas hipofisários (Anexo 6), foi verificado:

- O grupo ACTH teve percentual significativamente maior de pacientes do sexo feminino (96%) que o grupo GH (66%) e ACNF (67%), ($p<0,001$).

- A idade ao diagnóstico do grupo ACTH (mediana=34 anos, 27 – 42) foi significativamente mais jovem que o grupo ACNF (mediana= 48 anos, 43 – 56, $p<0,001$). A idade ao diagnóstico do grupo GH (mediana=39 anos, 26 – 50) foi significativamente mais jovem que o grupo ACNF ($p<0,012$).

- O percentual de pacientes portadores de macroadenomas nos grupos GH (90%) e ACNF (100%) foi significativamente maior que no grupo ACTH (48%), $p<0,001$.

- Tumores do grupo ACNF são significativamente maiores (mediana= 2,7 cm, 2,2 – 3,5) que o grupo ACTH (mediana=0,9 cm, 0,7 – 1,5, $p<0,001$), e maiores que o grupo GH (mediana=2,2 cm, 1,5 – 3,0, $p=0,006$). Os tumores do grupo GH são significativamente maiores que o grupo ACTH ($p<0,001$).

- A expansão infraselar foi mais frequente nos grupos GH (29%) e ACNF (48%) em relação ao grupo ACTH (0%), ($p<0,001$). A expansão supraselar foi mais frequente no grupo ACNF (100%) em relação ao grupo GH (61%) e ACTH (4%), ($p<0,001$). A expansão paraselar foi mais frequente em adenomas do

grupo GH (61%) e ACNF (57%) em relação aos do grupo ACTH (19%), ($p < 0,001$).

- Com relação ao número de tratamentos realizados, o grupo GH (mediana= 3,0, 1,0 – 3,0) foi submetido a um significativo maior número de tratamentos com relação ao grupo ACNF (mediana=2,0, 1,0 – 2,0, $p=0,048$). Não houve diferença significativa com relação aos outros grupos.

5.2. Análise imunohistoquímica de Ki-67 e P53

A expressão do Ki-67 médio foi de 1,32% (0,9 – 4,5), do Ki-67 mínimo foi de 0,99% (0,0 – 1,0) e do máximo foi de 1,84% (1,0 – 10,0).

A expressão do P53 médio foi de 1,04% (1,0 – 1,8), do mínimo de 1,0% (1,0 – 1,0) e do máximo de 1,21% (1,0 – 5,0).

Com relação a porcentagem de expressão de Ki-67 médio, foi verificado que o grupo ACTH (mediana=1,0%, 1,0 – 1,3) teve expressão maior ($p=0,040$) que o grupo ACNF (mediana=1,0%, 1,0 – 1,0). Não houve diferenças significativas correlacionando com o grupo GH (mediana=1,0%, 1,0 – 1,1).

Não houve diferenças significativas de expressão de P53 entre os grupos, que tiveram todos mediana= 1,0% (1,0 – 1,0).

Através dos valores mínimo, médio e máximo de Ki-67 e P53, foi identificado dois padrões de *cluster* hierárquico com valores de corte (Tabela 6). A maioria dos grupos obteve o padrão Ki-67 médio <1,8 / Ki-67 máximo <2,5, e com relação ao P53, a maioria obteve o padrão P53 médio <1,1 / P53 máximo <2,0, sendo que não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

Tabela 6. Análise de *cluster* hierárquico do padrão de expressão de Ki-67 e P53.

		Tipo de tumor						Significância (p)				
		ACTH		GH		PRL		ACNF		ACTH VS GH	ACTH VS ACNF	GH VS ACNF
		n	%	n	%	n	%	n	%			
Cluster Ki-67	Ki-67 médio <1,8 / Ki-67 máximo <2,5	18	82%	23	85%	4	67%	16	89%	0,751	0,533	0,720
	Ki-67 médio ≥1,8 / Ki-67 máximo ≥2,5	4	18%	4	15%	2	33%	2	11%			
Cluster p53	P53 médio <1,1 / P53 máximo <2,0	16	100%	19	95%	3	75%	14	82%	0,364	0,078	0,217
	P53 médio ≥1,1 / P53 máximo ≥2,0	0	0%	1	5%	1	25%	3	18%			

5.3. Análise mutacional

5.3.1. Análise de mutações no gene *GNAS*

Na análise de mutações no gene *GNAS* foram avaliados somente os *hotspots* éxons 8 e 9. Foram identificadas três mutações somáticas (*gsp*⁺) em heterozigose do tipo *missense*: p.Q227L (n= 1 somatotropinoma) e p.Q227R (n= 1 somatotropinoma) no códon 227 do éxon 9, e p.R201C (n= 2 corticotropinomas; 1 adenoma clinicamente não funcionante; 9 somatotropinomas) no códon 201 do éxon 8 (Tabela 7). Estes resultados foram repetidos e confirmados nas duas fitas (*Forward* e *Reverse*).

Adicionalmente, foram identificados dois polimorfismos do tipo intrônico previamente descritos nos bancos de dados de SNPs do NCBI: c.585+55C>G (ID: rs3730172) em 11 pacientes e c.586-42G>A (ID: rs1004902) em um paciente.

Tabela 7. Mutações identificadas em *GNAS* nos tumores hipofisários

Mutation ID	Localização	Alteração nucleotídica	Alteração proteica
COSM27888	Éxon 9	c.680A>T	p.Q227L
COSM27896	Éxon 9	c.680A>G	p.Q227R
COSM27887	Éxon 8	c.601C>T	p.R201C

Ao comparar as características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de somatotropinomas *gsp*⁺ e *gsp*⁻ (Anexo 7), não foram observadas diferenças quanto ao sexo, presença de macro e microadenomas, expansão tumoral e controle hormonal e tumoral final (Tabela 8). Quanto as variáveis contínuas, não foram observadas diferenças quanto a idade ao diagnóstico, GH basal, IGF-I basal, ULNR-IGF-I basal, diâmetro do tumor, nº de tratamentos realizados, expressão imunohistoquímica de Ki-67 e P53, e expressão gênica de *CDKN1B*, *PTTG* e *MEG3* (Tabela 9).

Tabela 8. Comparação dos dados categóricos entre os tumores *gsp*⁺ e *gsp*⁻

		Mutação <i>gsp</i> ⁺				Significância (p)
		Não		Sim		
		n	%	n	%	
Sexos	F	20	67%	7	64%	0,856
	M	10	33%	4	36%	
Mac/ Mic	Mac	27	90%	10	91%	0,931
	Mic	3	10%	1	9%	
Tumor Intraselar	Não	21	70%	8	73%	0,865
	Sim	9	30%	3	27%	
Expansão Infraselar	Não	22	73%	7	64%	0,545
	Sim	8	27%	4	36%	
Expansão Supraselar	Não	12	40%	4	36%	0,833
	Sim	18	60%	7	64%	
Expansão Paraselar	Não	13	43%	3	27%	0,350
	Sim	17	57%	8	73%	
Controle hormonal final	Não	12	40%	4	36%	0,833
	Sim	18	60%	7	64%	
Controle tumoral final	Não	14	47%	3	27%	0,264
	Sim	16	53%	8	73%	

Mac: Macroadenomas; Mic: Microadenomas

Tabela 9. Comparação dos dados contínuos entre os tumores *gsp*⁺ e *gsp*⁻

	Mutação <i>gsp</i> ⁺		Mann-Whitney Monte Carlo Significância (p)
	Não	Sim	
	Mediana	Mediana	
Idade ao diagnóstico (anos)	40,5 (26,0-52,0)	36,0 (26,0-46,0)	0,229
GH basal (ng/ml)	15,2 (5,4-69,0)	37,4 (9,6-76,0)	0,118
IGF-I basal (ng/ml)	992,5 (724,0-1114,0)	942,0 (871-1177,0)	0,337
%ULNR-IGF-1 basal	388,0 (300,0-435,0)	331,0 (258,0-396,0)	0,195
Diam máx tumor basal (cm)	2,0 (1,1-2,6)	2,2 (1,6-3,2)	0,271
nº de tratamento realizados	3,0 (1,0-3,0)	3,0 (1,0-3,0)	0,511
KI-67(%) Média	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,2)	0,154
KI-67(%) Mínimo	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	0,737
KI-67(%) Máximo	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-2,0)	0,184
P53 (%) Média	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	0,253
P53 (%) Mínimo	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	0,998
P53 (%) Máximo	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,0)	0,253

Gene CDKNB1 (RQ)	1,2 (0,5-1,5)	0,9 (0,7-1,1)	0,128
Gene PTTG (RQ)	1,2 (0,9-3,0)	1,3 (0,5-1,5)	0,178
Gene MEG3(RQ)	1,0 (0,6-1,8)	1,4 (0,7-1,5)	0,479

5.3.2. Análise de mutações no gene *AIP*

Na análise de mutações no gene *AIP* foram avaliadas todas as regiões codificantes do gene. Não foram identificadas mutações patogênicas, somente polimorfismos previamente descritos nos bancos de dados de SNPs do NCBI. Foi identificada as variantes alélicas do tipo missense p.R16H (n=1) e p.Q228K (n=94); as variantes silenciosas p.D172= (n=3) e p.A297= (n=1), uma variante na região UTR (*untranslated region*) c.*64G>A (n=1) e as variantes intrônicas c.468+111C>T (n= 51) e c.468+15C>T (n= 1) (Tabela 10).

Tabela 10. Polimorfismos identificados em *AIP* nos tumores hipofisários.

ID (dbSNP)	Localização	Alteração nucleotídica	Alteração proteica	MAF (Casuística)	MAF (1000 genomes)
rs14504709 4	Éxon 1	c.47G>A	p.R16H	A= 0.005	A=0.0006
rs641081	Éxon 5	c.682C>A	p.Q228K	C=0.071	C=0.1546
rs2276020	Éxon 4	c.516C>T	p.D172=	T=0.025	T=0.0563
rs35665586	Éxon 6	c.891C>A	p.A297=	A=0.005	A=0.0062
rs11534623 8	Éxon 6	c.*64G>A	-	A=0.005	A=0.0062
rs4084113	Íntron 3-4	c.468+111C> T	-	T=0.26	T=0.2768
rs26760727 4	Íntron 3-4	c.468+15C>T	-	T=0.005	NA

Obs: MAF (*minor allele frequency*). * valores de MAF descritos no banco de dados do 1000 genomes (<http://www.1000genomes.org/>).

5.3.3. Análise de mutações no gene *CDKN1B*

Na análise de mutações no gene *CDKN1B* foram avaliadas as regiões codificantes dos éxons 1 e 2. O éxon 3 não foi estudado por ser uma região não traduzida. Não foram identificadas mutações patogênicas, somente polimorfismos previamente descritos nos bancos de dados de SNPs do NCBI. Foi identificada a variante alélica do tipo missense p.V109G (n=58) e uma variante na região UTR do éxon 1 p.L332P (n=80) (Tabela 11).

Tabela 11. Polimorfismos identificados em *CDKN1B* nos tumores hipofisários

ID (dbSNP)	Localização	Alteração nucleotídica	Alteração proteica	MAF (Casuística)	MAF (1000 genomes*)
rs2066827	Éxon 1	c.326T>G	p.V109G	G=0.58	G=0.3592
rs34330	Éxon 1	c.-79T>C	-	T=0.2043	T=0.3383

Obs: MAF (*minor allele frequency*). * valores de MAF descritos no banco de dados do 1000 genomes (<http://www.1000genomes.org/>).

5.4. Análise *in silico* das variantes missense

Na análise *in silico* (Tabela 12), as variantes missense Q228K e V109G, tiveram resultados concordantes entre os programas utilizados, sendo preditas como não prejudicial. Já a variante R16H, não obteve resultados concordantes, tendo predição neutra apenas no programa Panther e prejudicial nos demais programas.

Tabela 12. Análise in silico das variantes missense

Programa	Q228K (AIP)	R16H (AIP)	V109G (CDKN1B)
SIFT	Tolerável Score: 1.0	Prejudicial Score: 0.02	Tolerável Score: 0.34
PANTHER	Substituição neutra subPSEC score: -1.28	Substituição neutra subPSEC score: -2.67	Substituição neutra subPSEC score: -1.79
Mutation Taster	Polimorfismo prob: 0.9999	Patogênico prob: 0.9989	Polimorfismo prob: 0.00157
Polyphen-2	Benigno Human Div Score= 0.00 Human Var Score= 0.00	Provavelmente prejudicial Human Div Score= 0.969 Benigno Human Var Score= 0.416	Benigno Human Div Score= 0.047 Human Var Score= 0.016

5.5. Estudo de expressão gênica

O anexo 8 mostra os valores de RQ (*Relative Quantification*), referentes às expressões dos genes selecionados, em cada amostra, obtidas pela RT-PCR quantitativa em tempo real.

Na casuística total, o gene *CDKN1B* apresentou expressão média de $1,12 \pm 0,74$ (0,1-3,1), enquanto que o gene *PTTG* apresentou expressão média de $2,49 \pm 3,10$ (0,2-19,0) e o gene *MEG3* apresentou expressão média de $0,95 \pm 1,38$ (0,0- 8,8).

Em relação ao gene *CDKN1B* (Figura 10) foi observado menor expressão no grupo ACTH, com mediana= 0,4 (0,2-0,7) em relação ao grupo GH com mediana= 1,1 (0,7-1,4) ($p = 0,004$) e em relação ao grupo ACNF com mediana= 1,5 (1,0- 2,0) ($p < 0,001$). O grupo GH teve expressão menor que o grupo ACNF ($p = 0,038$).

Figura 10. Boxplot da expressão de *CDKN1B* nos tumores ACTH, GH e ACNF.

Quanto ao gene *PTTG* (Figura 11), foi observado uma maior expressão no grupo ACTH com mediana= 4,4 (1,8-6,4) em relação ao grupo GH com mediana= 1,2 (0,8-2,2) ($p = 0,002$) e em relação ao grupo ACNF com mediana RQ= 1,0 (0,5-2,9) ($p = 0,003$). Não houve diferença significativa entre os grupo GH e ACNF ($p = 0,179$).

Figura 11. Boxplot da expressão de *PTTG* nos tumores ACTH, GH e ACNF.

Com relação ao gene *MEG3* (Figura 12), foi observado menor expressão no grupo ACNF com mediana= 0,0, (0,0- 0,1) com relação ao grupo GH com mediana= 1,0 (0,7-1,7) ($p < 0,001$) e em relação ao grupo ACTH com mediana= 0,3 (0,1- 0,4) ($p = 0,002$). O grupo ACTH obteve menor expressão de *MEG3* que o grupo GH ($p = 0,002$).

Figura 12. Boxplot da expressão de *MEG3* nos tumores ACTH, GH e ACNF.

Ao classificar os resultados em hipoexpresso ($RQ \leq 0,5$), expressão normal ($0,5 < RQ < 2,0$) e hiperexpresso ($RQ \geq 2,0$) (Tabela 13) e analisar estatisticamente (Anexo 9), foi detectada hipoexpressão do gene *CDKN1B* em uma prevalência maior no grupo ACTH (70%), em relação aos grupos GH (24%) ($p = 0,007$) e ACNF (7%) ($p = 0,001$). A hipoexpressão do gene *MEG3* foi detectada em uma prevalência maior no grupo ACNF (93%) e ACTH (80%) em relação ao grupo GH (16%) ($p = 0,000$). Foi observada hiperexpressão de *MEG3* em uma prevalência maior no grupo GH (22%) em relação ao ACNF (0%) ($p = 0,05$) e a expressão normal de *MEG3* foi observada mais no grupo

GH (62%) em relação aos grupos ACTH (10%) ($p = 0,003$) e ACNF (7%) ($p = 0,000$). A hiperexpressão do gene *PTTG* foi detectada em uma prevalência maior no grupo ACTH (70%) em relação aos grupos GH (30%, $n = 11$) ($p = 0,020$) e ACNF (27%) ($p = 0,032$).

O grupo PRL obteve expressão normal de *CDKN1B* em 60%, expressão normal de *PTTG* em 80% e hipoexpressão de *MEG3* em 100%. Não foi possível analisar estatisticamente devido ao pequeno tamanho amostral.

Na correlação entre os valores de expressão gênica com a dosagem hormonal, idade ao diagnóstico, tamanho tumoral, número de tratamentos realizados e expressão de Ki-67 e p53, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes. Apenas no grupo ACNF, houve uma correlação inversa entre a expressão gênica de *CDKN1B* e expressão imunohistoquímica de p53 ($p = 0,036$).

Tabela 13. Classificação dos resultados de expressão dos genes *CDKN1B*, *PTTG* e *MEG3*

		Tipo de tumor							
		ACTH		GH		PRL		ACNF	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Hipoexpressão ($RQ \leq 0.5$)	<i>CDKNB1</i>	7	70%	9	24%	1	20%	1	7%
	<i>PTTG</i>	0	0%	7	19%	1	20%	4	27%
	<i>MEG3</i>	8	80%	6	16%	5	100%	14	93%
Hiperexpressão ($RQ \geq 2,0$)	<i>CDKNB1</i>	0	0%	5	14%	1	20%	4	27%
	<i>PTTG</i>	7	70%	11	30%	0	0%	4	27%
	<i>MEG3</i>	1	10%	8	22%	0	0%	0	0%
Expressão Normal ($0.5 < RQ < 2.0$)	<i>CDKNB1</i>	3	30%	23	62%	3	60%	10	67%
	<i>PTTG</i>	3	30%	19	51%	4	80%	7	47%
	<i>MEG3</i>	1	10%	23	62%	0	0%	1	7%

5.5.1. Análise de *cluster* hierárquico do padrão de expressão dos genes

CDKN1B, *PTTG* e *MEG3*

Através de uma análise de *cluster* hierárquico, foi possível identificar três padrões de *cluster* nos níveis de expressão de RNAm dos genes *CDKN1B*, *PTTG* e *MEG3* entre os grupos de adenomas hipofisários (Tabela 14, Figura 13).

Cada cluster foi mais frequente em um tipo de adenoma. O padrão A = $CDKN1B \geq 1,85$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,65$ foi observado em 100% do grupo ACTH, enquanto o padrão B = $CDKN1B \geq 0,95$ / $PTTG \geq 2,25$ / $MEG3 \geq 0,65$ foi observado somente no grupo GH (32%) e o padrão C = $CDKN1B \geq 0,95$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,05$ foi observado na maioria do grupo ACNF (73%).

Tabela 14. Análise de *cluster* hierárquico do padrão de expressão dos genes *CDKN1B*, *PTTG* e *MEG3*

Cluster Hierárquico	Tipo de tumor								Significância (p)		
	ACTH		GH		PRL		ACNF		ACTH vs GH	ACTH vs ACNF	GH vs ACNF
	n	%	n	%	n	%	n	%			
A $CDKN1B \geq 1,85$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,65$	10	100	15	41	3	60	4	27			
B $CDKN1B \geq 0,95$ / $PTTG \geq 2,25$ / $MEG3 \geq 0,65$	0	0	12	32	0	0	0	0	0,004	0	0,004
C $CDKN1B \geq 0,95$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,05$	0	0	10	27	2	40	11	73

Figura 13. Box plot da análise de cluster hierárquico do padrão de expressão dos genes *CDKN1B*, *PTTG* e *MEG3*.

Ao correlacionar os dados categóricos e contínuos (Anexos 10 e 11) entre os padrões de clusters denominados de A, B e C verificou-se:

- $CDKN1B \geq 1,85$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,65$ vs $CDKN1B \geq 0,95$ / $PTTG \geq 2,25$ / $MEG3 \geq 0,65$ (A vs B):
 - Adenomas corados com GH ao diagnóstico mais frequente no cluster B (100%) em relação ao A (53%; $p=0,003$);
 - Adenomas corados com ACTH ao diagnóstico presente apenas no cluster A (31%; $p=0,028$);
- $CDKN1B \geq 1,85$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,65$ vs $CDKN1B \geq 0,95$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,05$ (A vs C):
 - Maior número de macroadenomas (96%) no cluster C em relação ao A (75%; $p=0,041$);

- Adenomas corados com ACTH ao diagnóstico presente apenas no cluster A (31%; $p=0,003$);
- Adenomas corados com TSH ao diagnóstico presente apenas no cluster C (17%; $p=0,014$);
- Idade ao diagnóstico mais jovem no cluster A com mediana= 31 anos (23 – 42) em relação ao cluster C com mediana=47 (33 – 55; $p=0,004$);
- Expressão de Ki-67 médio maior no grupo A com mediana=1,0 (1,0 – 1,9) que no grupo C com mediana=1 (1,0 – 1,0);
- CDKN1B $\geq 0,95$ / PTTG $\geq 2,25$ / MEG3 $\geq 0,65$ vs CDKN1B $\geq 0,95$ / PTTG $\geq 1,25$ / MEG3 $\geq 0,05$ (B vs C)
 - Adenomas corados com GH ao diagnóstico mais frequente no cluster B (100%) em relação ao C (43%; $p = 0,001$);
 - Uso medicamentoso de análogo de somatostatina mais frequente no cluster B (58%) em relação ao C (19%; $p = 0,021$);

6. DISCUSSÃO

6.1. Casuística

No presente estudo, algumas características clínicas dos adenomas hipofisários como idade, sexo, tamanho e extensão tumoral são concordantes com os dados da literatura (130-134) . O maior número de pacientes do sexo feminino no grupo ACTH está de acordo com a literatura. A incidência da doença de Cushing em mulheres é 3 a 4 vezes maior do que em homens , enquanto que acromegalia e ACNF ocorre com igual frequência em homens e mulheres (130). Em relação à faixa etária ao diagnóstico, ela foi menor nos grupos ACTH e GH em relação ao grupo ACNF. As manifestações clínicas dos ACNF são resultantes do efeito compressivo do tumor sobre as estruturas adjacentes, não havendo quadro clínico resultante da hipersecreção hormonal, o que poderia favorecer o ao retardo no diagnóstico destes tumores (132). Adicionalmente, este retardo poderia explicar o maior percentual de macroadenomas observado nos ACNF e no grupo GH quando comparado com o grupo ACTH. Nestes, em geral, prevalecem os microadenomas, apenas 4-10% dos tumores são macroadenomas (132-134). Em adenomas do grupo GH e ACNF, os macroadenomas estão presente na maioria dos casos e muitas vezes com invasão e/ou destruição de estruturas circunvizinhas (133). Em relação ao número de tratamentos realizados, o grupo ACNF apresenta menor número quando comparado ao grupo de GH e ACTH. Em concordância, com literatura (135), a cirurgia transesfenoidal foi um tratamento eficaz na resolução

do quadro clínico do pacientes, apenas seis pacientes necessitaram de reabordagem cirúrgica (Anexo 4). No ACNF, os objetivos do tratamento cirúrgico são: resolução de qualquer efeito de massa, preservação ou a restauração da função visual. Assim sendo, a cirurgia tem por objetivo a ressecção radical do tumor, apenas em casos onde o risco do procedimento não seja superior à de lesão importante de estruturas nobres. Em ACNF, a obtenção de estabilização do volume tumoral no seguimento a longo prazo elimina a necessidade de tratamento adicional. Em relação ao grupo GH e ACTH, o tratamento visa controle tanto da secreção hormonal quanto do volume tumoral, de forma que a não obtenção de um dos dois aspectos, determina a necessidade novas intervenções terapêuticas em busca da remissão destes parâmetros.

6.2. Imunohistoquímica de Ki-67 e p53

Em nossa casuística, a análise de cluster hierárquica da positividade da expressão imunohistoquímica das proteínas p53 e Ki-67 não demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre os pacientes em relação ao sexo, idade ao diagnóstico, níveis hormonais ao diagnóstico, tipos de adenomas, expressão gênica (*CDKN1B*, *PTTG* e *MEG3*), remissão da doença após tratamento primário e cirúrgico e controle hormonal e tumoral final. Provavelmente, este achado resultou dos valores baixos de positividade de Ki-67 e p53, demonstrando que esses marcadores não foram frequentes em nossa casuística, condizendo com comportamento biológico mais benigno de adenomas hipofisários. Alimohamadi *et al* (136), de forma semelhante, não

identificou diferença entre sexo, tamanho tumoral e idade com relação a expressão de Ki-67, porém observou maior expressão de p53 no sexo masculino e em macroadenoma. Jaffrain *et al* (137) foi observaram maior expressão de Ki-67 nos adenomas maiores, enquanto que Pinto and Bronstein (29) observaram que a expressão de Ki-67 foi independente do tamanho tumoral. Ferreira et al (138) avaliando ACNF, observaram relação do volume tumoral com p53, mas não com Ki-67. Portanto, apesar de em alguns estudos (25, 27, 28, 139), as proteínas Ki-67 e p53 terem sido relacionadas com agressividade, invasividade, progressão e/ou recorrência tumoral, ainda não há evidências claras destas correlações. Adicionalmente, diversas metodologias e diferentes definições de progressão tem sido utilizadas, o que dificulta a comparação, sugerindo a necessidade de uma padronização (140).

Apesar dos baixos valores de Ki-67, em nossa casuística o grupo ACTH foi o que apresentou maior média de expressão de Ki-67 ($p=0,040$), comparando com os outros grupos. De forma semelhante, Mastronardi et al (141), identificou índice de Ki-67 maior (5,47%) nos tumores secretores de ACTH em comparação com os tumores secretores de GH, PRL, TSH e FSH. Em outro estudo (142) 50% dos adenomas secretores de ACTH foram classificados como atípicos apresentando $Ki-67>3\%$.

6.3. Análise mutacional

A presença de mutação em Gs α (gsp⁺) foi identificada em 14,5% da casuística (14/96), sendo que a maioria foi portadora da mutação p.R201C (86%), no éxon 8, códon 201. Um paciente apresentou a mutação p.Q227L e

outro a mutação p.Q227R, ambos no éxon 9, códon 227. Todas as mutações foram observadas em heterozigose. As mutações no códon 201 também foram descritas na literatura como sendo as mais frequentes (54, 63, 143). A prevalência de *gsp*⁺ em ACNF foi de 5%, enquanto que em quatro estudos foi de aproximadamente 10% (49, 50, 53, 62). Com relação aos adenomas ACTH, a presença de *gsp*⁺ foi identificada numa prevalência de 8% corroborando com o resultado de um estudo que encontrou 6% (47). Na maioria dos estudos, a presença de *gsp*⁺ em adenomas GH tem uma prevalência de aproximadamente 40% (53-60). No presente estudo a prevalência de *gsp*⁺ em adenomas GH foi de 27%, resultado similar a outros estudos descritos (63, 144) e um pouco acima da prevalência encontrada em um estudo brasileiro (61). Em nossa casuística, comparando os pacientes portadores de adenomas GH *gsp*⁻ com os *gsp*⁺, ao diagnóstico os pacientes *gsp*⁺ não apresentaram maiores níveis hormonais, nem tumores mais invasivos, e após o tratamento, o percentual de remissão deste pacientes não foi superior aos adenomas *gsp*⁻. De forma semelhante, outros autores não identificaram diferenças fenotípicas e/ou bioquímicas significativas entre os mutados e não mutados (59, 145-147). No estudo brasileiro os pacientes portadores de adenomas GH *gsp*⁺ apresentavam ao diagnóstico maiores concentrações de GH e IGF-1 e tumores com diâmetros maiores, porém sem significância estatística (61). Estes achados estão em contraste com outros estudos, nos quais os adenomas GH *gsp*⁺ apresentavam menores diâmetros e eram menos invasivos do que os *gsp*⁻ (54, 58, 62, 143).

Diversas questões surgem ao estudar a relação genótipo/fenótipo das mutações em *GNAS* nos adenomas GH. A princípio, a presença da mutação

Gsα deveria conferir uma certa vantagem de crescimento nos tipos celulares em que o AMPc atua como sinal mitogênico. Os estudos avaliando linhagens celulares expressando a mutação Gsα observaram maior crescimento tumoral (148-150). Entretanto, estudo avaliando pacientes com tumores *gsp*⁺ não observou maior crescimento tumoral e taxa de recorrência, sugerindo que existem mecanismos capazes de compensar a ativação constitutiva da via AMPc (151). Uma possível explicação seria através da modulação das fosfodiesterases (PDEs), que são enzimas responsáveis pela hidrólise do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e do AMPc (152). Neste estudo foi demonstrado em adenomas GH *gsp*⁺ um aumento da atividade das isoformas das fosfodiesterases com maior especificidade para o AMPc, como o PDE4C e PDE4D. A maior atividade dessas PDEs seria um mecanismo de compensação para a ativação constitutiva da via AMPc, modulando manifestações fenotípicas como níveis de GH plasmático e tamanho tumoral, justificando a não diferença nesses parâmetros observados nos casos *gsp*⁺ deste estudo (152). Outra possível explicação seria a ação semelhante entre a proteína não mutada e a proteína truncada, ou seja, ativando constitutivamente a via AMPc (44, 153). Essa possibilidade se baseia nos achados de hiperexpressão do gene Gsα em tumores *gsp*⁻, no qual tanto a proteína mutada quanto a *wild-type* foram capazes de estimular a via AMPc-PKA promovendo proliferação celular (154).

No estudo atual, mutações com potencial patogênico no gene *AIP* não foram observadas. Estes dados estão em concordância com os da literatura em que mutações germinativas no gene *AIP* em tumores esporádicos são raras, podendo variar numa prevalência entre 0 e 4% (90-94, 155-157). Por outro lado, um estudo demonstrou uma prevalência de 8,6% de mutações *AIP* em

adenomas hipofisários esporádicos, e ao separar a casuística em pacientes pediátricos essa prevalência atingiu 22%. Resultados semelhantes também foram encontrados em outros estudos, demonstrando uma prevalência de 23,3% (idade ao diagnóstico $\leq$ 18 anos) (158) e 20,5% (idade ao diagnóstico $\leq$ 30 anos) (159). No presente estudo, prevalência de pacientes com idade ao diagnóstico menor ou igual 30 anos foi de 31% (30/96 pacientes). Comparando este grupo com os pacientes com idade superior a 30 anos ao diagnóstico, não houve diferença na avaliação hormonal, tamanho de tumor e resposta ao tratamento. Presença de mutação *AIP* não foi encontrada em ambos os grupos. Na análise mutacional do gene *AIP* foram encontradas alguns polimorfismos previamente identificados nos bancos de dados de SNPs do NCBI: p.R16H, p.Q228K, p.D172=, p.A297=, c.*64G>A, c.468+111C>T e c.468+15C>T. Na análise in silico, p.R16H foi a única variante do tipo missense que demonstrou ter potencial patogênico. A variante alélica p.R16H, que leva a troca de uma arginina por uma histidina no códon 16, foi identificada em heterozigose em um paciente do nosso estudo, ou seja, sem perda de heterozigose (LOH). Esta variante foi observada em um caso familiar isolado de acromegalia, não sendo identificada em 100 amostras controle avaliadas (160). Ela foi inicialmente descrita como uma possível mutação (160). Posteriormente, p.R16H também foi encontrada em amostras de sangue de pacientes com adenomas hipofisários esporádicos e sem a presença de LOH na amostra tumoral (94, 155, 159, 161). Entretanto, essa alteração foi encontrada em pacientes controles (94, 155, 162) indicando que a alteração p.R16H deve ser um polimorfismo raro. Confirmando essa hipótese, Igreja et al (163) estudou o papel de variantes missense no gene *AIP* na interação proteica de AIP com a

fosfodiesterase PDE4A5, e verificou que foi observada uma redução na ligação com PDE4A5, entretanto essa diferença não foi significativa em comparação ao alelo selvagem e não houve alteração na estrutura proteica. Portanto, R16H provavelmente representa um raro polimorfismo, como sugerido previamente (91).

Em relação a análise mutacional do gene *CDKN1B*, foram encontrados os polimorfismos p.V109G (n=58) e c.-79T>C (n=80), previamente identificados nos bancos de dados de SNPs do NCBI. A variante alélica p.V109G é o polimorfismo mais estudado do gene *CDKN1B* e anteriormente já foi associada a um pior prognóstico, maior risco de invasão e progressão de diversos tipos de tumores não hipofisários (164-167). Esta alteração está localizada no éxon 1 do gene *CDKN1B*, mais especificamente em um domínio de ligação de p27 com p38, uma proteína envolvida na degradação de p27 (168, 169). Recentemente um estudo demonstrou pela primeira vez uma correlação genótipo-fenótipo com a síndrome NEM1 no qual a variante p.V109G influencia na manifestação clínica de pacientes adultos NEM1 portadores de mutações truncadas no gene *MEN1* (170). Não há na literatura correlações deste polimorfismo com adenomas hipofisários esporádicos.

6.4. Expressão gênica de *CDKN1B*, *PTTG* e *MEG3*

Em nossa casuística foi observado hipoexpressão do gene *CDKN1B* (p27^{Kip1}) na maioria dos tumores do grupo ACTH (70%), enquanto que a expressão foi considerada normal na maioria dos tumores do grupo GH (62%) e ACNF (67%). Estudos demonstraram também baixa expressão de p27^{Kip1}

principalmente nos corticotropinomas, porém na maioria em nível proteico por imunohistoquímica, demonstrando que a regulação de p27^{Kip1} acontece em nível proteico, sendo um mecanismo pós-translacional, não interferindo no RNAm (100, 171-176). No presente estudo, foi observado que a expressão de *CDKN1B* no grupo ACNF teve correlação inversa com a expressão média de p53. Esse resultado pode estar relacionado com o achado pelo estudo de Zhao *et al* (177) que demonstrou em ratos que houve aumento nos níveis de expressão de p27^{Kip1} quando houve perda de expressão de p53 combinado com Rb1, sugerindo que a perda de p53 tem papel protetor ao p27^{Kip1}.

Em nossa casuística, a expressão do gene *PTTG* estava significativamente aumentada em 70% dos adenomas do grupo ACTH e normal na maioria dos tumores GH (51%) e ACNF (47%). Estes achados contrastam com os resultados da literatura, na qual a expressão aumentada do *PTTG* é observada na maioria dos adenomas hipofisários (178-183).

Os resultados são controversos nos estudos que investigaram uma potencial correlação entre a expressão do *PTTG* e os subtipos de adenomas hipofisários: secretores de GH, PRL, ACTH, FSH/LF e subunidade alfa, e ACNF (179-182). Em alguns estudos a expressão foi significativamente maior em tumores GH, quando comparados aos ACNF, mas não quando comparados com os outros subtipos. Estudo mais recente (183) observou maior expressão de *PTTG* em adenomas secretores de GH e que a expressão diminuía após tratamento com análogos da somatostatina. Portanto a associação de *PTTG* com o tipo de adenoma ainda permanece incerta.

Foi observado no presente estudo níveis baixos de expressão de *MEG3* em 93% do grupo ACNF (mediana=0,0; 0,0- 0,1) e em 80% dos adenomas do

grupo ACTH, enquanto que no grupo GH a maioria (62%) apresentou expressão normal. Esse resultado corrobora com estudos prévios. Zhao *et al* (122) observou a perda de expressão de *MEG3* em 93% dos ACNF, enquanto Mezzomo *et al* (120) observou em 78% dos ACNF e Gejman *et al* (121) também confirmou a perda significativa de expressão de *MEG3* em 100% dos ACNF. Estudo recente de Li *et al* (184), observou perda de expressão em 61,5% dos ACNF, e ao classificar os tumores por invasividade, essa frequência foi para 82,8% nos ACNF invasivos. Outro estudo (185) que avaliou todos os tipos de adenomas hipofisários, observou que os níveis de RNAm de *MEG3* estavam significativamente menores nos ACNF e adenomas secretores de ACTH, corroborando com os achados do presente estudo. Adicionalmente, Zhang *et al* (119) utilizando linhagens celulares derivadas de adenoma hipofisário, demonstrou que a perda de expressão de *MEG3* é observada em todos os tipos de linhagens celulares de adenomas hipofisários, bem como outras linhagens celulares de câncer humano.

6.5. Análise de cluster hierárquico da expressão gênica de *CDKN1B*, *PTTG* e *MEG3*

Em nossa análise estatística, foi observado a formação de três *clusters* hierárquicos de padrões de expressão gênica de *CDKN1B*, *PTTG* e *MEG3*. Segundo Einsen *et al* (186), a formação de *clusters* de padrões de expressão gênica demonstra uma forte tendência desses genes em compartilhar das mesmas funções e vias nos processos celulares. De fato, isso ocorre, já que estes três genes atuam no ciclo celular de alguma forma (Figura 14). A proteína

p27^{Kip1} codificada por *CDKN1B* faz parte da família Cip/Kip juntamente com p21^{Cip1} e p57^{Kip2}, que atuam regulando negativamente o ciclo celular quando ligados a ciclina-CDK2 e ciclina-CDK1 e positivamente quando ligados a ciclina-CDK4 e ciclina-CDK6 (99). *PTTG* atua no ciclo celular como securina, no checkpoint mitótico na interface metáfase-anáfase, bloqueando a separação das cromátides irmãs através da sua ligação com a separina, prevenindo a degradação da coesina (73, 74), e além disso possui papel na modulação da transição das fases G1/S, interagindo com o fator de transcrição Sp1 e regulando a atividade transcricional do promotor da ciclina D3 (76). *MEG3* participa do ciclo celular através da via de supressão tumoral dependente de p53, regulando a via MDM2 de degradação de p53, aumentando os níveis proteicos de p53 e promovendo a transcrição dependente de p53 (118).

Figura 14. Principais moléculas envolvidas na desregulação do ciclo celular nos adenomas hipofisários. Adaptado de JAFFRAIN-REA *et al*, 2013 (187).

Após análise de cluster hierárquico, foi verificado que cada um dos três clusters, obteve um padrão de expressão gênica que foi mais frequente em cada tipo de adenoma (grupos GH, ACTH e ACNF), e os achados significantes ao correlacionar os dados clínicos desses 3 cluster confirmaram a associação desses padrões de expressão gênica com o tipo de adenoma. Com isso pode-se sugerir que os adenomas que apresentem os padrões de expressão A ($CDKN1B \geq 1,85$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,65$), B ($CDKN1B \geq 0,95$ / $PTTG \geq 2,25$ / $MEG3 \geq 0,65$) e C ($CDKN1B \geq 0,95$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,05$) possuem uma tendência em serem identificados como adenomas do tipo ACTH, GH e ACNF, respectivamente (Tabela 15).

Tabela 15. Tipos de adenoma hipofisário mais frequente em cada *cluster*

<i>Cluster</i> Hierárquico		Tipo de adenoma mais frequente
A	$CDKN1B \geq 1,85$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,65$	ACTH
B	$CDKN1B \geq 0,95$ / $PTTG \geq 2,25$ / $MEG3 \geq 0,65$	GH
C	$CDKN1B \geq 0,95$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,05$	ACNF

7. CONCLUSÕES

No presente estudo avaliando adenomas hipofisários, assumidos como esporádicos, pode-se concluir:

1. A maioria dos adenomas apresentaram índices de Ki-67 menor do que 3%, limite considerado para classificar o adenoma como atípico. Em conformidade com este achado, a imunohistoquímica para p53 não se mostrou estatisticamente significativa.
2. A mutação ativadora na proteína *Gsα* (*gsp*⁺) foi a mutação mais frequente em adenomas hipofisários esporádicos, principalmente em adenomas do grupo GH. Não houve diferenças nas características clínicas e laboratoriais, agressividade, resposta aos tratamentos, remissão hormonal e remissão tumoral entre os pacientes portadores de adenomas GH *gsp*⁺ e *gsp*⁻.
3. Não foram identificadas variantes com potencial patogênico nos genes *AIP* e *CDKN1B*, portanto, parece ser um evento raro em adenomas esporádicos.
4. A expressão gênica aumentada do *PTTG* foi identificada principalmente nos adenomas ACTH. No entanto, ela não foi preditiva de subtipo de adenoma.
5. A expressão gênica do *CDKN1B* estava diminuída na maioria dos adenomas ACTH e normal na maioria dos adenomas GH e ACNF.
6. A expressão gênica do *MEG3* estava diminuída na maioria dos adenomas ACNF e ACTH e normal na maioria dos adenomas GH.

7. Na análise de cluster hierárquico, foram identificados três padrões de expressão gênica que se correlacionaram com subtipo de adenoma hipofisário. Este achado leva a sugestão de que adenomas que apresentem os padrões de expressão A ($CDKN1B \geq 1,85$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,65$), B ($CDKN1B \geq 0,95$ / $PTTG \geq 2,25$ / $MEG3 \geq 0,65$) e C ($CDKN1B \geq 0,95$ / $PTTG \geq 1,25$ / $MEG3 \geq 0,05$) possuem uma tendência em serem identificados como adenomas do tipo ACTH, GH e ACNF, respectivamente.

8. ANEXOS

Anexo 1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº
..... APTO:

BAIRRO: CIDADE
.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
.....

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:
.....

BAIRRO: CIDADE:
.....

CEP:
(.....).....

TELEFONE: DDD

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

ESTUDO MOLECULAR DOS GENES *GNAS*, *PTTG*, *AIP*, *MEN1*, *CDKN1B* E *MEG3* EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS ESPORÁDICOS

PESQUISADOR. **Dra. RAQUEL SOARES JALLAD**

CARGO/FUNÇÃO: **MÉDICO**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **60490**

UNIDADE DO HCFMUSP: **UNIDADE DE NEUROENDOCRINOLOGIA DO SERVIÇO DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA – DIVISÃO DE CLÍNICA MÉDICA I**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☒

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : dois anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s) “essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. **Os tumores hipofisários podem ou não produzir hormônios. Dependendo do tipo de hormônio produzido o paciente apresenta uma doença diferente como o aumento do hormônio do crescimento (acromegalia), aumento do cortisol (doença de cushing), aumento da PRL (prolactinoma). No entanto, o quadro clínico, a elevação hormonal e a resposta ao tratamento variam entre pacientes com o mesmo tipo de tumor. Este estudo visa pesquisar a presença de alterações genéticas em pacientes com tumores hipofisários, que possam justificar essas variações.**

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros; **Para este estudo, além dos exames de rotina, será coletado amostra do tumor de pacientes durante o ato cirúrgico, indicado para o tratamento da doença.**

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – **coleta de sangue será realizada através de punção periférica de veia de antebraço.**

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3; **dor e arroxeamento eventuais no local da punção para a coleta do exame de sangue.**

5 – Benefícios para o participante: **Não há benefício direto para o participante, pois trata-se de estudo que avalia se há alterações genéticas relacionadas com sintomas dos pacientes com adenomas hipofisários.**

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: **não há.**

7– Garantia de acesso em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas referentes aos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa. O principal investigador é a **Dra. RAQUEL SOARES JALLAD** e a Pesquisadora Executante é **RENATA KIKUCHI FOLTRAN** que podem ser encontrados no endereço Rua Dr. Enéas de Vracalho Aguiar, 155 5º andar, bloco 4B ambulatório de Endocrinologia,

telefones: 3069-6745 3069-6293 / 3069-6624. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442, ramal 26 E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8– É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11– Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo referido.

Li este documento e seu conteúdo foi explicado para mim por **Dra. RAQUEL SOARES JALLAD/ RENATA KIKUCHI FOLTRAN**. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Forneço, de livre e espontânea vontade, meu consentimento para participar deste estudo, sabendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

☐ Sim, eu recebi uma cópia assinada do termo de consentimento livre e esclarecido.

Paciente _____ Assinatura Data ____/____/____

(nome em letra de forma)

Responsável legal _____ Assinatura Data ____/____/____

(para casos de sujeito de
pesquisa menor de 18 anos de
idade, analfabeto, semi-
analfabetos, mentalmente
incapaz ou portador de

Testemunha _____ Assinatura Data ____/____/____

(para casos de sujeito de
pesquisa menor de 18 anos de
idade, analfabeto, semi-
analfabetos, mentalmente
incapaz ou portador de

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido
deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Pesquisador Responsável _____ Assinatura Data ____/____/____

Dra. RAQUEL SOARES JALLAD

(nome em letra de forma)

Pesquisador Executante _____ Assinatura Data ____/____/____

RENATA KIKUCHI FOLTRAN

(nome em letra de forma)

Anexo 2. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes portadores de somatotropinomas

Paciente		Idade ao diag.	Sexo	Antes do tratamento			Mac/Mic	Tumor		Tto. inicial	IH	Cirurgia Remissão	Pós operatório			Remissão hormonal
Nº	ID			GH (ng/ml)	IGF-I (ng/ml)	%ULNR- IGF-1		Tamanho (cm)	Expansão				AS	Cab	RT	
A1	BFM	21	F	220,7	1171	343	Mac	ND	supra, infra,paraselar	Cir	GH/PRL difuso	N	S	S	N	N
A2	BCCB	26	F	1,1	344	107	Mac	2,3 X 1,9 X 1,8	supra e paraselar	Cir	GH focal	N	S	S	N	S
A3	CMM	36	F	47,8	1177	396	Mac	3,0 x 2,0	supra e paraselar	Cir	GH difuso >50%	N	S	S	N	S
A4	DS	52	F	1261,0	1074	461	Mac	ND	supra e paraselar	Cir	GH/PRL difuso >50%	N	S	S	N	N
A5	DGM	18	M	1,7	923	202	Mac	1,7x1,0x2,0	supraselar	Cir	GH/PRL difuso >50%	N	N	N	N	S
A6	DCS	39	M	183,0	1206	435	Mac	2,6 x 2,3 x 2,0	supra, infra, para	Cab	PRL 10- 50%; GH difuso >50%	N	S	S	N	N
A7	EMMS	37	F	99	1136	435	Mac	4,0 x 2,5 x 2,0	supra e paraselar	Cir	GH difuso >50%	N	S	N	N	S
A8	EOC	71	M	6,4	784	426	Mac	0,8 x 1,4 x 1,7	IS	Cir	GH difuso >50%	N	S	S	N	S
A9	EOG	30	F	35,5	854	288	Mac	ND	supra e paraselar	Cir	GH difuso >50%	N	S	N	N	S
A10	ERS	46	F	9,6	942	383	Mac	1,7 x 1,6 x 1,5	supra e infra	Cir	GH difuso >50%	S	N	N	N	S
A11	FH	41	F	6,3	487	176	Mac	3,5x 2,8 x 2,1	supra, infra, para	Cir	PRL 10-50% ; GH difuso >50%	S	N	N	N	S
A12	GCB	29	M	25	1150	387	Mac	11x16 x 15	IS	AS	GH>50,TSH ,LH e FSH 10-50%	N	S	N	N	N
A13	IMCS	46	F	9,6	1096	470	Mac	1	IS	Cir	GH e PRL >50	N	S	s	N	N
A14	IJN	72	M	24,1	988	537	Mic	0,7	infra	Cir	GH difuso, LH e FSH focal	N	N	S	N	N
A15	LCM	26	M	15,1	1078	316	Mac	1,8	IS	Cir	PRL 10- 50%, GH difuso >50%	S	N	N	N	S
A16	LFS	24	M	69	1003	312	Mac	1,8 x 1,6 x	infra e	Cab	GH difuso	N	S	S	N	S

A17	LMP	62	F	18,9	524	146	Mac	1,8 3,2 x 2,8 x 2,3	paraselar supraselar	Cir	>50% GH difuso >50%	S	N	S	S	S
A18	LAC	26	F	1,6	524	189	Mac	2,0 x 1,0 x 1,5	supra, infra, para	Cir	GH/PRL >50	N	N	N	N	N
A19	LCF	34	M	6,2	871	314	Mic	0,6	IS	Cir	GH >50%, PRL 10-50%	N	N	S	N	N
A20	MMMS	73	F	14,3	1588	863	Mac	2,2	paraselar	AS	GH difuso > 50%	N	S	S	N	N
A21	MMM	35	F	5,4	392	132	Mac	2,5	supraselar	Cir	GH/PRL	N	S	S	N	S
A22	MBH	54	F	37,9	1072	460	Mac	2,2	supraselar	Cir	GH difuso > 50%	N	S	S	N	N
A23	MGR	46	F	2,9	724	350	Mac	1,0 x 0,7 x 1,1	supraselar	Cir	GH difuso > 50%	S	N	N	N	S
A24	MEFH	52	F	20,6	1297	557	Mac	2,5 x 2,1 x 2,3	supra, infra, para	AS	GH difuso > 50%	N	S	N	n	S
A25	MRM	50	F	124	721	348	Mac	2,2 x 2,2 x 1,5	supra, infra, para	AS	GH>50% PRL 10-50%	N	S	S	N	S
A26	MBH	58	M	2,9	661	300	Mac	0,6	IS	Cir	GH difuso > 50%	S	N	N	N	S
A27	MV	55	F	27,2	997	405	Mac	ND	supraselar	Cir	GH difuso > 50%	S	N	N	N	S
A28	NNC	18	F	75,3	1481	324	Mac	3,4 x 3,0 x 2,5	supra e paraselar	Cir	GH difuso > 50% LH e FSH focal GH focal < 10 % e PRL focaL10 E 50%	N	S	S	N	N
A29	OR	20	M	3,4	957	389	Mic	0,8 X 0,7	IS	Cab		S	N	N	N	S
A30	PCRBS	37	F	221,8	1241	448	Mac	3,7 x 2,7 x 1,6	supra, infra,parasel ar	Cir	GH difuso > 50%	N	S	N	N	N
A31	PGTS	38	M	8,1	721	260	Mac	4,9 x 4,0 x 4,0	supra, infra,parasel ar	Cab	PRL focal 10-50% e GH< 10%	ND	S	S	N	N
A32	RB	30	M	76	829	258	Mac	3,7 x 4,0 x 3,2	supra e paraselar	Cir	GH focal	N	S	S	N	N
A33	RR	39	F	37,4	1498	541	Mac	2,2 x 1,4 x 1,7	infra e paraselar	Cir	GH/PRL >50	N	S	S	N	S
A34	RMSC	21	F	16	1114	402	Mac	1,4 x 1,5 x 1,4	supraselar	Cir	GH difuso > 50%	S	N	N	N	S
A35	RCSS	50	F	3,7	871	374	Mac	1,2 x 1,0 x 1,0	paraselar	Cir	GH difuso > 50%	S	N	N	N	S
A36	SU	22	F	139	1128	331	Mac	2,2	supra e paraselar	AS	GH > 50% das células	N	S	S	N	S

A37	SG	48	M	8,38	976	397	Mic	0,9 x0,6	IS	AS	GH> 50%	S	N	N	N	S
A38	SJF	40	F	6,3	931	357	Mac	1,0 x 1,1 x 1,3	paraselar	Cir	GH> 50%	S	N	N	N	S
A39	SEM	61	F	3,5	1032	469	Mac	1,1	IS	Cir	GH> 50%	S	N	N	N	S
A40	VPO	44	F	148,8	1087	416	Mac	2	supra e paraselar	Cir	GH> 50%	N	S	S	N	S
A41	WS	25	M	76	895	226	Mac	2,5 x 2,0 x 2,5	supra, infra,parasel ar	Cir	GH> 50%	N	S	S	N	N

ID= identificação pelas iniciais do paciente; ND= informação não disponível; N= não; S=sim; mac= macroadenoma; mic= microadenoma; IS= intraselar; tto= tratamento; IH= imunohistoquímica; Cir= Cirurgia; AS= análogo de somatostatina; Cab= cabergolina; RT= radioterapia; IGF= Fator do crescimento do Tipo Insulina 1; %ULNR-IGF-1= percentual acima do limite do superior do normal do IGF-I.

Anexo 3. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes portadores de corticotropinomas

Paciente																	
Nº	ID	Idade ao diag.	Sexo	F 8h (µg/dl)	FU (µg/24h)	Mac/Mic	Tumor Tamanho (cm)	Expansão	IH	Remissão pós op.	Ceto	Cab	Mit	Adre	AS	RT	Nº tto
C01	APA	27	F	39,0	245	Mic	0,7	N	ACTH	N	S	S	N	N	N	N	4
C02	ASA	27	F	39,0	ND	Mic	0,7	N	ACTH	S	S	N	N	N	N	N	2
C03	ARV	43	F	15,7	445,2	Mac	2,5	SCD	ACTH	S	S	N	N	N	N	N	2
C04	AAR	70	F	21,7	269,2	Mac	1,5	N	ACTH	S	N	S	N	N	N	N	2
C05	ASSS	34	F	27,9	736,0	Mic	0,8	N	ACTH	S	S	S	S	S	N	S	6
C06	BKSO	14	F	26,4	1110,0	Mic	RM normal	N	ACTH	S	S	S	N	S	N	S	5
C07	DRT	30	F	18,9	578,0	Mac	4,0	SCE	ACTH	N	N	N	N	N	N	S	2
C08	DPM	25	F	22,0	624,0	Mac	1,6	N	ACTH	S	S	S	N	N	N	N	3
C09	DCRA	25	F	26,7	568,0	Mac	0,7	N	ACTH 50, GH 10, PRL 10	S	S	N	N	N	N	N	2
C10	EFSS	39	F	24,7	610,0	Mic	0,6	N		N	N	N	N	N	N	N	1
C11	EPS	28	F	ND	ND	Mic	0,9	N		S	S	S	N	S	N	S	5
C12	EDSL	34	F	14,1	156,0	Mac	1,6	SCE	ACTH	S	N	N	N	N	N	N	1
C13	FKA	24	F	23,1	514,0	Mac	1,2	SCD	ACTH	S	N	N	N	N	N	N	1
C14	IRAS	50	F	23,2	395,0	Mac	1,8	SCD	ACTH	N	N	S	N	N	N	N	2
C15	LCB	49	F	26,0	600,0	Mic	0,3	N	ACTH	S	S	N	N	N	N	N	2
C16	LMGA	41	F	32,7	611,5	Mac	1,0	N	ACTH	S	N	N	N	N	N	N	1
C17	MBP	38	F	29,3	650,0	Mic	0,8	N	ACTH	S	N	N	N	N	N	N	1
C18	MMRS	47	F	16,7	925,0	Mac	1,1	N	ACTH	S	N	N	N	N	N	N	1
C19	MJR	29	F	14,3	724,0	Mic	0,9	N	ACTH	S	S	N	N	N	N	N	2
C20	NBF	14	F	28,8	1207,0	Mac	1,9	N	ACTH	S	N	N	N	N	N	N	1
C21	OMPS	51	F	25,6	380,0	Mic	0,8	N	ACTH	S	S	N	N	N	N	N	2
C22	OSF	31	F	16,1	304,0	Mic	0,7	N	ACTH, PRL, GH	S	N	N	N	N	N	N	1
C23	SSCM	38	F	19,6	671,0	Mic	0,3	N		S	S	N	N	N	N	N	2
C24	SJMO	40	F	25,5	638,0	Mic	RM duvidosa	N	ACTH	S	N	N	N	N	N	N	1
C25	TCPL	42	F	7,0	80,0	Mac	1,0	N	ACTH	Silent	N	N	N	N	N	N	
C26	TMN	32	M	26,3	771,0	Mic	0,9	N	ACTH		N	N	N	N	N	N	1
C27	VSA	20	F	41,9	1186,0	Mac	2,0	SCE	ACTH		S	N	N	N	S	N	3

ID= identificação pelas iniciais do paciente; ND= informação não disponível; N= não; S=sim; Mac= macroadenoma; Mic= microadenoma; F 8:h= cortisol sérico às 8h ; FU= cortisol urinário ; SCE= seio cavernoso E; SCD= seio cavernoso D; pós op.= pós operatório; tto= tratamento; IH= imunohistoquímica; Ceto= cetozonazol; Cab= cabergolina; Mit= Mitotane; Adre= Adrenalectomia; AS= análogo de somatostatina; RT= radioterapia

Anexo 4. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes portadores de adenomas clinicamente não funcionantes

Paciente		Idade ao diag.	Sexo	Mac/Mic	Tumor		Nº Cir	IH	Cab	RT
Nº	ID				Tamanho (cm)	Expansão				
CNF1	ARFF	49	F	Mac	2,6x2x2,3 cm	Supra	1	TSH positivo focal 10-50%	S	N
CNF 2	ECS	63	M	Mac	ND	Supra, paraselar	1	ND	N	N
CNF 3	ESA	43	M	Mac	ND	Supra	2	Null cell	S	N
CNF 4	FAD	51	M	Mac	2,8 X 2,4 X 2,4 cm	Supra	1	TSH positivo focal< 10%	N	N
CNF 5	IAC	48	M	Mac	2,6x1,9x2,6cm	Supra,para,infra	1	Null cell,	N	N
CNF 6	JAL	63	M	Mac	6,0 x 5,0 x 3,5 cm	Supra,para,infra	1	ACTH/PRL/GH positivo focal< 10%	S	N
CNF 7	JFL	56	M	Mac	3,4 x 2,8 x 2,8 cm	Supra,para,infra	1	FSH /LH positivo focal< 10%	N	N
CNF 8	LIM	47	F	Mac	4x3,3x2,4 cm	Intra/supra e paraselar	1	ND	N	N
CNF 9	LRS	65	F	Mac	2,8 x 2 x 1,8 cm	Intra/supra e paraselar	2	TSH /LH positivos em < 10%	S	N
CNF10	MTSP	58	F	Mac	3,8 cm	Supra,para,infra	1	Null cell	N	N
CNF11	MS	43	F	Mac	4,2x2,2x2,2 cm	Supra	3	Null cell	S	N
CNF 12	MFFS	45	F	Mac	2,9x3,4x2,5 cm	Supra	1	null cell	N	N
CNF13	NBS	49	F	Mac	2,2x1,9x1,6 cm	Intra/supra e paraselar	1	ND	N	N
CNF14	NLLP	36	F	Mac	2,0x1,7x1,9cm	Intra/supra e paraselar	1	Null cell	S	N
CNF15	NMPF L	42	F	Mac	2,4 x 2,3 x 1,8 cm	Intra/supra e paraselar	1	Null cell	S	N
CNF16	PFS	47	M	Mac	2,7x2,1x2,5 cm	Intra/supra e paraselar	3	TSH /FSH positivos em < 10%	N	S
CNF17	PSO	26	F	Mac	ND	Supra	1	Null cell	S	N
CNF18	RAO	30	F	Mac	ND	Supra	2	Null cell	N	N
CNF19	SAR	33	F	Mac	1,3 x 1,2 cm	Supra	1	Null cell	S	N
CNF20	TRM	61	F	Mac	2,7x1,7x1,9 cm	Supra	1	Null cell	N	N
CNF21	VPM	56	F	Mac	3,5x3,5x3,2 cm	Intra/supra e paraselar	2	Null cell	N	N

ID= identificação pelas iniciais do paciente; ND= informação não disponível; N= não; S=sim; Mac= macroadenoma; Mic= microadenoma; IH= imunohistoquímica; Cir= Cirurgia; Cab= cabergolina; RT= radioterapia.

Anexo 5. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes portadores de prolactinomas

Paciente Nº	ID	Idade ao diag.	Sexo	PRL inicial (ng/ml)	Mac/Mic	Tumor Tamanho (cm)	Expansão	Tto. Inicial	Nº Cir	Cirurgia Remissão	IH	RT	Nº tto.
P01	AALA	14	M	6000	Mac	3,0	N	Brc	2	N	PRL	N	3
P02	FAAA	15	F	158	Mic	0,6	N	Cab	1	S	PRL >50% e GH 10-50%	N	2
P03	MTC	26	M	1000	Mac	5	Supra e pareselar E	Cab	3	N	ND	S	3
P04	PRG	18	F	500	Mac	1,6	Infraselar	Brc	1	N	PRL difuso	N	2
P05	RCAT	33	F	179	Mac	2,2	N	Brc	1	N	PRL >50%	N	2
P06	RLS	22	F	305	Mac	1,5	Supraselar	Brc	1	N	PRL >50%	N	2
P07	SVR	12	F	1883	Mac	2,8	Paraselar E	Cab	1	N	PRL >50%	N	2

ID= identificação pelas iniciais do paciente; ND= informação não disponível; N= não; S=sim; Mac= macroadenoma; Mic= microadenoma; tto= tratamento; IH= imunohistoquímica; Cir= Cirurgia; Cab= cabergolina; Brc: bromocriptina; RT= radioterapia; IGF= Fator do crescimento do Tipo Insulina 1; %ULNR-IGF-1= percentual acima do limite do superior do normal do IGF-I.

Anexo 6. Correlações dos dados clínicos categóricos entre os subtipos de adenomas

		Tipo de tumor								Significância		
		ACTH		GH		PRL		TCNF		Teste de Qui-quadrado de Pearson		
		n	%	n	%	n	%	n	%	ACTH vs GH	ACTH vs TCNF	GH vs TCNF
Sexos	F	26	96%	27	66%	5	71%	14	67%	<0,001	<0,001	0,949
	M	1	4%	14	34%	2	29%	7	33%			
Tumor Mac - Mic no basal	Mac	13	48%	37	90%	6	86%	21	100%	<0,001	<0,001	0,139
	Mic	14	52%	4	10%	1	14%	0	0%			
Expansão Infraselar	Não	27	100%	29	71%	6	86%	11	52%	<0,001	<0,001	0,153
	Sim	0	0%	12	29%	1	14%	10	48%			
Expansão Supraselar	Não	26	96%	16	39%	5	71%	0	0%	<0,001	<0,001	<0,001
	Sim	1	4%	25	61%	2	29%	21	100%			
Expansão Paraselar	Não	22	81%	16	39%	5	71%	9	43%	<0,001	<0,001	0,771
	Sim	5	19%	25	61%	2	29%	12	57%			
Tratamento primário	AS	0	0%	5	13%	0	0%	0	0%	0,030	.	0,063
	Brc	0	0%	0	0%	4	57%	0	0%			
	Cab	0	0%	4	10%	3	43%	0	0%			
	CIR	27	100%	31	78%	0	0%	21	100%			
Remissão da doença após tto primário	N	4	15%	27	68%	6	86%	9	43%	<0,001	0,030	0,063
	S	23	85%	13	33%	1	14%	12	57%			
ImunoHisto - GH	Não	26	96%	0	0%	6	86%	20	95%	<0,001	0,856	<0,001
	Sim	1	4%	41	100%	1	14%	1	5%			
ImunoHisto - FSH	Não	27	100%	38	93%	7	100%	20	95%	0,151	0,252	0,698
	Sim	0	0%	3	7%	0	0%	1	5%			
ImunoHisto - PRL	Não	26	96%	26	63%	1	14%	20	95%	<0,001	0,856	<0,001
	Sim	1	4%	15	37%	6	86%	1	5%			
ImunoHisto - LH	Não	27	100%	39	95%	7	100%	19	90%	0,244	0,101	0,481
	Sim	0	0%	2	5%	0	0%	2	10%			
ImunoHisto - ACTH	Não	0	0%	41	100%	7	100%	20	95%	0,000	0,000	0,159

	Sim	27	100%	0	0%	0	0%	1	5%			
ImunoHisto - TSH	Não	27	100%	41	100%	7	100%	16	76%	.	<0,001	<0,001
	Sim	0	0%	0	0%	0	0%	5	24%			
Nº Cirurgias(cir)	Uma	26	96%	36	88%	5	71%	15	71%	0,227	0,015	0,110
	Duas ou mais	1	4%	5	12%	2	29%	6	29%			
Remissão da doença após cirurgia	N	16	59%	28	68%	6	86%	9	43%	0,446	0,259	0,053
	S	11	41%	13	32%	1	14%	12	57%			
Uso de análogo da somatostatina	N	26	96%	17	41%	0	0%	21	100%	<0,001	0,373	<0,001
	S	1	4%	24	59%	0	0%	0	0%			
Uso de Cabergolina	N	20	74%	19	46%	0	0%	12	57%	0,024	0,217	0,421
	S	7	26%	22	54%	7	100%	9	43%			
Uso de Cetoconazol	N	14	52%	0	0%	0	0%	0	0%	.	.	.
	S	13	48%	0	0%	0	0%	0	0%			
Uso de Mitotane	N	26	96%	0	0%	0	0%	0	0%	.	.	.
	S	1	4%	0	0%	0	0%	0	0%			
Adrenalectomia	N	24	89%	0	0%	0	0%	0	0%	.	.	.
	S	3	11%	0	0%	0	0%	0	0%			
Radioterapia	N	23	85%	40	98%	6	86%	20	95%	0,056	0,258	0,624
	S	4	15%	1	2%	1	14%	1	5%			
Controle hormonal final	N	0	0%	16	39%	4	57%	0	0%	0,013	.	.
	S	11	100%	25	61%	3	43%	0	0%			
Controle tumoral final	N	0	0%	17	41%	4	57%	7	33%	<0,001	0,030	0,534
	S	11	100%	24	59%	3	43%	14	67%			

Mac= Macroadenoma; Mic= Microadenoma; tto= tratamento.le

Anexo 7. Tabela dos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes portadores de somatotropinomas *gsp*⁺

Paciente		Mutação Gsa	Idade ao diag.	Sexo	Mac/mic	Tumor		GH (ng/ml)	IGF-I (ng/ml)	IGF-I LS (ng/ml)	%ULNR-IGF-1 (ng/ml)	Cirurgia Remissão	Pos operatório			
Nº	ID					Tamanho (cm)	Expansão						AS	Cab	RT	Remissão hormonal
A03	CMM	p.R201C	36	F	Mac	3,0 x 2,0	S	47,8	1177	297	396	N	S	S	N	S
A10	ERS	p.R201C	46	F	Mac	1,7 x 1,6 x 1,5 (CC x AP x LL)	S	9,6	942	246	383	S	N	N	N	S
A15	LCM	p.Q227L	26	M	Mac	1,8	N	15,1	1078	341	316	S	N	N	N	S
A17	LMP	p.R201C	62	F	Mac	32 x 28 x 23mm	S	18,9	524	358	146	S	N	S	S	S
A19	LCF	p.R201C	34	M	Mac	0,6 cm	N	6,2	871	277	314	N	N	S	N	N
A30	PCRBS	p.Q227R	37	F	Mac	3,7 x 2,7 x 1,6 cm	S	221,8	1241	277	448	N	S	N	N	N
A32	RB	p.R201C	30	M	Mac	3,7 x 4,0 x 3,2	S	76	829	321	258	N	S	S	N	N
A33	RR	p.R201C	39	F	Mac	2,2 x 1,4 x 1,7 cm (AP x CC x LL)	S	37,4	1498	277	541	N	S	S	N	S
A35	RCSS	p.R201C	50	F	Mac	1,2 x 1,0 x 1,0 cm	S	3,7	871	233	374	S	N	N	N	S
A36	SU	p.R201C	22	F	Mac	2,2	S	139	1128	341	331	N	S	S	N	S
A41	WS	p.R201C	25	M	Mac	2,5 X 2,0 X 2,5	S	76	895	396	226	N	S	S	N	N

ID= identificação pelas iniciais do paciente; N= não; S=sim; Mac= macroadenoma; Mic= microadenoma; AS= análogo de somatostatina; Cab= cabergolina; RT= radioterapia; IGF= Fator do crescimento do Tipo Insulina 1; %ULNR-IGF-1= percentual acima do limite do superior do normal do IGF-I.

Anexo 8. Valores de RQ (quantificação relativa) da PCR em tempo real dos genes *CDKN1b*, *PTTG* e *MEG3*

Identificação paciente	Tipo de tumor	<i>CDKNB1</i> (RQ)	<i>PTTG</i> (RQ)	<i>MEG3</i> (RQ)
A01	GH	0,3	0,5	0
A02	GH	1,3	7,1	0,6
A03	GH	0,7	1,5	1,5
A04	GH	NA	NA	NA
A05	GH	1,2	5,6	3,3
A06	GH	1,5	4,1	1,3
A07	GH	1,2	3,1	1,7
A08	GH	NA	NA	NA
A09	GH	1,1	1,1	0
A10	GH	1,2	0,5	1,3
A11	GH	1	0,3	0,6
A12	GH	2,4	1,9	0,6
A13	GH	1,6	2,6	3
A14	GH	NA	NA	NA
A15	GH	0,8	1,9	0,3
A16	GH	0,2	12,7	1
A17	GH	1,1	0,4	3,3
A18	GH	1,3	0,9	2,8
A19	GH	0,8	1,2	2
A20	GH	2,4	1,1	1
A21	GH	1	7,6	0
A22	GH	1,2	1	0,7
A23	GH	1,5	1,6	1
A24	GH	0,2	1,9	4
A25	GH	0,1	1,2	3,3
A26	GH	1,4	0,6	1
A27	GH	1,9	1	1,8
A28	GH	0,7	2	0,8
A29	GH	0,8	0,9	0,5
A30	GH	0,9	1,4	1,4
A31	GH	0,3	1,1	0,9
A32	GH	0,2	4,9	0,7
A33	GH	1	1,4	0,3
A34	GH	0,5	0,2	1
A35	GH	0,5	0,3	0,7
A36	GH	2,8	0,8	1,4
A37	GH	3,1	2,2	2,7
A38	GH	1,3	3	1,4
A39	GH	2,3	0,4	1,7
A40	GH	0,5	0,8	0,8
A41	GH	NA	NA	NA

C01	ACTH	0,3	0,9	0,1
C02	ACTH	NA	NA	NA
C03	ACTH	0,5	1,8	0,3
C04	ACTH	0,2	3,3	0,3
C05	ACTH	NA	NA	NA
C06	ACTH	NA	NA	NA
C07	ACTH	NA	NA	NA
C08	ACTH	NA	NA	NA
C09	ACTH	NA	NA	NA
C10	ACTH	NA	NA	NA
C11	ACTH	NA	NA	NA
C12	ACTH	NA	NA	NA
C13	ACTH	0,4	6,4	0,4
C14	ACTH	NA	NA	NA
C15	ACTH	NA	NA	NA
C16	ACTH	NA	NA	NA
C17	ACTH	0,1	6,5	0,2
C18	ACTH	NA	NA	NA
C19	ACTH	1,6	4,7	0,1
C20	ACTH	NA	NA	NA
C21	ACTH	0,2	19	8,8
C22	ACTH	0,1	5,7	0,1
C23	ACTH	NA	NA	NA
C24	ACTH	NA	NA	NA
C25	ACTH	NA	NA	NA
C26	ACTH	1,2	4,1	0,1
C27	ACTH	0,7	1,8	0,6
CNF01	ACNF	1,7	0,5	0
CNF02	ACNF	0,1	6	0,6
CNF03	ACNF	2,2	1,2	0
CNF04	ACNF	1	0,5	0
CNF05	ACNF	NA	NA	NA
CNF06	ACNF	NA	NA	NA
CNF07	ACNF	NA	NA	NA
CNF08	ACNF	1,8	5,2	0,1
CNF09	ACNF	1,2	0,7	0
CNF10	ACNF	2,2	1,1	0
CNF11	ACNF	NA	NA	NA
CNF12	ACNF	1,8	2,9	0
CNF13	ACNF	1,2	0,7	0
CNF14	ACNF	NA	NA	NA
CNF15	ACNF	2	0,7	0,1
CNF16	ACNF	1,3	1	0
CNF17	ACNF	2,1	1,1	0
CNF18	ACNF	0,8	0,2	0,3

CNF19	ACNF	1	0,4	0,3
CNF20	ACNF	NA	NA	NA
CNF21	ACNF	1,5	4,9	0
P01	PRL	1,1	1,3	0,3
P02	PRL	0,3	0,8	0,1
P03	PRL	NA	NA	NA
P04	PRL	0,8	0,6	0,3
P05	PRL	2,8	0,3	0
P06	PRL	NA	NA	NA
P07	PRL	0,8	1,8	0,3

NA: não avaliado

Anexo 9. Análise estatística da expressão dos genes *CDKN1B*, *PTTG* e *MEG3* entres os subtipos de adenomas

		Tipo de tumor										
		ACTH		GH		PRL		ACNF		ACTH VS GH	ACTH VS ACNF	GH VS ACNF
		n	%	n	%	n	%	n	%			
CDKNB1 (≤ 0.5)	Não	3	30%	28	76%	4	80%	14	93%	0,007	0,001	0,143
	Sim	7	70%	9	24%	1	20%	1	7%			
PTTG (≤ 0.5)	Não	10	100%	30	81%	4	80%	11	73%	0,136	0,075	0,535
	Sim	0	0%	7	19%	1	20%	4	27%			
MEG3 (≤ 0.5)	Não	2	20%	31	84%	0	0%	1	7%	0,000	0,315	0,000
	Sim	8	80%	6	16%	5	100%	14	93%			
CDKNB1 (≥ 2.0)	Não	10	100%	32	86%	4	80%	11	73%	0,219	0,075	0,256
	Sim	0	0%	5	14%	1	20%	4	27%			
PTTG (≥ 2.0)	Não	3	30%	26	70%	5	100%	11	73%	0,020	0,032	0,825
	Sim	7	70%	11	30%	0	0%	4	27%			
MEG3 (≥ 2.0)	Não	9	90%	29	78%	5	100%	15	100%	0,407	0,211	0,050
	Sim	1	10%	8	22%	0	0%	0	0%			
CDKNB1 ($0.5 < x < 2.0$)	Não	7	70%	14	38%	2	40%	5	33%	0,070	0,072	0,760
	Sim	3	30%	23	62%	3	60%	10	67%			
PTTG ($0.5 < x < 2.0$)	Não	7	70%	18	49%	1	20%	8	53%	0,230	0,405	0,760
	Sim	3	30%	19	51%	4	80%	7	47%			
MEG3 ($0.5 < x < 2.0$)	Não	9	90%	14	38%	5	100%	14	93%	0,003	0,763	0,000
	Sim	1	10%	23	62%	0	0%	1	7%			

Anexo 10. Correlação dos dados categóricos com os *clusters* hierárquicos

		Cluster Hierarquico para os três genes						A vs B	A vs C	B vs C
		A: CDKN1B≥1,85 / PTTG≥1,25 / MEG3≥0,65		B: CDKN1B≥0,95 / PTTG≥2,25 / MEG3≥0,65		C: CDKN1B≥0,95 / PTTG≥1,25 / MEG3≥0,05				
		n	%	n	%	n	%			
Sexos	F	23	72%	10	83%	17	74%	0,434	0,867	0,529
	M	9	28%	2	17%	6	26%			
Mutação Gsa	Não	12	80%	7	58%	8	80%	0,221	1,000	0,277
	Sim	3	20%	5	42%	2	20%			
Tu Mac - Mic no basal	Mac	24	75%	11	92%	22	96%	0,222	0,041	0,630
	Mic	8	25%	1	8%	1	4%			
Expansão Infraselar	Não	26	81%	7	58%	16	70%	0,118	0,314	0,506
	Sim	6	19%	5	42%	7	30%			
Expansão Supraselar	Não	17	53%	3	25%	8	35%	0,095	0,178	0,554
	Sim	15	47%	9	75%	15	65%			
Expansão Paraselar	Não	15	47%	4	33%	14	61%	0,419	0,305	0,122
	Sim	17	53%	8	67%	9	39%			
Tratamento primário	AS	0	0%	2	17%	3	14%	0,107	0,034	0,395
	Brc	1	3%	0	0%	2	9%			
	Cab	5	16%	1	8%	0	0%			
Remissão da doença após tto primário	CIR	26	81%	9	75%	17	77%	0,097	0,537	0,255
	Não	14	44%	8	73%	12	52%			
ImunoHisto - GH	Sim	18	56%	3	27%	11	48%	0,003	0,480	0,001
	Não	15	47%	0	0%	13	57%			
ImunoHisto - FSH	Sim	17	53%	12	100%	10	43%	0,536	0,370	0,293
	Não	31	97%	12	100%	21	91%			
ImunoHisto - PRL	Sim	1	3%	0	0%	2	9%	0,654	0,163	0,119
	Não	21	66%	7	58%	19	83%			
ImunoHisto - LH	Sim	11	34%	5	42%	4	17%	0,536	0,811	0,464
	Não	31	97%	12	100%	22	96%			
ImunoHisto - ACTH	Sim	1	3%	0	0%	1	4%	0,028	0,003	.
	Não	22	69%	12	100%	23	100%			
ImunoHisto - TSH	Sim	10	31%	0	0%	0	0%	.	0,014	0,125
	Não	32	100%	12	100%	19	83%			

	Sim	0	0%	0	0%	4	17%			
	Uma	25	78%	11	92%	19	83%			
Nº Cirurgias	Duas ou mais	7	22%	1	8%	4	17%	0,300	0,682	0,467
Remissão da doença após cirurgia	Não	19	59%	9	75%	12	52%	0,337	0,595	0,191
	Sim	13	41%	3	25%	11	48%			
Uso de análogo da somatostatina	Não	18	62%	5	42%	17	81%	0,231	0,150	0,021
	Sim	11	38%	7	58%	4	19%			
Uso de Cabergolina	Não	19	59%	5	42%	12	52%	0,293	0,595	0,555
	Sim	13	41%	7	58%	11	48%			
Uso de Cetoconazol	Não	5	50%	0	0%	0	0%	.	.	.
	Sim	5	50%	0	0%	0	0%			
Uso de Mitotane	Não	10	100%	0	0%	0	0%	.	.	.
	Sim	0	0%	0	0%	0	0%			
Adrenalectomia	Não	10	100%	0	0%	0	0%	.	.	.
	Sim	0	0%	0	0%	0	0%			
Radioterapia	Não	32	100%	11	92%	22	96%	0,099	0,234	0,630
	Sim	0	0%	1	8%	1	4%			
Controle hormonal final	Não	7	32%	5	42%	4	33%	0,566	0,928	0,673
	Sim	15	68%	7	58%	8	67%			
Controle tumoral final	Não	8	31%	5	42%	9	39%	0,510	0,539	0,884
	Sim	18	69%	7	58%	14	61%			
Cluster Ki67 Média	< 7,1	16	73%	9	100%	18	90%	0,081	0,155	0,326
	≥7,1	6	27%	0	0%	2	10%			
Cluster p53 Média	<4,45	17	94%	6	100%	15	88%	0,555	0,512	0,379
	≥4,45	1	6%	0	0%	2	12%			

Tto= tratamento

Anexo 11. Correlação dos dados contínuos com os *clusters* hierárquicos

Cluster Hierarquico para os três genes	A: CDKN1B $\geq$ 1,85 / PTTG $\geq$ 1,25 / MEG3 $\geq$ 0,65			B: CDKN1B $\geq$ 0,95 / PTTG $\geq$ 2,25 / MEG3 $\geq$ 0,65			C: CDKN1B $\geq$ 0,95 / PTTG $\geq$ 1,25 / MEG3 $\geq$ 0,05			Kruskal-Wallis	A vs B	A vs C	B vs C
	Median	25%	75%	Median	25%	75%	Median	25%	75%	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.
Idade ao diagnóstico	31	23	42	41	35	50	47	33	55	0,009	0,065	0,004	0,509
GH no basal	35,5	3,4	76,0	17,5	7,2	85,9	12,0	6,3	27,2	0,848	0,884	0,617	0,621
IGF-I no basal	957	829	1171	979	721	1146	1015	942	1128	0,957	0,845	0,739	0,895
ULNR-IGF-1 no basal	324	258	389	385	287	432	392	331	460	0,241	0,262	0,108	0,644
diam max do Tumor B	2,1	1,0	3,2	2,1	1,4	3,1	2,2	1,6	2,6	0,942	0,712	0,949	0,793
nº de tratamento realizados	2	1	3	3	2	3	2	1	3	0,471	0,647	0,408	0,204
KI-67(%) Média	1,0	1,0	1,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,043	0,137	0,037	0,641
KI-67(%) Mínimo	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,566	1,000	0,294	0,502
KI-67(%) Máximo	1,0	1,0	5,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,044	0,123	0,028	0,747
p53 (%) Média	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,423	0,404	0,533	0,282
p53 (%) Máximo	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,477	0,404	0,550	0,282

9. REFERÊNCIAS

1. Asa SL, Ezzat S. Medical management of pituitary adenomas: structural and ultrastructural changes. *Pituitary*. 2002;5(2):133-9.
2. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol*. 2002;159(1):123-34.
3. Bartke A. The response of two types of dwarf mice to growth hormone, thyrotropin, and thyroxine. *Gen Comp Endocrinol*. 1965;5(4):418-26.
4. Sloop KW, Parker GE, Hanna KR, Wright HA, Rhodes SJ. LHX3 transcription factor mutations associated with combined pituitary hormone deficiency impair the activation of pituitary target genes. *Gene*. 2001;265(1-2):61-9.
5. Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev*. 2009;30(7):790-829.
6. Kabos P, Kabosova A, Neuman T. Blocking HES1 expression initiates GABAergic differentiation and induces the expression of p21(CIP1/WAF1) in human neural stem cells. *J Biol Chem*. 2002;277(11):8763-6.
7. Matsuo I, Kuratani S, Kimura C, Takeda N, Aizawa S. Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev*. 1995;9(21):2646-58.
8. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev*. 2007;87(3):933-63.
9. Raetzman LT, Wheeler BS, Ross SA, Thomas PQ, Camper SA. Persistent expression of Notch2 delays gonadotrope differentiation. *Mol Endocrinol*. 2006;20(11):2898-908.
10. Gleiberman AS, Michurina T, Encinas JM, Roig JL, Krasnov P, Balordi F, et al. Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(17):6332-7.
11. Araujo RV, Chang CV, Cescato VA, Fragoso MC, Bronstein MD, Mendonca BB, et al. PROP1 overexpression in corticotrophinomas: evidence for the role of PROP1 in the maintenance of cells committed to corticotrophic differentiation. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(6):887-91.
12. Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumors. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:97-126.
13. Vandeve S, Jaffrain-Rea ML, Daly AF, Tichomirowa M, Zacharieva S, Beckers A. The genetics of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;24(3):461-76.
14. Bronstein MD, Melmed S. [Pituitary tumorigenesis]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005;49(5):615-25.
15. Kovacs K, Horvath E, Vidal S. Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol*. 2001;54(2):121-7.
16. Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev*. 1998;19(6):798-827.

17. Ironside JW. Best Practice No 172: pituitary gland pathology. *J Clin Pathol.* 2003;56(8):561-8.
18. Cooper O, Melmed S. Subclinical hyperfunctioning pituitary adenomas: the silent tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26(4):447-60.
19. Wolfsberger S, Knosp E. Comments on the WHO 2004 classification of pituitary tumors. *Acta Neuropathol.* 2006;111(1):66-7.
20. Mete O, Ezzat S, Asa SL. Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol.* 2012;49(2):R69-78.
21. Saeger W. Proliferation markers and cell cycle inhibitors in pituitary adenomas. *Front Horm Res.* 2004;32:110-26.
22. DeLellis R. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs, WHO Classification of Tumours. Lyon: IARC Press; 2004.
23. Schreiber S, Saeger W, Lüdecke DK. Proliferation markers in different types of clinically non-secreting pituitary adenomas. *Pituitary.* 1999;1(3-4):213-20.
24. Nakabayashi H, Sunada I, Hara M. Immunohistochemical analyses of cell cycle-related proteins, apoptosis, and proliferation in pituitary adenomas. *J Histochem Cytochem.* 2001;49(9):1193-4.
25. Thapar K, Kovacs K, Scheithauer BW, Stefaneanu L, Horvath E, Pernicone PJ, et al. Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody. *Neurosurgery.* 1996;38(1):99-106; discussion -7.
26. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007. p. 335–43.
27. Thapar K, Scheithauer BW, Kovacs K, Pernicone PJ, Laws ER. p53 expression in pituitary adenomas and carcinomas: correlation with invasiveness and tumor growth fractions. *Neurosurgery.* 1996;38(4):765-70; discussion 70-1.
28. Ozer E, Canda MS, Ulukus C, Guray M, Erbayraktar S. Expression of Bcl-2, Bax and p53 proteins in pituitary adenomas: an immunohistochemical study. *Tumori.* 2003;89(1):54-9.
29. Pinto EM, Bronstein MD. [Molecular aspects of pituitary tumorigenesis]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(4):599-610.
30. Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71(6):1427-33.
31. Asa SL, Kovacs K. Functional morphology of the human fetal pituitary. *Pathol Annu.* 1984;19 Pt 1:275-315.
32. Castinetti F, Davis SW, Brue T, Camper SA. Pituitary stem cell update and potential implications for treating hypopituitarism. *Endocr Rev.* 2011;32(4):453-71.
33. Florio T. Adult pituitary stem cells: from pituitary plasticity to adenoma development. *Neuroendocrinology.* 2011;94(4):265-77.
34. Rostad S. Pituitary adenoma pathogenesis: an update. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19(4):322-7.
35. Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(5):257-66.
36. Dworakowska D, Grossman AB. The pathophysiology of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(5):525-41.
37. WARD, LS. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. 2002. p. 351-60.

38. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(23):10914-21.
39. Kozasa T, Itoh H, Tsukamoto T, Kaziro Y. Isolation and characterization of the human Gs alpha gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(7):2081-5.
40. Hayward BE, Moran V, Strain L, Bonthron DT. Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(26):15475-80.
41. Hayward BE, Bonthron DT. An imprinted antisense transcript at the human GNAS1 locus. *Hum Mol Genet*. 2000;9(5):835-41.
42. Pasolli HA, Klemke M, Kehlenbach RH, Wang Y, Huttner WB. Characterization of the extra-large G protein alpha-subunit XLalphas. I. Tissue distribution and subcellular localization. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33622-32.
43. Liu J, Yu S, Litman D, Chen W, Weinstein LS. Identification of a methylation imprint mark within the mouse Gnas locus. *Mol Cell Biol*. 2000;20(16):5808-17.
44. Lania A, Spada A. G-protein and signalling in pituitary tumours. *Horm Res*. 2009;71 Suppl 2:95-100.
45. Akintoye SO, Kelly MH, Brillante B, Cherman N, Turner S, Butman JA, et al. Pegvisomant for the treatment of gsp-mediated growth hormone excess in patients with McCune-Albright syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):2960-6.
46. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature*. 1989;340(6236):692-6.
47. Williamson EA, Ince PG, Harrison D, Kendall-Taylor P, Harris PE. G-protein mutations in human pituitary adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas. *Eur J Clin Invest*. 1995;25(2):128-31.
48. Riminucci M, Collins MT, Lala R, Corsi A, Matarazzo P, Gehron Robey P, et al. An R201H activating mutation of the GNAS1 (Gsalpha) gene in a corticotroph pituitary adenoma. *Mol Pathol*. 2002;55(1):58-60.
49. Tordjman K, Stern N, Ouaknine G, Yossiphov Y, Razon N, Nordenskjöld M, et al. Activating mutations of the Gs alpha-gene in nonfunctioning pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;77(3):765-9.
50. Williamson EA, Daniels M, Foster S, Kelly WF, Kendall-Taylor P, Harris PE. Gs alpha and Gi2 alpha mutations in clinically non-functioning pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1994;41(6):815-20.
51. Heaney AP. Pituitary tumour pathogenesis. *Br Med Bull*. 2005;75-76:81-97.
52. Dumitrescu CE, Collins MT. McCune-Albright syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:12.
53. Kan B, Esapa C, Sipahi T, Nacar C, Ozer F, Sayhan NB, et al. G protein mutations in pituitary tumors: a study on Turkish patients. *Pituitary*. 2003;6(2):75-80.
54. Landis CA, Harsh G, Lyons J, Davis RL, McCormick F, Bourne HR. Clinical characteristics of acromegalic patients whose pituitary tumors contain mutant Gs protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;71(6):1416-20.
55. Drews RT, Gravel RA, Collu R. Identification of G protein alpha subunit mutations in human growth hormone (GH)- and GH/prolactin-secreting pituitary

- tumors by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Mol Cell Endocrinol.* 1992;87(1-3):125-9.
56. Adams EF, Brockmeier S, Friedmann E, Roth M, Buchfelder M, Fahlbusch R. Clinical and biochemical characteristics of acromegalic patients harboring gsp-positive and gsp-negative pituitary tumors. *Neurosurgery.* 1993;33(2):198-203; discussion
 57. Freda PU, Chung WK, Matsuoka N, Walsh JE, Kanibir MN, Kleinman G, 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.* 2007;10(3):275-82.
 58. Buchfelder M, Fahlbusch R, Merz T, Symowski H, Adams EF. Clinical correlates in acromegalic patients with pituitary tumors expressing GSP oncogenes. *Pituitary.* 1999;1(3-4):181-5.
 59. Yang I, Park S, Ryu M, Woo J, Kim S, Kim J, et al. Characteristics of gsp-positive growth hormone-secreting pituitary tumors in Korean acromegalic patients. *Eur J Endocrinol.* 1996;134(6):720-6.
 60. Ballaré E, Mantovani S, Lania A, Di Blasio AM, Vallar L, Spada A. 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.* 1998;83(12):4386-90.
 61. Taboada GF, Tabet AL, Naves LA, de Carvalho DP, Gadelha MR. Prevalence of gsp oncogene in somatotropinomas and clinically non-functioning pituitary adenomas: our experience. *Pituitary.* 2009;12(3):165-9.
 62. Kim HJ, Kim MS, Park YJ, Kim SW, Park DJ, Park KS, et al. Prevalence of Gs alpha mutations in Korean patients with pituitary adenomas. *J Endocrinol.* 2001;168(2):221-6.
 63. Barlier A, Gunz G, Zamora AJ, Morange-Ramos I, Figarella-Branger D, Dufour H, et al. Pronostic and therapeutic consequences of Gs alpha mutations in somatotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(5):1604-10.
 64. Faglia G, Arosio M, Spada A. GS protein mutations and pituitary tumors: functional correlates and possible therapeutic implications. *Metabolism.* 1996;45(8 Suppl 1):117-9.
 65. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med.* 1991;325(24):1688-95.
 66. Bianco P, Riminucci M, Majolagbe A, Kuznetsov SA, Collins MT, Mankani MH, et al. Mutations of the GNAS1 gene, stromal cell dysfunction, and osteomalacic changes in non-McCune-Albright fibrous dysplasia of bone. *J Bone Miner Res.* 2000;15(1):120-8.
 67. Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol.* 1997;11(4):433-41.
 68. Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD, et al. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol.* 1999;13(1):156-66.
 69. Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, et al. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(2):761-7.

70. Hamid T, Malik MT, Kakar SS. Ectopic expression of PTTG1/securin promotes tumorigenesis in human embryonic kidney cells. *Mol Cancer*. 2005;4(1):3.
71. McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, Heaney AP, Tannahill LA, Hussain S, 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)*. 2003;58(2):141-50.
72. McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, Heaney AP, Stratford AL, Khaira JS, et al. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(9):4238-44.
73. Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D, Chattopadhyay N. The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis. *Clin Med Res*. 2006;4(2):130-7.
74. Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science*. 1999;285(5426):418-22.
75. Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*. 2003;112(11):1603-18.
76. Tong Y, Tan Y, Zhou C, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene*. 2007;26(38):5596-605.
77. Carver LA, LaPres JJ, Jain S, Dunham EE, Bradfield CA. Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J Biol Chem*. 1998;273(50):33580-7.
78. Kuzhandaivelu N, Cong YS, Inouye C, Yang WM, Seto E. XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. *Nucleic Acids Res*. 1996;24(23):4741-50.
79. Meyer BK, Pray-Grant MG, Vanden Heuvel JP, Perdew GH. Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol*. 1998;18(2):978-88.
80. Trivellin G, Korbonits M. AIP and its interacting partners. *J Endocrinol*. 2011;210(2):137-55.
81. Carver LA, Bradfield CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem*. 1997;272(17):11452-6.
82. Meyer BK, Petrulis JR, Perdew GH. Aryl hydrocarbon (Ah) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones*. 2000;5(3):243-54.
83. Chahal HS, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M. Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA). *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(7):419-27.
84. Beckers A, Aaltonen LA, Daly AF, Karhu A. Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. *Endocr Rev*. 2013;34(2):239-77.
85. Bolger GB, Peden AH, Steele MR, MacKenzie C, McEwan DG, Wallace DA, et al. Attenuation of the activity of the cAMP-specific phosphodiesterase

- PDE4A5 by interaction with the immunophilin XAP2. *J Biol Chem*. 2003;278(35):33351-63.
86. Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, et al. The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(6):2390-401.
 87. Tuominen I, Heliövaara E, Raitila A, Rautiainen MR, Mehine M, Katainen R, et al. AIP inactivation leads to pituitary tumorigenesis through defective Gai-cAMP signaling. *Oncogene*. 2015;34(9):1174-84.
 88. Vasilev V, Daly A, Naves L, Zacharieva S, Beckers A. Clinical and genetic aspects of familial isolated pituitary adenomas. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67 Suppl 1:37-41.
 89. Korbonits M, Storr H, Kumar AV. Familial pituitary adenomas - who should be tested for AIP mutations? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77(3):351-6.
 90. Cazabat L, Bouligand J, Salenave S, Bernier M, Gaillard S, Parker F, et al. Germline AIP mutations in apparently sporadic pituitary adenomas: prevalence in a prospective single-center cohort of 443 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(4):E663-70.
 91. Raitila A, Georgitsi M, Karhu A, Tuppurainen K, Mäkinen MJ, Birkenkamp-Demtröder K, et al. No evidence of somatic aryl hydrocarbon receptor interacting protein mutations in sporadic endocrine neoplasia. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(3):901-6.
 92. Yu R, Bonert V, Saporta I, Raffel LJ, Melmed S. Aryl hydrocarbon receptor interacting protein variants in sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(12):5126-9.
 93. Barlier A, Vanbellinghen JF, Daly AF, Silvy M, Jaffrain-Rea ML, Trouillas J, 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*. 2007;92(5):1952-5.
 94. Cazabat L, Libè R, Perlemoine K, René-Corail F, Burnichon N, Gimenez-Roqueplo AP, et al. Germline inactivating mutations of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in a large cohort of sporadic acromegaly: mutations are found in a subset of young patients with macroadenomas. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(1):1-8.
 95. Daly AF, Tichomirowa MA, Petrossians P, Heliövaara E, Jaffrain-Rea ML, Barlier A, 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*. 2010;95(11):E373-83.
 96. Cazabat L, Guillaud-Bataille M, Bertherat J, Raffin-Sanson ML. Mutations of the gene for the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in pituitary adenomas. *Horm Res*. 2009;71(3):132-41.
 97. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999;13(12):1501-12.
 98. Ponce-Castañeda MV, Lee MH, Latres E, Polyak K, Lacombe L, Montgomery K, et al. p27Kip1: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res*. 1995;55(6):1211-4.
 99. Fedele M, Fusco A. Role of the high mobility group A proteins in the regulation of pituitary cell cycle. *J Mol Endocrinol*. 2010;44(6):309-18.

100. Quereda V, Malumbres M. Cell cycle control of pituitary development and disease. *J Mol Endocrinol*. 2009;42(2):75-86.
101. Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*. 1996;85(5):733-44.
102. Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, et al. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell*. 1996;85(5):721-32.
103. Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Höfler H, et al. Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(42):15558-63.
104. Pellegata NS. MENX and MEN4. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67 Suppl 1:13-8.
105. Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, van der Luijt RB, Aalfs CM, Sane T, et al. Germline CDKN1B/p27Kip1 mutation in multiple endocrine neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):3321-5.
106. 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*. 2010;24(3):425-37.
107. Tichomirowa MA, Lee M, Barlier A, Daly AF, Marinoni I, Jaffrain-Rea ML, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B) gene variants in AIP mutation-negative familial isolated pituitary adenoma kindreds. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19(3):233-41.
108. Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB. Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol*. 2000;183(1):18-27.
109. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, et al. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*. 1996;85(5):707-20.
110. Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*. 1998;396(6707):177-80.
111. Miyoshi N, Wagatsuma H, Wakana S, Shiroishi T, Nomura M, Aisaka K, et al. Identification of an imprinted gene, Meg3/Gtl2 and its human homologue MEG3, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes Cells*. 2000;5(3):211-20.
112. Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer*. 2011;10:38.
113. Zhou Y, Zhong Y, Wang Y, Zhang X, Batista DL, Gejman R, et al. Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem*. 2007;282(34):24731-42.
114. Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol*. 2001;59(4):901-8.
115. Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y. PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(1):109-14.

116. Li PX, Wong J, Ayed A, Ngo D, Brade AM, Arrowsmith C, et al. Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression. *J Biol Chem*. 2000;275(26):20127-35.
117. Lim JH, Park JW, Min DS, Chang JS, Lee YH, Park YB, et al. NAG-1 up-regulation mediated by EGR-1 and p53 is critical for quercetin-induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Apoptosis*. 2007;12(2):411-21.
118. Garitano-Trojaola A, Agirre X, Prósper F, Fortes P. Long non-coding RNAs in haematological malignancies. *Int J Mol Sci*. 2013;14(8):15386-422.
119. Zhang X, Zhou Y, Mehta KR, Danila DC, Scolavino S, Johnson SR, et al. A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5119-26.
120. Mezzomo LC, Gonzales PH, Pesce FG, Kretzmann Filho N, Ferreira NP, Oliveira MC, et al. Expression of cell growth negative regulators MEG3 and GADD45 γ is lost in most sporadic human pituitary adenomas. *Pituitary*. 2012;15(3):420-7.
121. Gejman R, Batista DL, Zhong Y, Zhou Y, Zhang X, Swearingen B, et al. Selective loss of MEG3 expression and intergenic differentially methylated region hypermethylation in the MEG3/DLK1 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):4119-25.
122. Zhao J, Dahle D, Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. Hypermethylation of the promoter region is associated with the loss of MEG3 gene expression in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(4):2179-86.
123. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res*. 2001;11(5):863-74.
124. Ng PC, Henikoff S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7:61-80.
125. . !!! INVALID CITATION !!! {}.
126. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res*. 2003;13(9):2129-41.
127. Schwarz JM, Rödelberger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7(8):575-6.
128. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.
129. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
130. Hammer GD, Tyrrell JB, Lamborn KR, Applebury CB, Hannegan ET, Bell S, et al. Transsphenoidal microsurgery for Cushing's disease: initial outcome and long-term results. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(12):6348-57.
131. Vilar L, Naves LA, Freitas MaC, Moura E, Canadas V, Leal E, et al. [Endogenous Cushing's syndrome: clinical and laboratorial features in 73 cases]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(4):566-74.
132. Marek J. Incidentalomy v endokrinologii - hypofýza. *Interní Med*; 2001. p. 358-

62.

133. Ferrante E, Ferraroni M, Castrignanò T, Menicatti L, Anagni M, Reimondo G, et al. Non-functioning pituitary adenoma database: a useful resource to improve the clinical management of pituitary tumors. *Eur J Endocrinol*. 2006;155(6):823-9.

134. Brito LP, Lerário AM, Bronstein MD, Soares IC, Mendonca BB, Fragoso MC. Influence of the fibroblast growth factor receptor 4 expression and the G388R functional polymorphism on Cushing's disease outcome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(10):E271-9.

135. Gondim JA, Almeida JP, de Albuquerque LA, Gomes E, Schops M, Mota JI. Endoscopic endonasal transsphenoidal surgery in elderly patients with pituitary adenomas. *J Neurosurg*. 2015;123(1):31-8.

136. Alimohamadi M, Ownagh V, Mahouzi L, Ostovar A, Abbassioun K, Amirjmschidi A. The impact of immunohistochemical markers of Ki-67 and p53 on the long-term outcome of growth hormone-secreting pituitary adenomas: A cohort study. *Asian J Neurosurg*. 2014;9(3):130-6.

137. Jaffrain-Rea ML, Di Stefano D, Minniti G, Esposito V, Bultrini A, Ferretti E, et al. A critical reappraisal of MIB-1 labelling index significance in a large series of pituitary tumours: secreting versus non-secreting adenomas. *Endocr Relat Cancer*. 2002;9(2):103-13.

138. Ferreira JE, de Mello PA, de Magalhães AV, Botelho CH, Naves LA, Nosé V, et al. [Non-functioning pituitary adenomas: clinical features and immunohistochemistry]. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005;63(4):1070-8.

139. Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, Reynaud A, Chevallier P, Jan M, et al. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(3):887-900.

140. Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV, Cusimano M. Ki-67 in pituitary neoplasms: a review--part I. *Neurosurgery*. 2009;65(3):429-37; discussion 37.

141. Mastronardi L, Guiducci A, Spera C, Puzzilli F, Liberati F, Maira G. Ki-67 labelling index and invasiveness among anterior pituitary adenomas: analysis of 103 cases using the MIB-1 monoclonal antibody. *J Clin Pathol*. 1999;52(2):107-11.

142. Tortosa F, Webb SM. Atypical pituitary adenomas: 10 years of experience in a reference centre in Portugal. *Neurologia*. 2015.

143. Shi Y, Tang D, Deng J, Su C. 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 (Engl)*. 1998;111(10):891-4.

144. Corbetta S, Ballaré E, Mantovani G, Lania A, Losa M, Di Blasio AM, et al. Somatostatin receptor subtype 2 and 5 in human GH-secreting pituitary adenomas: analysis of gene sequence and mRNA expression. *Eur J Clin Invest*. 2001;31(3):208-14.

145. Adams EF, Lei T, Buchfelder M, Petersen B, Fahlbusch R. Biochemical characteristics of human pituitary somatotropinomas with and without gsp mutations: in vitro cell culture studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(7):2077-81.

146. Mendoza V, Sosa E, Espinosa-de-Los-Monteros AL, Salcedo M, Guinto G, Cheng S, et al. GSPalpha mutations in Mexican patients with acromegaly:

- potential impact on long term prognosis. *Growth Horm IGF Res.* 2005;15(1):28-32.
147. Yasufuku-Takano J, Takano K, Morita K, Takakura K, Teramoto A, Fujita T. 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).* 2006;64(1):91-6.
 148. Ham J, Ivan M, Wynford-Thomas D, Scanlon MF. GH3 cells expressing constitutively active Gs alpha (Q227L) show enhanced hormone secretion and proliferation. *Mol Cell Endocrinol.* 1997;127(1):41-7.
 149. Muca C, Vallar L. Expression of mutationally activated G alpha s stimulates growth and differentiation of thyroid FRTL5 cells. *Oncogene.* 1994;9(12):3647-53.
 150. Zachary I, Masters SB, Bourne HR. Increased mitogenic responsiveness of Swiss 3T3 cells expressing constitutively active Gs alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;168(3):1184-93.
 151. Spada A, Arosio M, Bochicchio D, Bazzoni N, Vallar L, Bassetti M, et al. Clinical, biochemical, and morphological correlates in patients bearing growth hormone-secreting pituitary tumors with or without constitutively active adenylyl cyclase. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71(6):1421-6.
 152. Persani L, Borgato S, Lania A, Filopanti M, Mantovani G, Conti M, et al. Relevant cAMP-specific phosphodiesterase isoforms in human pituitary: effect of Gs(alpha) mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(8):3795-800.
 153. Lania A, Mantovani G, Spada A. Genetics of pituitary tumors: Focus on G-protein mutations. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228(9):1004-17.
 154. Bertherat J, Chanson P, Montminy M. The cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive factor CREB is constitutively activated in human somatotroph adenomas. *Mol Endocrinol.* 1995;9(7):777-83.
 155. Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, Tuppurainen K, Mäkinen MJ, Vierimaa O, et al. Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(10):4101-5.
 156. DiGiovanni R, Serra S, Ezzat S, Asa SL. AIP Mutations are not identified in patients with sporadic pituitary adenomas. *Endocr Pathol.* 2007;18(2):76-8.
 157. Iwata T, Yamada S, Mizusawa N, Golam HM, Sano T, Yoshimoto K. The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene is rarely mutated in sporadic GH-secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66(4):499-502.
 158. Cazabat L, Bouligand J, Chanson P. AIP mutation in pituitary adenomas. *N Engl J Med.* 2011;364(20):1973-4; author reply 4-5.
 159. Tichomirowa MA, Barlier A, Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ronchi C, Yaneva M, et al. High prevalence of AIP gene mutations following focused screening in young patients with sporadic pituitary macroadenomas. *Eur J Endocrinol.* 2011;165(4):509-15.
 160. Daly AF, Vanbellinghen JF, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, Naves LA, Guitelman MA, et al. Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(5):1891-6.
 161. Buchbinder S, Bierhaus A, Zorn M, Nawroth PP, Humpert P, Schilling T. Aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene (AIP) mutations are rare in

patients with hormone secreting or non-secreting pituitary adenomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008;116(10):625-8.

162. Raitila A, Georgitsi M, Bonora E, Vargiolu M, Tuppurainen K, Mäkinen MJ, et al. Aryl hydrocarbon receptor interacting protein mutations seem not to associate with familial non-medullary thyroid cancer. *J Endocrinol Invest*. 2009;32(5):426-9.

163. Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, et al. Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Hum Mutat*. 2010;31(8):950-60.

164. Kibel AS, Suarez BK, Belani J, Oh J, Webster R, Brophy-Ebbers M, et al. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63(9):2033-6.

165. Li G, Sturgis EM, Wang LE, Chamberlain RM, Spitz MR, El-Naggar AK, et al. Association between the V109G polymorphism of the p27 gene and the risk and progression of oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(12 Pt 1):3996-4002.

166. Gayther SA, Song H, Ramus SJ, Kjaer SK, Whittemore AS, Quaye L, et al. Tagging single nucleotide polymorphisms in cell cycle control genes and susceptibility to invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*. 2007;67(7):3027-35.

167. Tigli H, Buyru N, Dalay N. Molecular analysis of the p27/kip1 gene in breast cancer. *Mol Diagn*. 2005;9(1):17-21.

168. Tomoda K, Kubota Y, Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*. 1999;398(6723):160-5.

169. Shiraso S, Katayose Y, Yamamoto K, Mizuma M, Yabuuchi S, Oda A, et al. Overexpression of adenovirus-mediated p27kip1 lacking the Jab1-binding region enhances cytotoxicity and inhibits xenografted human cholangiocarcinoma growth. *Anticancer Res*. 2009;29(6):2015-24.

170. Longuini VC, Lourenço DM, Sekiya T, Meirelles O, Goncalves TD, Coutinho FL, et al. Association between the p27 rs2066827 variant and tumor multiplicity in patients harboring MEN1 germline mutations. *Eur J Endocrinol*. 2014;171(3):335-42.

171. Bamberger CM, Fehn M, Bamberger AM, Lüdecke DK, Beil FU, Saeger W, et al. Reduced expression levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in human pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*. 1999;140(3):250-5.

172. Komatsubara K, Tahara S, Umeoka K, Sanno N, Teramoto A, Osamura RY. Immunohistochemical analysis of p27 (Kip1) in human pituitary glands and in various types of pituitary adenomas. *Endocr Pathol*. 2001;12(2):181-8.

173. Lidhar K, Korbonits M, Jordan S, Khalimova Z, Kaltsas G, Lu X, et al. Low expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3823-30.

174. Musat M, Korbonits M, Kola B, Borboli N, Hanson MR, Nanzer AM, et al. Enhanced protein kinase B/Akt signalling in pituitary tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(2):423-33.

175. Korbonits M, Chahal HS, Kaltsas G, Jordan S, Urmanova Y, Khalimova Z, et al. Expression of phosphorylated p27(Kip1) protein and Jun activation

domain-binding protein 1 in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(6):2635-43.

176. Dahia PL, Aguiar RC, Honegger J, Fahlbush R, Jordan S, Lowe DG, et al. Mutation and expression analysis of the p27/kip1 gene in corticotrophin-secreting tumours. *Oncogene.* 1998;16(1):69-76.

177. Zhao H, Bauzon F, Fu H, Lu Z, Cui J, Nakayama K, et al. Skp2 deletion unmasks a p27 safeguard that blocks tumorigenesis in the absence of pRb and p53 tumor suppressors. *Cancer Cell.* 2013;24(5):645-59.

178. Tanase CP, Neagu M, Albulescu R. Key signaling molecules in pituitary tumors. *Expert Rev Mol Diagn.* 2009;9(8):859-77.

179. Hunter JA, Skelly RH, Aylwin SJ, Geddes JF, Evanson J, Besser GM, et al. The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol.* 2003;148(2):203-11.

180. Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, Lloyd RV, Cusimano M. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15(3):721-43.

181. Filippella M, Galland F, Kujas M, Young J, Faggiano A, Lombardi G, et al. Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status of pituitary adenomas: a clinical and immunohistochemical study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;65(4):536-43.

182. Minematsu T, Suzuki M, Sanno N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY. PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas. *Endocr Pathol.* 2006;17(2):143-53.

183. Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, Cantelmi D, Horvath E, Lloyd RV, et al. Immunohistochemical expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in pituitary adenomas: a correlative study of tumor subtypes. *Int J Surg Pathol.* 2010;18(1):5-13.

184. Li Z, Li C, Liu C, Yu S, Zhang Y. Expression of the long non-coding RNAs MEG3, HOTAIR, and MALAT-1 in non-functioning pituitary adenomas and their relationship to tumor behavior. *Pituitary.* 2015;18(1):42-7.

185. Binse I, Ueberberg B, Sandalcioglu IE, Flitsch J, Luedecke DK, Mann K, et al. Expression analysis of GADD45γ, MEG3, and p8 in pituitary adenomas. *Horm Metab Res.* 2014;46(9):644-50.

186. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(25):14863-8.

187. Jaffrain-Rea M-L, Rotondi S, Alesse E. New Insights in the Pathogenesis of Pituitary Tumours: InTech; 2013.