Paulo Vinicius Gonçalves Holanda Amorim

Análise da expressão do *KISS1/KISS1R* e do polimorfismo rs5780218 *KISS1* em somatotropinomas e adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes

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

Programa de Endocrinologia

Orientador (a): Profa. Dra. Ericka Barbosa Trarbach

SÃO PAULO

2017

Paulo Vinicius Gonçalves Holanda Amorim

Análise da expressão do *KISS1/KISS1R* e do polimorfismo rs5780218 *KISS1* em somatotropinomas e adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes

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

Programa de Endocrinologia

Orientador (a): Profa. Dra. Ericka Barbosa Trarbach

SÃO PAULO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Amorim, Paulo Vinicius Gonçalves Holanda
Análise da expressão do KISS1/KISS1 e do
polimorfismo rs5780218 KISS1 em somatotropinomas e
adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes
/ Paulo Vinicius Gonçalves Holanda Amorim. -- São
Paulo, 2017.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Ericka Barbosa Trarbach.

Descritores: 1.Expressão gênica 2.Reação em
cadeia da polimerase em tempo real 3.Polimorfismo
de nucleotídeo único 4.Polimorfismo de fragmento de
restrição 5.Hipófise 6.Adenoma 7.Kisspeptinas
8.Invasividade neoplásica

USP/FM/DBD-517/17

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular / LIM25, Departamento de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP)

Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Bolsa de Pós-Graduação–PROAP)

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que me permitiram ser quem sou, da maneira que fui, durante todo o tempo que tomei, sem nunca desistirem de mim.

À ciência.

À vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu criador, e de toda a existência,
Peço-lhe perdão por essa minha insistência,
De exigir mais bênçãos, e por vezes duvidar.
Sou eternamente grato, e busco melhorar.

A minha generosa família, que tudo me permitiu,
Me proporcionou liberdade, apoio e sustento,
Que mesmo não estando perto, de longe assistiu,
Cada obstáculo superado, até nesse momento.

À minha orientadora, que faz jus ao título,
Também coautora, não só deste capítulo,
Mas de todo o processo que se pôs a aceitar,
Quando recebeu um aluno inexperiente, lá do Ceará.

Aos doutores responsáveis por este departamento,
Por terem em mim reconhecido um talento,
E que em todo o mérito de suas autoridades,
Fazem jus à estima e glória dessa universidade.

Aos meus colegas de trabalho e de pós-graduação,
Por todo o aprendizado vindo de nossa convivência,
Que me acompanharam por toda essa progressão,
Sempre muito pacientes com minhas pendências.

Aos meus amigos, próximos e distantes,
Que dividiram comigo os mais variados instantes,
Compartilhando de minhas dores, sem nunca sentir pena,
E festejando ao meu lado, na alegria mais plena.

A aqueles que se foram, ou que deixei para trás,
Guardo-os na memória, e levo o aprendizado,
Pois por tudo que vivi, hoje sou bem mais capaz,
De continuar buscando construir o meu legado.

À cidade de São Paulo, e minhas muitas residências,
Lugar que me permitiu aprender sobre “independência”.
Mesmo que hoje não a reconheça como sendo o meu lar;
Vou levando alguns tesouros, mas volto aqui para visitar.

Por fim, a mim mesmo, sem medo de julgamento,
Creio ter amadurecido, mas com muito a aprender.
De meus erros e defeitos, me mantereí atento,
Buscando sempre nessa vida continuar a crescer.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esse manuscrito 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.

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

SUMÁRIO

•	CÓDIGOS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS	
•	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
•	LISTA DE FIGURAS	
•	LISTA DE TABELAS	
•	RESUMO	
•	ABSTRACT	
1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	Adenomas hipofisários	15
1.2	Tumorigênese hipofisária e progressão tumoral	17
1.3	<i>KISS1</i> e <i>KISS1R</i>	19
1.3.1	<i>KISS1</i> e <i>KISS1R</i> na biologia do câncer	22
1.3.2	<i>KISS1</i> e <i>KISS1R</i> em adenomas hipofisários	24
2.	OBJETIVOS	26
3.	METODOLOGIA	28
3.1	Pacientes	29
3.2	Extração do DNA e RNA total	29
3.3	Expressão gênica quantitativa por RT-qPCR	30
3.4	Genotipagem do polimorfismo	31
3.5	Análise Estatística	32
4.	RESULTADOS	33
4.1	Caracterização dos pacientes	34
4.2	Expressão do <i>KISS1</i> e do <i>KISS1R</i> em adenomas	34
4.2.1	<i>KISS1</i> e sua relação com o comportamento clínico e fenótipo tumoral	34
4.2.2	<i>KISS1R</i> e sua relação com o comportamento clínico e fenótipo tumoral	36
4.2.3	Correlação entre as expressões de <i>KISS1</i> e <i>KISS1R</i>	36
4.3	Genotipagem do polimorfismo rs5780218 <i>KISS1</i>	39
4.3.1	Distribuição Genotípica	39
4.3.2	rs5780218 e sua relação com o comportamento clínico e fenótipo tumoral	39
4.3.3	Relação do SNP rs578218 com a expressão do mRNA <i>KISS1</i>	41
5.	DISCUSSÃO	43
6.	CONCLUSÕES	48
7.	ANEXOS	50
7.1	Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	51
7.2	Anexo 2: hipofisários	54
8.	REFERÊNCIAS	57

CÓDIGOS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

Nucleotídeos		
A		Adenina
C		Citosina
G		Guanina
T		Timina

Aminoácidos		
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutâmico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACNF	Adenomas Clinicamente Não-Funcionantes
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ACTHoma	Corticotrofinoma
<i>AIP</i>	Gene codificador de <i>AH receptor-interacting protein</i>
<i>CDKN1B</i>	Gene codificador de <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GH	Hormônio do crescimento
GHoma	Somatotrofinoma
<i>GNAS1</i>	Gene codificador de <i>guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha-1</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GnRHR	Receptor do hormônio liberador de gonadotrofina
<i>GPR54</i>	Receptor Acoplado a Proteína G 54
IC	Idade Cronológica
Kb	Kilobases
Ki-67	Marcador de proliferação celular Ki-67
<i>KISS1</i>	Gene codificador de Kisspeptinas
<i>KISS1R</i>	Gene codificador do receptor de peptídeos derivados do <i>KISS1</i>
Kp-10	Kisspeptina-10
Kp-13	Kisspeptina-13
Kp-14	Kisspeptina-14
Kp-54	Kisspeptina-54
LH	Hormônio Luteinizante
MEG3	Gene do <i>Long Non-coding mRNA Maternally Expressed 3</i>
<i>MEN1</i>	Gene codificador de menina
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
NCBI	<i>National Center for Biotechnology and Information</i>
p53	Supressor tumoral p53
Pb	Pares de bases nucleares
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	PCR de polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição
PRL	Prolactina
<i>PTTG</i>	Gene de <i>Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein</i>
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
RM	Ressonância magnética
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa por Transcriptase Reversa
SF-1	Fator Esteroidogênico 1
SNC	Sistema Nervoso Central
TE	Tampão de Tris e EDTA
TSH	Hormônio Tireoestimulante

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sistema de classificação de adenomas hipofisários quanto ao tamanho e extensão, por Hardy e Knosp.
- Figura 2.** Causas genéticas dos tumores hipofisários, somáticas e germinativas.
- Figura 3.** Estruturas das Kisspeptinas, produtos do gene *KISS1*.
- Figura 4.** Vias putativas e estabelecidas do complexo kisspeptina/KISS1R.
- Figura 5.** Controle neuroendócrino da função gonadal por sinalização de *KISS1/KISS1R*
- Figura 6.** Padrão de restrição do fragmento amplificado para avaliação do SNP rs5780218.
- Figura 7.** Percentual de distribuição dos genótipos SNP rs5780218
- Figura 8.** Níveis de expressão relativa do mRNA do *KISS1* em relação aos genótipos do SNP rs5780218.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação clinicopatológica e prevalência de adenomas hipofisários.

Tabela 2. Frequência da expressão de *KISS1* e *KISS1R* em adenomas hipofisários, avaliada por RT-PCR convencional.

Tabela 3. Caracterização clinicopatológica dos pacientes avaliados de acordo com o subtipo tumoral.

Tabela 4. Expressão relativa do *KISS1* em pacientes portadores de somatotropinomas e ACNF.

Tabela 5. Expressão relativa do *KISS1R* em pacientes portadores de somatotropinomas e ACNF.

Tabela 6. Frequência dos genótipos do SNP rs5780218 em pacientes portadores de somatotropinomas e ACNF.

RESUMO

Amorim PVGH. Análise da expressão do *KISS1/KISS1R* e do polimorfismo rs5780218 *KISS1* em somatotropinomas e adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Apesar de amplamente estudados, os mecanismos envolvidos no processo de transformação neoplásica das células hipofisárias e na progressão desses tumores permanecem, ainda, pouco esclarecidos. Os genes da kisspeptina (*KISS1*), originalmente identificado como um supressor tumoral, e de seu receptor (*KISS1R*) desempenham um papel crucial no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e sua perda de expressão foi, recentemente, relacionada ao surgimento dos adenomas hipofisários. Com o objetivo de estudar a importância do *KISS1/KISSR* nesses tumores, foram avaliadas a expressão desses genes e a frequência do polimorfismo rs5780218 na região promotora do *KISS1*, em somatotropinomas e adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes (ACNF). Foram avaliados 97 pacientes, 49 somatotropinomas e 48 ACNF. DNA tumoral foi obtido de todos os tumores e RNA de 68 caso. Desses tumores, 52 foram classificados como invasivos (44 apresentavam invasão apenas para o seio cavernoso) e 45 não invasivos. A quantificação da expressão do mRNA de *KISS1* e *KISS1R* foi realizada pela qPCR em tempo real com sondas TaqMan utilizando o método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A determinação do genótipo do rs5780218 foi feita por PCR seguida pela técnica de polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP). O gene *KISS1* apresentou-se hipo-expresso na vasta maioria dos pacientes avaliados (97.2% dos somatotropinomas e 92.6% do ACNF). Em relação ao *KISS1R*, este também estava hipo-expresso na maior parte dos pacientes (100% dos somatotropinomas e 84.4% dos ACNF). Hiperexpressão do *KISS1* e *KISS1R* foi rara em ambos os subtipos tumorais. Em relação as características clínicas dos pacientes e ao fenótipo tumoral, como tamanho e invasividade, não foram encontradas diferenças significantes na expressão desses genes. A avaliação do polimorfismo rs5780218 no *KISS1* mostrou que o genótipo homozigoto para o alelo variante foi bem mais frequente nos somatotropinomas (32.6%) versus ACNF (10.4%; $P=0.03$). A presença do rs5780218 foi relacionada a invasividade tumoral, quando considerado apenas a invasão para o seio cavernoso ($P=0.03$). Esse é um dado interessante, já que a *KISS1* pode formar um complexo com as metaloproteínases e estas têm sido relacionadas a invasão dos adenomas hipofisários para o seio cavernoso e não para o seio esfenoidal. Entre os pacientes com ACNF, o alelo variante foi mais frequente nos indivíduos do sexo masculino ($P=0.02$) e foi relacionado com uma menor idade de diagnóstico (mediana 33.0 anos, min 26 - max 42) quanto presente em homozigose ($P<0.01$); os pacientes homozigotos para o alelo ancestral e heterozigotos apresentaram idade diagnóstica com mediana de 50.0 (min 19 - max 73) e 54.8 (min 17- max 84), respectivamente. Curiosamente, a expressão do *KISS1* foi menor nos tumores com homozigose para o alelo mutante tanto nos somatotropinomas quanto nos ACNF. Em conclusão, foi observada hipo-expressão do *KISS1* e *KISS1R* nos somatotropinomas e ACNF, podendo essa perda expressão estar relacionada a gênese desses adenomas. O alelo variante rs5780218 *KISS1* foi relacionado a invasão para o seio cavernoso e encontrado em maior frequência nos somatotropinomas, sugerindo que a importância dos *KISS1/KISS1R* pode diferir entre os subtipos de tumores hipofisários.

Descritores: expressão gênica; reação em cadeia da polimerase em tempo real; polimorfismo de nucleotídeo único; polimorfismo de fragmento de restrição; hipófise; adenoma; kisspeptinas; invasividade neoplásica.

ABSTRACT

Amorim PVGH. Investigation of *KISS1*/*KISS1R* gene expression and *KISS1* rs5780218 polymorphism in somatotropinomas nonfunctioning pituitary adenomas [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Although broadly studied, the mechanisms involved in the neoplastic process of pituitary cells remains still unclear. Kisspeptin1 (*KISS1*), originally identified as a tumor suppressor, and its receptor (*KISS1R*) play a crucial role in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and the loss of their expression was, recently, associated with pituitary adenomas onset. Aiming to investigate the importance of *KISS1*/*KISS1R* in these tumors, expression of *KISS1* and *KISS1R* was determined in somatotropinomas and nonfunctioning pituitary adenomas (NFPA). The frequency of the rs5780218 polymorphism, located in the *KISS1* promoter region, was also evaluated. A total of 97 patients were assessed, 49 somatotropinomas and 48 NFPA. Among these, 52 were categorized as invasive (44 of which only showed invasion to the cavernous sinus). *KISS1* and *KISS1R* mRNA expression was performed through RT-qPCR using TaqMan probes and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ relative quantification method. *KISS1* rs5780218 genotyping was done by PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP) method. The *KISS1* gene was underexpressed in the vast majority of the cases (97.2% of the somatotropinomas and 92.6% of NFPA). *KISS1R* underexpression have also been observed in most cases (100% of the somatotropinomas and 84.4% of the NFPA). *KISS1* and *KISS1R* overexpression was rarely detected. No significant differences were found between *KISS1* and *KISS1R* gene expression and patient's clinical characteristics and tumor phenotype, such as size and invasiveness. The characterization of rs5780218 showed that the variant genotype in homozygosis was much more frequent in somatotropinomas (32.6%) versus NFPA (10.4%; $P=0.03$). The presence of variant allele was associated with tumor invasiveness when considered invasion to the cavernous sinus only ($P=0.03$). This data is particularly interesting, since *KISS1* has the ability to form a complex with metalloproteinases and these, for instance, are related to invasiveness of pituitary adenomas to the cavernous, but not to the sphenoidal, sinus. When considered only NFPA, the variant allele was more frequent in males ($P=0.02$) and was associated with earlier age at presentation (median 33 years old, min 26 – max 42) when in homozygosis ($P<0.01$); the wild-type homozygotes and heterozygotes had medians of 50.0 (min 19 – max 73) and 54.8 (min 17 - max 84), respectively. Curiously, *KISS1* expression was lower in rs5780218 homozygotes both in somatotropinomas and NFPA. In conclusion, we have identified the *KISS1* and *KISS1R* underexpression in both somatotropinomas and NFPA, which lead to notion that the loss of expression might be related to the genesis of these adenomas. The rs5780218 *KISS1* variant allele was associated with invasion to the cavernous sinus and was found to be more frequent in somatotropinomas, suggesting that role of *KISS1*/*KISS1R* in tumor behavior might differ between pituitary adenomas subtypes.

Descriptors: gene expression; real-time polymerase chain reaction; polymorphism, single nucleotide; polymorphism, restriction fragment length; pituitary gland; adenoma; kisspeptins; neoplasm invasiveness.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Adenomas hipofisários

Os adenomas hipofisários são lesões neoplásicas de frequência relativamente comum, encontrados de forma incidental em cerca de 10% da população (1). Esses tumores são, em geral, neoplasias benignas de origem monoclonal que raramente evoluem para malignidade, caracterizada pela presença de metástase a distância. Entretanto, os tumores da sela túrcica podem causar significativa morbidade devido a sua localização na base do encéfalo, que podem crescer e se estender a áreas adjacentes, causando cefaleia, aumento da pressão intracraniana, distúrbios visuais, disfunção de nervos cranianos, entre outros sintomas compressivos do sistema nervoso central (2, 3).

Além disso, os adenomas hipofisários podem também gerar disfunção hormonal, por insuficiência ou excesso de produção hormonal, causando doenças e síndromes endocrinológicas [Tabela 1]. Quando não há evidência de disfunção hormonal clínica, estes tumores são denominados como adenomas clinicamente não funcionantes (ACNF) (2, 3).

A classificação histopatológica desses tumores é constantemente revista, mas mantém um padrão por diferenciá-los de acordo com a expressão dos hormônios hipofisários identificados na imuno-histoquímica [Tabela 1](3-5). Alguns tumores podem ainda ser mistos ou plurihormonais, o que torna sua classificação clinicopatológica ainda mais individual (4). Os adenomas hipofisários podem ser classificados ainda de acordo com o seu tamanho à ressonância magnética (RM) em microadenomas (< 1 cm), macroadenomas (1 – 4 cm) ou adenomas gigantes (> 4 cm) (6, 7).

Apesar da maioria dos adenomas hipofisários não levar a metástases à distância, de 5–35% são invasivos, estendendo-se para tecidos locais, incluindo seio cavernoso, seio esfenoidal, órbita e clivus, podendo, assim, ser classificados de acordo com o grau de invasão e extensão tumoral(8-11)[Figura 1].Esses tumores podem apresentar ainda um comportamento agressivo, caracterizado pela resistência a tratamentos convencionais e ao aumento na taxa de recorrência pós-cirúrgica do tumor (12).

Tabela 1. Classificação clinicopatológica e prevalência de adenomas hipofisários.

Adenomas	Imuno-histoquímica	Sintomas associados	Prevalência
Somatotrofinomas	GH	Gigantismo (jovens); Acromegalia (adultos)	10–15%
Mamossomatotrofinomas	GH e PRL	Distúrbios por excesso de GH e PRL	< 5%
Lactotrofinomas	PRL	Galactorréia e amenorreia (mulheres); Disfunção sexual e infertilidade	30–40%
Tireotrofinomas	TSH e subunidade- α	Hipertireoidismo	< 2%
Corticotrofinomas	ACTH	Síndrome de Cushing; Síndrome de Nelson	10–15%
Gonadotrofinomas	FSH, LH, SF-1, subunidade- α ,	Hipogonadismo; Hipopituitarismo; ganho de peso	<5%
Clinicamente Não-Funcionantes	em geral, FSH/LH	Efeito de massa tumoral e sintomas compressivos	25–30%

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico; GH: hormônio do crescimento; FSH: hormônio folículo-estimulante; LH: hormônio luteinizante; PRL: prolactina; TSH: hormônio tireoestimulante; SF-1: fator esteroidogênico-1. Adaptado de Asa & Ezzat (2002).

Segundo a mais recente classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2004), os tumores hipofisários podem ser classificados em: adenomas típicos, atípicos e carcinomas. Os adenomas hipofisários atípicos são assim definidos quando apresentam uma elevada atividade mitótica, um índice de ki-67 (antígeno nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase precoce G1, indicador de proliferação celular) > 3% e extensa imunorreatividade para o p53 (oncoproteína supressora tumoral), características morfológicas que poderiam ser "sugestivas" de um comportamento agressivo (13).

Apesar da caracterização histopatológica ser extremamente importante para distingui-los, é necessário também observar os aspectos clínicos, radiológicos e moleculares desses tumores para uma melhor definição de sua agressividade, possibilitando então uma maior fidedignidade do diagnóstico, predição do desfecho clínico e auxílio nas decisões terapêuticas(14).

Figura 1. a) Sistema de classificação de Hardy. Os tumores selares podem ser classificados como não invasivos (Grau 0, intacto com contorno normal; Grau 1, intacto com assoalho protraído; ou Grau 2, intacto com) ou invasivos (Grau 3, destruição selar localizada; ou Grau 4, destruição selar difusa). Tumores com extensão supra-selar podem ser simétricos (Grau A: cisternas supra-selar apenas; Grau B: recesso do terceiro ventrículo; ou Grau C: toda a porção anterior do terceiro ventrículo) ou assimétricos (Grau D: extradural intracraniano; ou Grau E: extradural extracraniano [seio cavernoso]). **b)** Sistema de classificação de Knosp, usado para quantificar a invasão do seio cavernoso, em que apenas os graus 3 e 4 representam invasão verdadeira do tumor para o seio cavernoso. Grau 0: sem envolvimento com o seio cavernoso; Grau 1: tumor direcionado para a parede medial do seio cavernoso, mas não ultrapassa a linha hipotética que se estende entre os centros dos dois segmentos das artérias carótidas internas; Grau 2: tumor ultrapassa o limite do Grau 1, mas não se estende adiante da linha tangencial às margens laterais das artérias; Grau 3: tumor se estende lateralmente para a carótida interna dentro do seio cavernoso; Grau 4: envolvimento total da carótida interna intracavernosa. Adaptado de Di Ieva et. al, 2014.

1.2. Tumorigênese hipofisária e progressão tumoral

O mecanismo de tumorigênese hipofisária ainda é controverso e parece resultar de uma complexa inter-relação entre fatores genéticos e humorais, que induzem alterações em diferentes vias de sinalização celular induzindo o processo tumorigênico(15). Grandes esforços foram dedicados para elucidar a origem genéticas dos adenomas hipofisários, seja nas formas familiares ou nas esporádicas, mas apenas alguns genes específicos foram correlacionados a esse processo, entre eles os genes *GNAS1*, *MEN1*, *CDKN1B*, *AIP*, *PTTG* e *MEG3*(16) [Figura 2]. Ainda, mutações em oncogenes e supressores tumorais clássicos não foram identificados em uma parcela significativa dos adenomas hipofisários (15, 17).

Figura 2. Causas genéticas dos tumores hipofisários. Adenomas hipofisários podem se desenvolver decorrente de alterações genômicas. Entre os casos esporádicos, apenas mutação somática no gene *GNAS1* está associada a uma parcela significativa dos casos. As demais alterações, parecem estar relacionadas a regulação epigenética que leva a expressão diminuída de supressores tumorais, como *MEG*, ou expressão aumentada de oncogenes, como *PTTG*. Mutações germinativas nos genes *MEN1*, *CDKN1B*, da subunidade regulatória da proteína-quinase A (*PRK4R1A*) levam ao aparecimento de adenomas hipofisários associados a síndromes genéticas, enquanto mutações no AIP aos adenomas hipofisários familiares isolados (FIPA). Adaptado de Korbonits *et al.* 2012.

Vários biomarcadores têm sido investigados em relação ao grau de invasividade e agressividade dos tumores hipofisários, incluindo alterações cromossômicas, microRNAs, marcadores de proliferação, oncogenes, genes supressores tumorais, fatores de crescimento e seus receptores e fatores relacionados a angiogênese e adesão celular. Contudo, as razões para as diferenças no comportamento tumoral são pouco compreendidas e não existem, até o momento, mecanismos confiáveis para prever a invasividade tumoral e/ou agressividade tumoral (18). Recentemente, foi sugerido que o *KISS1* e seu receptor *KISS1R* pudessem estar envolvidos no surgimento e progressão dos tumores hipofisários (19).

1.3. *KISS1* e *KISS1R*

O gene *KISS1* foi isolado, originalmente, de uma linhagem celular de melanoma maligno como um supressor de metástases (20). De acordo com a descrição de West e colaboradores, o *KISS1* é composto de 4 exons e 3 Introns, sendo o primeiro e o segundo exon não traduzidos, com sua localização mapeada no cromossomo 1q32 (21). Já na última década, foi proposta uma organização gênica alternativa, onde o *KISS1* é formado por 3 exons, sendo apenas o primeiro não codificador (22).

O produto inicial do gene *KISS1* é uma proteína hidrofílica de 145 aminoácidos, a prepro-kisspeptina, com massa molecular de 15,4 kDa. Fragmentos de Kisspeptinas endógenas de vários tamanhos foram isolados da placenta humana (23), sendo o mais longo desses peptídeos a kisspeptina-54, também conhecido como metastina, que contém 54 aminoácidos, que recebeu essa denominação devido a sua capacidade de suprimir metástases de linhagens celulares de melanoma e de carcinoma de mama *in vivo* (20, 24).

Outros peptídeos menores foram identificados, como a kisspeptina-14 (kp-14), kisspeptina-13 (kp-13) e kisspeptina-10 (kp-10) (21, 23, 25), sendo este último o fragmento de menor tamanho necessário para a ativação completa do seu receptor fisiológico, o *KISS1R* (26). Todos os fragmentos formados pelo *KISS1* compartilham o mesmo terminal-C da kp-54 e apresentam um motivo Arg-Phe-NH₂, característico da família de peptídeos RF-amida (27) [Figura 3]. Assim como a metastina, as demais kisspeptinas têm sido associadas com o controle tumoral e inibição de metástase em vários tipos de câncer (28).

O *KISS1R* pertence à família dos receptores acoplados a proteína G, do tipo Gq, sendo formado por 398 aminoácidos e possui 7 domínios transmembrana. O gene que codifica o receptor *KISS1R* é formado por 3 exons e está localizado no cromossomo 19p13.3 (29). Após a formação do complexo kisspeptina/*KISS1R*, a fosfolipase C (PLC) é ativada, induzindo a hidrólise de fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) em trifosfato de inositol (IP₃), levando a mobilização de cálcio intracelular. O aumento de Ca²⁺ intracelular resulta em mudanças na permeabilidade dos canais de íons, como o bloqueio dos canais de potássio, causando respostas de despolarização.

Figura 3. Estrutura das Kisspeptinas, produtos do gene *KISS1*. Diferentes kisspeptinas são geradas por clivagem proteolítica de um precursor comum, a prepro-kisspeptina, codificada pelo gene *KISS1*. Em humanos, *KISS1* é composto por 4 exons, sendo I e II não traduzidos (21). Entretanto, uma organização genômica alternativa foi proposta, com 3 exons (o primeiro sendo não-codificante) foi proposta (22). A prepro-kisspeptina humana contém 145 aminoácidos, com um peptídeo sinalizador de 19 resíduos e uma região central de 54 aminoácidos, a kisspeptina-54 (kp-54; também chamada de metastina). Formas de menor tamanho incluem kp-14, kp-13 e kp-10, está correspondendo a extensão terminal-c de 10 aminoácidos contendo o motivo RF-amida, suficiente para ativação completa do receptor KISS1R. Adaptado de Pinilla *et al.* 2012 e Roa *et al.* 2008

A hidrólise de PIP₂ também leva à formação de diacilglicerol (DAG), que, por sua vez, ativa a proteína quinase C (PKC), uma enzima que fosforila numerosos substratos, entre eles as MAP quinases, tais quais ERK1/2 e p38, que regulam diversos processos celulares como diferenciação, proliferação, resposta a estresse, expressão gênica, mitose, apoptose, entre outros (23, 30-32) [Figura 4].

Além de seu papel no controle tumoral, o complexo Kisspeptina/KISS1R tem sido estudado por sua atuação no processo de maturação e controle da função gonadal [Figura 5], como regulação da secreção pulsátil do GnRH hipotalâmico(33) e, portanto, desregulações nesse eixo geram disfunções clínicas, como início tardio ou avançado da puberdade humana, entre outros (27, 34). Esses dados foram corroborados pela descrição de mutações nos genes *KISS1* e *KISS1R* ativadoras e inativadoras, respectivamente, em pacientes com puberdade precoce dependente de gonadotrofinas e hipogonadismo hipogonadotrófico (35, 36).

Figura 4. Vias putativas e estabelecidas do complexo kisspeptina/KISS1R. Após ligação com kisspeptinas, a porção interna KISS1R fosforila Gq/11. A subunidade alfa da Gq/11 ativa PLC, que cliva PIP₂ em IP₃ e DAG. IP₃ promove liberação de cálcio intracelular do retículo endoplasmático, enquanto DAG ativa a cascata de sinalização por fosforilação de PKC. PKC, através de vários segundo mensageiros intermediários (incluindo Ras, Raf, MEK1/2) fosforila ERK1/2. Adicionalmente, KISS1R pode causar ativação da ERK1/2 via arrestina β2. Além disso, em tumores, KISS1R pode inibir ERK1/2 via inibina β1, que subsequentemente leva à inibição do NF-κB e MMP-2/9. DAG, diacilglicerol; ERK1/2, quinase extracelular regulada por sinal; IP₃, inositol trifosfato; MMP-2, metaloproteinases de matriz-2; MMP-9, metaloproteinases de matriz-9; NF-κB, fator nuclear κB; PIP₂ fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato; PKC, proteína quinase C; PLC, fosfolipase C. Adaptado de Wahabet *et al* 2016.

Figura 5. Controle neuroendócrino da função gonadal por sinalização de *KISS1/KISS1R*. O hipotálamo, que por várias vias regula o comportamento reprodutor, secreta um decapeptídeo chave, GnRH, que se liga ao seu receptor, GnRHR, nos gonadotrofos hipofisários, e está envolvido na indução da maturidade sexual através da regulação de síntese e secreção das gonadotrofinas FSH e LH. Kisspeptinas (*KISS1*), secretadas por neurônios cujo os corpos celulares estão localizados no núcleo anteroventralperiventricular (AVPV) e núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, sinalizam através do seu receptor (*KISS1R*) a regulação pulsátil da secreção de GnRH de outros neurônios hipotalâmicos, assim modulando essa via. FSH e LH tem papéis chave nas gônadas de ambos os sexos. Na gravidez, a gonadotrofina coriônica humana (hCG) da placenta assume o papel do LH, estimulando o corpo lúteo ovariano a produzir progesterona, que, por sua vez, estimula o útero e mantém a gravidez. Igualmente importante, inibina (INH) estradiol e testosterona modulam vários sistemas de feedback hipotálamo-hipófise-gônadas. Adaptado de Matzuk & Lamb, 2008.

1.3.1. *KISS1* e *KISS1R* na biologia do câncer

O *KISS1* parece atuar na regulação de eventos “*downstream*” de mecanismos de adesão da matriz celular envolvidos na regulação do citoesqueleto (24, 37). A perda da expressão de *KISS1* foi observada em pacientes com expressão diminuída de E-caderina na membrana celular, um gene com papel de supressor tumoral descrito em vários tumores (38, 39). Além disso, foi observada a associação entre a perda da expressão de *KISS1* e a proteína de retinoblastoma (pRb) inativada, um evento crítico na transição da fase G1/S do ciclo celular (40).

Outra via pela qual o *KISS1* pode agir é pelo *feedback* negativo com as metaloproteinases de matriz 2 (MMP-2) (10, 41) e 9 (MMP-9) (11, 42, 43). As MMP são uma família de endopeptidases dependente de zinco que atuam na degradação e reorganização da matriz extracelular e são frequentemente associadas a invasão tumoral e processo metastático (44). Interessantemente, foi descrito que as MMP possuem a capacidade de clivar a ligação peptídica Gly118-Leu119 das kisspeptinas, inativando-as (45, 46). A Figura 4 demonstra uma representação de algumas das vias de sinalização estabelecidas e putativas do sistema *KISS1/KISS1R*.

Além do trabalho de Lee e colaboradores em 1996 (20), que descreveu o *KISS1* pela primeira vez em melanomas, outros trabalhos subsequentes identificaram que a perda de expressão desta proteína resultava na progressão desses tumores *in vivo* (47, 48). Foi descrito também que as kisspeptinas suprimiam motilidade e quimiotaxia em melanomas trasfectados com *KISS1R in vivo*, assim como em ovário de hamster chinês *in vitro* (49). Similarmente, em um paciente que teve um melanoma curado com sucesso, foi encontrado um aumento da expressão de *KISS1*, quando comparada a lesão de pele antes e após o tratamento, avaliado utilizando a técnica de RT-qPCR (50).

Outros trabalhos reportaram a perda da expressão de *KISS1* relacionada a progressão de metástases oriundas de câncer de mama (51, 52). Foi descrito também que o *KISS1* promove genes envolvidos na parada do ciclo celular e apoptose em carcinomas de mama após estimulação do seu receptor *KISS1R* pela kisspeptina-10 (53).

A associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene *KISS1* e com o câncer também tem sido estudada. Quevedo e colaboradores avaliaram a frequência dos SNPs rs5780218 (c.-145delA) e rs12998 (p.Glu20Lys) em uma população Mexicana de pacientes com neoplasias malignas e benignas de mama e encontram uma associação do primeiro polimorfismo com a susceptibilidade ao câncer (54). Outros trabalhos buscaram encontrar associação de SNPs no gene *KISS1* e o prognóstico de câncer de mama (55) ou de cabeça e pescoço (56), porém não encontraram diferenças estatisticamente significantes.

Em tumores hipofisários, existem apenas dois trabalhos que avaliaram a expressão dos genes *KISS1/KISS1R* na tumorigênese e progressão dos adenomas hipofisários. Em nota, ambos os trabalhos não utilizaram técnicas de caráter quantitativo na avaliação desses genes e não o padrão de expressão de proteínas também não foi testado (19, 57). Esses trabalhos são descritos a seguir.

1.3.2. *KISS1* e *KISS1R* em adenomas hipofisários

Em 2011, MARTINEZ-FUENTES e colaboradores (19) foram os primeiros a investigar o papel do sistema *KISS1/KISS1R* nos adenomas hipofisários. Esses autores demonstraram a expressão de *KISS1* em 35.5% dos adenomas clinicamente não funcionantes (ACNF), 35% dos corticotrofinomas, 38.24% dos corticotrofinomas e 47.37% dos prolactinomas avaliados. Em relação ao receptor do *KISS1*, 51.1% dos ACNF, 40% dos corticotrofinomas, 41.18% dos somatotrofinomas e 57.89% dos prolactinomas testados apresentavam expressão desse transcrito. Com isso, os autores sugeriram que a perda completa, ou parcial, da expressão do *KISS1/KISS1R* em adenomas hipofisários poderia estar envolvida na etiologia desses tumores.

Recentemente, em 2015, YARON e colaboradores (57) avaliaram o padrão de expressão do mRNA do *KISS1* e *KISS1R* em adenomas hipofisários, e sua possível correlação com as características clínicas e tumorais, como tamanho, invasividade e padrão de secreção hormonal de 39 pacientes. A expressão de *KISS1R* foi detectada em 26 (67%) das amostras. Destas, 94% eram ACNF, 42% somatotrofinomas, 67% corticotrofinomas e 25% de adenomas secretores de prolactina. Assim, a maioria dos tumores que manteve que expressam do *KISS1R* foi de ACNF, 94%, contra 45.5% dos adenomas secretores.

Em relação ao sexo, 81% contra 50%, dos tumores que expressavam *KISS1R* eram do sexo feminino. Contudo, ao contrário do observado por MARTÍNEZ-FUENTES *et al.* (19) a expressão do MRNA de *KISS1* não foi detectada nem em tecido hipofisário normal nem em 15 amostras de tumores hipofisários analisados (10 ACNF, 2 secretores de GH, 2 secretores de ACTH e 1 secretor de prolactina) [Tabela 2].

Tabela 2. Frequência da expressão de *KISS1* e *KISS1R* em adenomas hipofisários, avaliada por RT-PCR convencional.

	MARTINEZ-FUENTES (2011)			YARON (2015)	
	<i>KISS1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>KISS1</i> + <i>KISS1R</i>	<i>KISS1</i>	<i>KISS1R</i>
ACNF	35.5% (16/45)	51.1% (23/45)	26.6% (12/45)	0% (0/10)	94% (16/17)
GH+	38.2% (13/34)	41.2% (14/34)	14.7% (4/34)	0% (0/2)	42% (5/12)
ACTH+	35.0% (7/20)	40.0% (8/20)	15.0% (3/20)	0% (0/2)	67% (4/6)
PRL+	47.4% (9/19)	57.9% (11/19)	37.0% (7/19)	0% (0/1)	25% (1/4)

ACNF: adenomas clinicamente não funcionantes; GH+: somatotrofinomas; ACTH+: corticotrofinomas; PRL+: prolactinomas

Dessa forma, ainda não existem dados conclusivos em relação ao papel do *KISS1* e de seu receptor na tumorigênese hipofisária. O estudo da expressão gênica e proteica, além da avaliação de polimorfismos do complexo *KISS1/KISS1R*, em uma nova coorte de pacientes com tumores hipofisários, poderia contribuir para uma melhor compreensão desse processo.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Avaliar a expressão do *KISS1* e do *KISS1R* nos somatotrofinomas e adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes.

Correlacionar a expressão do *KISS1* e do *KISS1R* com características clínicas, subtipos, tamanho e invasividade tumoral.

Avaliar a frequência do polimorfismo rs5780218 no *KISS1* em pacientes com somatotrofinomas e tumores hipofisários clinicamente não funcionantes e correlacioná-los com suas características clínicas e fenótipo tumoral.

3. METODOLOGIA

3.1. Pacientes

Esse estudo foi realizado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os participantes foram esclarecidos quanto aos objetivos e procedimentos desse estudo, dos quais foram obtidos o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido [Anexo 1].

Foram selecionados para o estudo de expressão 97 pacientes portadores de adenomas hipofisários (49 somatotropinomas e 48 ACNF), submetidos a cirurgia indicada para retirada do tumor, acompanhados nos ambulatórios da Unidade de Neuroendocrinologia da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia e da Divisão de Neurocirurgia Funcional/IPq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). De cada paciente, foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido amostras frescas do adenoma, que foram posteriormente armazenadas no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular – LIM25.

Foi feito um levantamento das características clínicas de cada paciente pela revisão dos prontuários médicos, quanto à idade ao diagnóstico, gênero e as avaliações anatomopatológica, hormonais e radiológicas no pré-operatório e pós-operatório.

3.2. Extração do DNA e RNA total

Inicialmente, para cada amostra de tumor obtida, foi realizada uma verificação da morfologia celular por microscopia de criocortes de 6µm corados com hematoxilina e eosina. Mediante a confirmação de que a amostra é de origem tumoral e que apresentava, pelo menos, 85% de células neoplásicas, cerca de 20 mg de tecido foram fragmentados em pulverizador *Tissuelyser LT* (Qiagen, Venlo, GER) para extração dos ácidos nucleicos utilizando o estojo comercial *AllPrep DNA/RNA Kit* (Qiagen, Venlo, GER), seguindo o protocolo do fabricante.

As amostras de DNA e do RNA extraídas foram submetidas à corrida eletroforética por 30 minutos a 100 volts em gel agarose 1%, solubilizado em tampão TAE 1X (tris base, ácido acético e EDTA), a fim de se verificar sua integridade. As amostras de RNA foram inicialmente incubadas por 10 minutos a 65°C para denaturação do material e, após a revelação da corrida, foram consideradas íntegras aquelas onde foram visíveis as bandas 18S e 28S ribossomais. O DNA e o RNA foram quantificados por espectrofotometria no aparelho *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, EUA), e amostras com razão de absorbância 260/280nm entre 1,7–2,0 (DNA n=97) e 1,8–2,1 (RNA n=68), foram consideradas de pureza satisfatória.

3.3. Expressão gênica quantitativa por RT-qPCR

Cerca de 1 µg de RNA total foi convertido em cDNA utilizando o kit *Quantitect Reverse Transcription* (Qiagen, Venlo, GER) seguindo as instruções do fabricante. Foram preparadas alíquotas de cDNA de cada paciente a uma concentração total de 50 ng, concentração escolhida por estar dentro do limite de detecção dos ensaios e produzir resultados estáveis em um teste piloto.

A quantificação do mRNA do *KISS1* e *KISS1R* foi realizada por PCR em tempo real, utilizando ensaios comerciais específicos, Hs00158486_m1 e Hs00261399_m1, respectivamente (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*). As reações foram preparadas em duplicata em um volume final de 25 µl, contendo 12,5 µl de *Taqman Gold Universal mastermix 2x* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), 1,25 µl de cada ensaio, 2,0 µl de cDNA (100 ng) e 10,25 µl de água purificada. As condições de termociclagem foram: denaturação inicial a 95°C por 10min, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 10 min.

Uma avaliação para determinação do gene de referência mais apropriado foi realizada utilizando os programas geNorm e NormFinder. Foram avaliados os genes *PPIE* (Peptidylprolylisomerase E; assay ID Hs01102333_m1), *ACTB* (beta-actina; assay Hs99999903_m1), *TBP* (Proteína ligadora TATA-box; assay ID Hs00427620_m1), *GUSB* (beta-glucuronidase; assay ID Hs00939627_m1), *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfatase-desidrogenase; assay Hs03929097_g1), *HPRT1* (Hipoxantina-ribosil-transferase; assay ID Hs02800695_m1), sendo demonstrado que o *PPIE* era o gene mais estável. Como amostra calibradora, foi utilizado um *pool* de RNA comercial de tecido hipofisário saudável *Human Pituitary Gland Poly A+ RNA* (*Clontech, Mountain View, CA, EUA*). A quantificação relativa (RQ) foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (58). A hiperexpressão de um gene foi definida por um valor de expressão RQ, número de vezes em que o gene alvo está expresso no tecido tumoral em relação a amostra calibradora, maior ou igual a 2 e a hipo-expressão foi definida por um valor de expressão menor ou igual a 0.5.

3.4. Genotipagem do polimorfismo

A avaliação do SNP rs5780218 do gene *KISS1* foi feita pelo método do polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP) utilizando a enzima Sml I da *New England Biolabs* (Ipswich, Massachusetts, EUA). As condições de PCR foram: 50 ng de DNA, 5 µl de *GoTaq Green Buffer* (*Promega*), 0,125 µl de *GoTaq DNA Polymerase* (*Promega*), 20 pMol de primer F (5'-CCTTTGCCTGCCTGGATGCA-3) e R (5'-TGGGCCTGTGCTTGGAGACG-3'), 5 pMol de dNTP, e água purificada para um volume final de 25 µl; e as condições do termociclador foram: denaturação inicial a 96°C por 2 minutos, 35 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 45 segundos, e extensão a 72°C por 45 segundos, seguida de extensão final a 72°C por 10 minutos (54).

O produto amplificado de 294 pb foi usado no protocolo de digestão contendo 15 µL da reação de PCR, 1 U da enzima de restrição Sml I, 1,5 µL de tampão. A reação de digestão foi incubada por 3h a 55°C e os fragmentos gerados foram corados com *Blue Green Loading* (LGC biotecnologia, São Paulo, BR) e separados por eletroforese em gel de agarose 2%. Bandas de 224 pb e 70 pb eram formadas na presença do alelo *wildtype*, enquanto a observação do amplicon intacto indicou a perda do sítio de restrição devido a presença da variante polimórfica.

O sequenciamento automático utilizando o método Sanger foi realizado em 20% das amostras avaliadas pelo PCR-RFLP para confirmação do genótipo. Para tal, o produto de PCR foi purificado com o mix de enzimas *ExoSap-IT* (*Affymetrix, Massachusetts, USA*) e posteriormente sequenciado utilizando o *BigDye Sequencing Kit* (*Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA*), seguindo o protocolo dos fabricantes. As amostras foram precipitadas e submetidas a eletroforese capilar no sequenciador ABI 3100 (*Applied Biosystems, Massachusetts, USA*). As sequências obtidas foram analisadas no software *Sequencher v4.0* (*Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA*) e foi observado concordância de 100% entre os genótipos determinados pelas duas metodologias.

3.5. Análise estatística

Os dados qualitativos foram avaliados por frequência e intervalo de confiança utilizando o teste do qui-quadrado, ou teste exato de Fisher, conforme apropriado. Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio-padrão ou mediana e intervalo de variação e analisados utilizando testes paramétricos (One Way ANOVA) e não paramétricos (Kruskal-Wallis) de acordo com distribuição normal e não normal, respectivamente. Os testes foram realizados utilizando a ferramenta STATA SE 14 (StataCorp LLC, Texas, USA) e o nível de significância considerado foi menor que 5% ($P < 0.05$).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos pacientes

A coorte deste estudo compreendeu 49 pacientes com somatotropinomas (27 mulheres e 22 homens) e 48 pacientes com ACNF (22 mulheres e 26 homens), com média de idade ao diagnóstico de 46.6 anos (± 13.9), sendo 86 macroadenomas e 5 microadenomas. Todos os somatotropinomas foram caracterizados pela imuno-histoquímica como positivos para a expressão de GH, enquanto apresentavam quadro clínico de secreção elevada dos níveis de GH e/ou IGF-1, enquanto os ACNF tinham marcação imuno-histoquímica heterogênea, muitas vezes sendo do tipo *null cell* (negativos para os principais marcadores hormonais), enquanto não apresentavam fenótipo de alteração dos perfis de secreção de nenhum hormônio hipofisário. A média do maior diâmetro tumoral foi de 2.7 ± 1.4 cm. Invasão foi observada em 52 tumores enquanto 45 permaneceram circunscritos na região selar. Quanto a invasão foi considerada apenas para o seio cavernoso, 44 foram classificados como invasivos *versus* 53 não invasivos.

A tabela 3 mostra as características clínicas de acordo com o subtipo de tumor. O anexo 2 apresenta os dados individualizados por paciente, incluindo os resultados das análises moleculares realizadas.

4.2. Expressão do *KISS1* e do *KISS1R* nos adenomas

4.2.1. *KISS1* e sua relação com o comportamento clínico e fenótipo tumoral

O nível de expressão do *KISS1* apresentou-se baixo em relação à hipófise normal (mediana: 0.14; mín-máx: 0.002 – 0.41) na maior parte dos pacientes avaliados (92.6%). Em apenas cinco casos (7.4%) essa expressão foi similar à da hipófise normal (mediana: 0.53; mín-máx: 0.51 – 0.54). Em nenhum caso foi observada hiper-expressão do gene *KISS1*.

Tabela 3. Caracterização clinicopatológica dos pacientes avaliados de acordo com o subtipo tumoral.

	Somatotropinomas (n=49)	ACNF (n=48)
Sexo (Feminino:Masculino)	27:22	22:26
Idade ao diagnóstico (Anos)	43.4 ± 12.1	50.0 ± 15.5
Avaliação hormonal pré-operatório		
GH	14.7 (5.7-42.8)	NA
IGF1	1030.5 (788-1108)	NA
ULNR IGF1	261.3 ± 49.8	NA
Avaliação hormonal pós-operatório		
GH	1.6 (0.5-5.8)	NA
IGF1	450.0 (235-892)	NA
ULNR IGF1	263.3±51.3	NA
Remissão hormonal (Sim:Não)	7:42	NA
Tamanho tumoral		
Maior diâmetro (cm)	1.9 (1.3-2.5)	3.0 (2.5-4.0)
Micro:Macro	5:44	0:48
Invasão (Sim:Não)		
Seio cavernoso e/ou esfenoidal	26:23	26:22
Seio cavernoso	25:24	19:29

ULNR: *upper limit normal range*. Média ± desvio padrão. Mediana (25 e 75 percentis). NA: não se aplica. Variáveis nominais foram apresentadas como números absolutos e variáveis contínuas como média ± desvio padrão ou mediana (25 - 75 percentis), conforme a presença de distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente.

Considerando os resultados do qPCR apenas como qualitativos (expressão positiva ou negativa), obtivemos que a expressão de *KISS1* está presente em 100% dos ACNF (32/32) versus 86.1% dos somatotropinomas (31/36), sem associações significantes detectadas entre os subtipos tumorais ($P=0.36$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de pacientes com expressão normal e hipo-expressão do *KISS1* em relação ao sexo, idade ao diagnostico, subtipo tumoral (funcionante x não funcionante), tamanho e invasividade do tumor [Tabela 4]. A tabela 4 inclui ainda a análise em relação às características estudadas nos somatotropinomas e ACNF isoladamente, onde também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

4.2.2. *KISS1R* e sua relação com comportamento clínico e o fenótipo tumoral

Em relação ao *KISS1R*, esse gene também se apresentou hipo-expresso em relação a hipófise normal (mediana: 0.01; mín-máx: 0.0 – 0.48) na maior parte dos pacientes avaliados (92.5%). A expressão do *KISS1R* foi similar (mediana: 1.1; mín-máx: 0.87 – 1.21) em três casos (4.5%) e maior à da hipófise normal (mediana: 2.9; mín-máx: 2.19 – 3.7) em outros dois (3.0%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a diferença de expressão do *KISS1R* em relação ao sexo, idade ao diagnostico, tamanho e invasividade do tumor [Tabela 5].

No entanto, foi observado que apenas os ACNF apresentavam hiper ou manutenção de expressão do *KISS1R* ($P=0.052$) [Tabela 5]. Essa diferença permanece estatisticamente significativa quando os resultados de RT-qPCR são interpretados qualitativamente (ou seja, ausência ou presença de expressão), onde a expressão de *KISS1R* é positiva em 68% (22/10) dos ACNF *versus* 37% (13/23) dos somatotropinomas ($P=0.01$). Comparando-se a mediana de expressão dos dois grupos a significância estatística foi de 0.049 (ACNF RQ: 0.034; mín-máx: 0.001 – 3.7 x somatotropinomas RQ: 0.015; mín-máx: 0.001 – 0.18).

4.2.3. Correlação entre a expressões de *KISS1* e *KISS1R*

Não houve correlação entre a expressão do *KISS1* e de seu receptor nos grupos de somatotropinomas ($\rho=0.10$ e $P=0.54$) e ACNF ($\rho=-0.06$ e $P=0.72$).

Tabela 4. Expressão relativa do *K/ISS1* em pacientes portadores de somatotropinomas e ACNF.

<i>K/ISS1</i> (RQ)	Hipo-expresso	Normal	P
Total (n=68)			
Sexo (F:M)	39:24	2:3	0.67
Idade diagnostica (anos)	47.9 ± 14.7	42.4 ± 18.3	0.43
Diagnostico (GH+:ACNF)	28:35	4:1	0.18
Tamanho do tumor			
Micro:Macro	3:59	0:5	0.61
Maior diâmetro (cm)	2.7 ± 1.3	2.8 ± 1.3	0.84
Invasão (Sim:Não)			
SC e/ou SE	37:26	4:1	0.35
SC	32:31	4:1	0.21
Somatotrofinomas (n=36)			
Sexo (F:M)	23:12	1:0	NA
Idade diagnostica (anos)	43.5 ± 11.8	26.0 ± 0	NA
Tamanho do tumor			
Micro:Macro	3:32	0:1	NA
Maior diâmetro (cm)	2.23 ± 1.17	2.0 ± 0	NA
Invasão (Sim:Não)			
SC e/ou SE	21:14	1:0	NA
SC	20:15	1:0	NA
ACNF (n=32)			
Sexo (F:M)	16:12	1:3	0.32
Idade diagnostica (anos)	56.6 (45-64)	55.0 (37-56)	0.41
Tamanho do tumor			
Maior diâmetro (cm)	3.31 ± 1.14	3.0 ± 1.39	0.65
Invasão (Sim:Não)			
SC e/ou SE	16:12	3:1	0.46
SC	12:16	3:1	0.32

RQ: quantificação relativa; ACNF: adenoma clinicamente não funcionantes; F: feminino; M: masculino; SC: seio cavernoso; SE: seio esfenoidal. NA: não avaliado. Variáveis nominais foram apresentadas como números absolutos e variáveis contínuas como média ± desvio padrão ou mediana (25 - 75 percentis), conforme a presença de distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente.

Tabela 5. Expressão relativa do *KISS1R* em pacientes portadores de somatotrofinomas e ACNF.

<i>KISS1R</i> (RQ)	Hipo-expresso	Normal	Hiper-expresso	P
Total (n=68)				
Sexo (F:M)	38:24	2:1	1:1	0.93
Idade diagnostica (Anos)	46.9 ± 15.1	62.3 ± 6.1	50.5 ± 0.7	0.18
Diagnostico (GH+:ACNF)	35:27	0:3	0:2	0.052
Tamanho do tumor				
Micro:Macro	3:58	0:3	0:2	0.88
Maior Diâmetro (cm)	2.73 ± 1.3	2.63 ± 0.2	2.55 ± 0.1	0.98
Invasão (Sim:Não)				
SC e/ou SE	37:25	3:0	0:2	0.09
SC	32:30	3:0	0:2	0.12
Somatotrofinomas (n=35)				
Sexo (F:M)	24:11	-	-	NA
Idade diagnostica (anos)	43.3±11.9	-	-	NA
Tamanho do tumor				
Micro:Macro	3:32	-	-	NA
Maior diâmetro (cm)	2.2±1.2	-	-	NA
Invasão (Sim:Não)				
SC e/ou SE	21:14	-	-	NA
SC	20:15	-	-	NA
ACNF (n=32)				
Sexo (F:M)	14:13	2:1	1:1	0.99
Idade diagnostica (anos)	55.0 (39-64)	61.0 (57-69)	50.5 (50-51)	0.40
Tamanho do tumor				
Maior diâmetro (cm)	3.4±1.2	2.6±0.2	2.5±0.1	0.37
Invasão (Sim:Não)				
SC e/ou SE	12:15	3:0	0:2	0.07
SC	9:17	2:1	0:2	0.46

RQ: quantificação relativa; ACNF: adenoma clinicamente não funcionante; GH+: somatotrofinomas; F: feminino; M: masculino; SC: seio cavernoso; SE: seio esfenoidal. NA: não avaliado. Variáveis nominais foram apresentadas como números absolutos e variáveis contínuas como média ± desvio padrão ou mediana (25 - 75 percentis), conforme a presença de distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente.

4.3. Genotipagem do polimorfismo rs5780218 *KISS1*

4.3.1. Distribuição Genotípica

Foi observado que o polimorfismo rs5780218 está em equilíbrio de Hardy-Weinberg na coorte estudada. A figura 6 exemplifica o padrão de restrição gerado pela enzima *Sml I* para determinação dos genótipos do polimorfismo rs578021. A distribuição desses genótipos nos pacientes com somatotropinomas e ACNF é apresentada na tabela 6.

Figura 6. Padrão de restrição do fragmento amplificado para avaliação do SNP rs5780218, obtido após digestão com a enzima *Sml I* e separado em gel de agarose 2%. A presença de duas bandas – 224 e 70 pb – são indicativas homozigoto wildtype A/A (paciente 1), da banda não digerida - 294 pb - homozigoto mutante –/– (paciente 2) e de três bandas – 294, 224 e 70 pb – genótipo heterozigoto A/– (paciente 3).

4.3.2 rs5780218 e sua relação com o comportamento clínico e fenótipo tumoral.

O resumo dos resultados da análise do rs5780218 é apresentado na tabela 6. Foi observada maior frequência da variante polimórfica em homozigose –/– nos somatotropinomas em relação aos ACNF (32.6% *versus* 10.4%, respectivamente; $P=0.03$ [Figura 7]. Quanto ao comportamento invasivo, invasão para o seio cavernoso foi mais frequente ($P=0.03$) entre os indivíduos portadores dessa variante alélica –/* (53.1%) quando comparado ao genótipo homozigoto selvagem A/A (30.3%), enquanto não houve diferença considerando-se invasão para o seio esfenoidal e/ou cavernoso.

Tabela 6. Frequência dos genótipos do SNP rs5780218 em pacientes portadores de somatotropinomas e ACNF.

rs5780218	A/A	A/-	-/-	P ^a	-/*	P ^b
Total (n=97)						
Sexo (F:M)	19:14	20:23	10:11	0.60	30:34	0.32
Idade diagnostica (anos)	46.5±13.3	49.63±15.3	41.3±11.3	0.09	46.6 ±14.5	0.97
Diagnostico (GH+:ACNF)	14:19	19:24	16:5	0.03	29:35	0.25
Tamanho do tumor						
Micro:Macro	3:29	1:39	1:18	0.43	2:57	0.23
Maior diâmetro (cm)	2.5 ± 1.2	3.0 ± 1.4	2.3 ± 1.3	0.06	2.8 ± 1.4	0.33
Invasão (Sim: Não)						
SC e SE	15:18	23:20	14:7	0.31	37:27	0.25
SC	10:23	21:22	13:8	0.06	34:30	0.03
Somatotrofinomas (n=49)						
Sexo (F:M)	6:8	12:7	9:7	0.55	21:14	0.27
Idade diagnostica (anos)	43.3±11.4	43.1 ± 14.9	43.9 ± 11.4	0.98	43.5±12.6	0.96
Tamanho do tumor						
Micro:Macro	3:11	1:18	1:14	0.27	2:32	0.11
Maior diâmetro (cm)	1.86 ± 1.0	2.56 ± 1.6	1.87 ± 0.7	0.24	2.26 ± 1.3	0.31
Invasão (Sim:Não)						
SC e SE	6:8	10:9	10:6	0.56	20:15	0.36
SC	5:9	10:9	10:6	0.34	20:15	0.17
Remissão hormonal (Sim:Não)	3:11	1:15	2:11	0.48	3:26	0.36
ACNF (n=48)						
Sexo (F:M)	13:6	8:16	1:4	0.04	9:20	0.02
Idade diagnostica (anos)	50(43-61)	55(50-64)	33(27-39)	<0.01	51.0 (27-64)	0.65
Tamanho do tumor						
Maior diâmetro (cm)	2.9 ± 1.2	3.5 ± 1.2	3.8 ±1.8	0.25	3.6 ± 1.2	0.11
Invasão (Sim:Não)						
SC e SE	9:10	13:11	4:1	0.45	17:12	0.44
SC	5:14	11:13	3:2	0.24	14:15	0.15

a| modelo codominante A/A x A/- x -/-; **b|** modelo dominante A/A x -/* . ACNF: adenoma clinicamente não funcionantes; F: feminino; M: masculino; SC: seio cavernoso; SE: seio esfenoidal. Variáveis nominais foram apresentadas como números absolutos e variáveis contínuas como média ± desvio padrão ou mediana (25 - 75 percentis), conforme a presença de distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente.

Analisando os subtipos tumorais isoladamente, não foram observadas diferenças na distribuição genotípica do rs5780218 nos somatotropinomas. Para os ACNF, o alelo polimórfico foi mais prevalente nos indivíduos do sexo masculino ($-/-$; $P=0.04$ e $-/*$; $P=0.02$) e estava associada a uma menor idade de diagnóstico (33.0 anos, 27-39; $P<0.01$) quando em homozigose $-/-$. Não houveram associações significantes com as demais características estudadas.

Figura 7. Percentual de distribuição dos genótipos do SNP rs5780218 em somatotropinomas e ACNF, de acordo com o modelo de codominância.

4.3.3 Relação do SNP rs5780218 com a expressão do mRNA *KISS1*.

A mediana de expressão do MRNA dos *KISS1* foi menor nos indivíduos homozigotos para o alelo mutante $-/-$ em relação aos homozigotos selvagem A/A em ambos os subtipos tumorais [Figura 8]. Essa diferença foi estatisticamente significativa nos somatotropinomas ($P=0.03$) onde as medianas e os respectivos quartís 25% e 75% nos diferentes genótipos foram: $KISS1RQ^{A/A} = 0.27$ (0.22–0.33), $KISS1RQ^{A/-} = 0.13$ (0.04–0.15) e $KISS1RQ^{-/-} = 0.18$ (0.03–0.22). Nos ACNF não foi observada significância estatística ($P=0.32$) e esses valores de expressão foram: $KISS1RQ^{A/A} = 0.15$ (0.07–0.25), $KISS1RQ^{A/-} = 0.18$ (0.13–0.33) e $KISS1RQ^{-/-} = 0.06$ (0.06–0.06).

Figura 8. Níveis de expressão relativa do mRNA do *KISS1* em relação aos genótipos do SNP rs5780218 **a)** A/A x A/- x -/- e **b)** A/A x -/* nos somatotropinomas e ACNF.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O sistema *KISS1/KISS1R*, tem sua importância reconhecida no eixo hipotálamo-hipófise desempenhando um papel crucial na regulação da secreção do GnRH, e consequentemente no desenvolvimento puberal (27, 34, 35). Apesar de amplamente estudado como supressor tumoral em diversos outros tecidos, o *KISS1* tem ainda poucos relatos na literatura envolvendo os adenomas hipofisários e sua potencial contribuição para a predição de comportamento desses tumores se mantém uma incógnita. O presente estudo teve como objetivos reportar a quantificação dos níveis de expressão gênica de *KISS1/KISS1R*, assim como a frequência de genótipos do polimorfismo rs5780218 no *KISS1*, procurando associa-los às características clínicas e o fenótipo tumoral de pacientes portadores de somatotropinomas e ACNF.

Quanto à expressão de *KISS1* e seu receptor nesses dois subtipos de adenomas hipofisários, foi observado que ambos os genes estavam majoritariamente hipo-expressos, independente do subtipo tumoral (*KISS1*: 97.2% em somatotropinomas e 87.5% em ACNF; *KISS1R*: 100% em somatotropinomas e 84.4% em ACNF), quando comparados a um pool de tecido hipofisário saudável. Assim, considerando o efeito supressor tumoral associado a expressão de *KISS1/KISS1R* já reportado em diversos tecidos (28) é possível que esses genes participem em algum estágio inicial da tumorigênese hipofisária e sua perda de expressão seja um evento importante para o desenvolvimento desses adenomas.

Uma forte tendência ($P=0.05208$) foi observada quanto à manutenção ou mesmo aumento da expressão de *KISS1R* em ACNF em relação aos somatotropinomas. Quando esses resultados foram interpretados de forma qualitativa (ou seja, presença ou ausência de expressão), encontramos positividade para o *KISS1* em de 92.6% (86.1% dos somatotropinomas e 100% dos ACNF). Já o *KISS1R*, estava expresso em 52.2% da população, sendo 37.1% dos somatotropinomas e 68.7% dos ACNF ($P=0.01$).

Esses resultados diferem, em parte, do estudo de MARTINEZ-FUENTES e colaboradores (19). Esses autores, em 2011, avaliaram a expressão do *KISS1* e do *KISS1R* nos adenomas hipofisários utilizando técnica de PCR qualitativa em uma coorte de 119 pacientes (somatotropinomas=34; ACNF= 45, prolactinomas=19, corticotropinomas=20, tireotropinomas=2); o *KISS1* foi expresso em 37.8% da casuística total, sendo positivo em 38.2% dos somatotropinomas e 35.6% ACNF, menos que a metade da frequência de expressão encontrada por nós, enquanto

KISS1R estava positivo em 47.1% de todos os casos (41.2% dos somatotropinomas e 51.1% dos ACNF), compatível com o que relatamos. Nas demais amostras de corticotropinomas, prolactinomas e tireotropinomas, a frequência de detecção de *KISS1* foi de 35.0%, 47.4% e 00.0%, respectivamente, enquanto *KISS1R* foi de 40.0%, 57.9% e 00.0%, respectivamente.

Mais recentemente, em 2015, YARON e colaboradores (57) também investigaram a expressão do *KISS1/KISS1R* em adenomas hipofisários utilizando a mesma técnica de PCR convencional. Os autores avaliaram 39 pacientes (somatotropinomas=12; ACNF= 17, corticotropinomas=6, prolactinomas=4) mas falharam em detectar *KISS1*, alegando inadequação na técnica, enquanto reportaram uma frequência de expressão de *KISS1R* em 41.7% dos somatotropinomas, 94.1% dos ACNF, 66.7% dos corticotropinomas e 25.0% dos prolactinomas. Estes autores, similar ao observado em nosso estudo, observaram uma maior proporção de casos de ACNF apresentando expressão do *KISS1R* em comparação com os outros subtipos secretores de hormônios ($P=0.003$).

Dessa forma, apesar das diferenças metodológicas que impediram a avaliação quantitativa da expressão do *KISS1/KISS1R* nos estudos anteriores, é nítida a existência de uma expressão diferencial do *KISS1R* de acordo com o subtipo tumoral, sendo ela maior e ocorrendo em uma maior proporção nos casos de ACNF. Considerando que os ACNF são denotados como tendo origem, principalmente, da linhagem de células hipofisárias gonadotróficas (59), e que o *KISS1R* já foi descrito na hipófise de ratos como tendo sua expressão parcialmente co-localizada com LH-b (60), é possível que a maior expressão observada nos ACNF seja devido a sua citodiferenciação. Assim, seria interessante investigar a expressão do *KISS1R* em relação ao padrão de marcação imuno-histoquímica dos ACNF, principalmente após a confirmação de linhagem celular utilizando os marcadores de transcrição.

Contudo, em nosso estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os níveis de expressão gênica do *KISS1* e do *KISS1R* e as características clínicas e de comportamento invasivo dos tumores hipofisários. Em nenhum dos dois estudos prévios foi observada essa relação, exceto pela tendência de maior expressão do *KISS1R* em pacientes do sexo feminino (57). Interessantemente, o trabalho de MARTINEZ-FUENTES e colaboradores (19) também relatou que, através da indução de kisspeptinas-10 em cultura de células

de hipófise adenomatosa, os somatotropinomas, mas não os ACNF, foram estimulados a aumentar os níveis cálcio citosólico livre, além de um aumento do índice apoptótico observado em ambas os subtipos tumorais. Estas observações aumentam o interesse sobre o potencial papel terapêutico da indução do sistema *KISS1/KISS1R* no tratamento dos adenomas hipofisários além de trazer conhecimento sobre o possível impacto fisiopatológico da perda de expressão desse sistema nesses tumores.

Em relação ao polimorfismo rs5780218, observamos uma diferença significativa entre a frequência dos genótipos quanto ao subtipo tumoral, sendo a variante polimórfica em homozigose mais frequente em somatotropinomas (32.6%) que em ACNF (10.4%; $P=0.03$). Comparando a *minor allele frequency (MAF)*, frequência do alelo polimórfico, dos somatotropinomas (0.35) e dos ACNF (0.52) com o reportado na base de dados do 1000 GENOME ($MAF= 0.48$; <http://www.internationalgenome.org/>), esta frequência é consideravelmente menor nos somatotropinomas. Entretanto, para definir a influência desse polimorfismo como alelo de suscetibilidade no desenvolvimento dos adenomas hipofisários, seria interessante o estudo de indivíduos controle provenientes da população local.

Analisando os ACNF isoladamente, foi encontrada uma relação com o sexo masculino e a frequência do alelo variante, seja em homozigose ou no modelo de dominância ($P=0.04$ e $P=0.02$, respectivamente), enquanto a idade diagnóstica dos portadores do genótipo $-/-$ foi encontrada como bem inferior (33 anos, 27–39; $P<0.01$) que os demais grupos no modelo de codominância. Essas associações são inéditas, e a implicância das mesmas na fisiologia de portadores de adenomas hipofisários se mantém incerta, e requer futuras investigações.

Quanto ao comportamento tumoral, foi encontrada diferença na distribuição genotípica quando considerada invasão para o seio cavernoso, sendo observado uma maior frequência deste tipo de invasão ($P=0.03$) em portadores do alelo variante do que nos indivíduos homozigotos para o alelo selvagem (35.0% *versus* 10.3% de todos os casos). Essa é uma associação particularmente interessante, visto que o *KISS1* pode exercer um *feedback* negativo na ação das metaloproteinases de matriz 2 (MMP-2) (10, 11, 41, 42).

O polimorfismo rs5780218 está localizado na região promotora do *KISS1* e pode ter importância funcional na regulação da transcrição desse gene. Não houveram ainda, tanto quanto é do melhor de nosso conhecimento, estudos funcionais

in vitro que elucidem esse mecanismo. Contudo, neste estudo, a expressão do *KISS1* foi comparada entre os diferentes genótipos e foi observada que a presença do alelo polimórfico, particularmente em homozigose, apresentou níveis menores de expressão do RNAm do *KISS1* e esta diferença foi estatisticamente significativa no grupo dos somatotropinomas ($P=0.03$).

Desta forma, este estudo corrobora com a literatura de que há expressão, ainda que reduzida, de *KISS1* e *KISS1R* em tumores de hipófise, trazendo dados inovadores de quantificação desses genes em somatotropinomas e ACNF que sugerem que sua perda expressão pode estar relacionada à eventos iniciais da tumorigênese hipofisária. A caracterização do rs5780218 traz dados adicionais sobre a importância do sistema *KISS1/KISS1* na etiologia e progressão tumoral, que pode diferir de acordo com o subtipo tumoral. Apesar desses resultados serem promissores, novos estudos envolvendo uma coorte ainda mais robusta e que empreguem metodologias de estudo de expressão e de interação de proteínas (e.g com metaloproteinases), são necessários para elucidar a importância e o papel o *KISS1/KISS1R* na fisiopatologia desses tumores.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Foi identificado que os genes *KISS1* e *KISS1R* estão hipo-expressos na vasta maioria dos somatotropinomas e adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes, sugerindo que sua perda de expressão pode ser um evento inicial na tumorigênese desses adenomas;

Contudo, não houve associação da expressão do *KISS1* e do *KISS1R* com características clínicas e o tamanho e o comportamento invasivo do tumor.

Foi observado que a diminuição da expressão do *KISS1R* foi menos pronunciada nos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes em relação aos somatotropinomas, o que pode ser devido à sua citodiferenciação ou indicativo de um papel diferencial do sistema *KISS1/KISS1R* de acordo com o subtipo tumoral.

O polimorfismo rs5780218 no *KISS1* mostrou-se relacionado à invasão do seio cavernoso, sendo esta variante alélica relacionada também a níveis mais baixos de expressão do RNAm do *KISS1*.

Por fim, nos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes o polimorfismo rs5780218 foi associado ainda a menor idade ao diagnóstico e esteve presente, em maior parte, nos indivíduos do sexo masculino.

7. ANEXOS

7. ANEXOS

7.1. Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido.

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

NOME: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____ SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____ Nº _____ APTO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TELEFONE: (____) _____

RESPONSÁVEL LEGAL: _____

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____ SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____ Nº _____ APTO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TELEFONE: (____) _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Análise da expressão gênica e proteica do KISS1 e de seu receptor em adenomas hipofisários”

2. PESQUISADORES: Responsável: **Ericka Barbosa Trarbach** / Executante: Paulo Vinicius Gonçalves Holanda Amorim

CARGO/FUNÇÃO: Aluno de Mestrado no programa de Endocrinologia – N°USP: 9248570

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular/LIM-25

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses (previsão)

Rubrica do sujeito da pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

5. DESENHO E OBJETIVOS DO ESTUDO: Fornecemos estas informações sobre o estudo para auxiliar na decisão em participar voluntariamente dessa pesquisa. Os tumores hipofisários são, na maioria dos casos, tumores benignos, que podem ou não produzir hormônios. Dependendo do tipo de hormônio produzido, o paciente apresenta uma doença diferente: aumento do hormônio do crescimento (acromegalia), aumento do cortisol (doença de Cushing), aumento da prolactina (prolactinoma). Mesmo quando não produzem hormônios, podem levar a sintomas significativos, como dores de cabeça e prejuízo à visão devido à proximidade com estruturas nobres, como o nervo responsável pela visão. Apesar de benignos, podem ser difíceis de tratar, devido a dificuldades na retirada completa durante a cirurgia por serem, muitas vezes, invasivos. Podem, ainda, apresentar crescimento e recidiva no pós-operatório. Este estudo visa pesquisar a expressão de genes e proteínas nos tumores hipofisários dos pacientes portadores dessa condição e sua relação com comportamento invasivo, crescimento tumoral e recidiva pós-operatória.

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS: Serão coletadas amostras de tecido do tumor da hipófise, obtido durante a cirurgia indicada para o tratamento. Os riscos para o paciente durante a obtenção das amostras são mínimos e dizem respeito exclusivamente ao procedimento cirúrgico em si. Reforçamos ainda que esta coleta não implicará em alterações na cirurgia e, portanto, não mudará o tratamento recebido. As amostras coletadas serão posteriormente analisadas em laboratório

7. BENEFÍCIOS PARA O PARTICIPANTE: Não há benefício direto para o participante, mas esse estudo poderá contribuir para a compreensão do comportamento invasivo nos tumores hipofisários. Somente o final do estudo poderemos concluir sobre a presença de algum benefício.

8. RELAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS QUE POSSAM SER VANTAJOSOS, PELOS QUAIS O PACIENTE PODE OPTAR: não há.

9. GARANTIA DE ACESSO: Em qualquer etapa do estudo, o participante 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. ERICKA BARBOSA TRARBACH e o Pesquisadora Executante é Paulo Vinicius Gonçalves Holanda Amorim, que podem ser encontrados no endereço Av. Doutor Arnaldo, 455, 4º andar – salas 4345/4347, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular/LIM-25, telefones: (11) 3061-7252 / (11) 3061-8486 / (11) 3061-4347. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Rua Ovídio Pires de Campos, 225; 5º andar; Tel.: 2661-7585, 26661-1548, 2661-1549, Email: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

10. É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

11. DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros indivíduos da pesquisa, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

12. DIREITO DE SER MANTIDO ATUALIZADO SOBRE OS RESULTADOS: O participante do estudo tem o direito de saber o resultado final quando o estudo estiver concluído.

13. 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.

Rubrica do sujeito da pesquisa ou responsável _____
Rubrica do pesquisador _____

14. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e os materiais coletados 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. ERICKA BARBOSA TRARBACH / Paulo Vinicius Gonçalves Holanda Amorim.

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 do 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, perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou prejuízo no meu atendimento neste Serviço.

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

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

7.2. Anexo 2. Quadro geral individualizado de análises moleculares e caracterização clínica fenotípica dos pacientes.

N	Sexo	ID	Diag.	GH	IGF1	ULNR-IGF1	RH	MDT (cm)	Tamanho	ISC	ISE	rs5780218	KISS1 (RQ)	KISS1R (RQ)
1	F	50	ACNF					2.6	MACRO	NAO	NAO	A/A	0.4	3.7
2	F	26	ACNF					2.3	MACRO	SIM	SIM	-/-	0.1	0.0
3	M		ACNF					2.3	MACRO	NAO	NAO	A/-		
4	M	55	ACNF					4.2	MACRO	SIM	NAO	A/-	0.5	0.0
5	M	51	ACNF					2.5	MACRO	NAO	NAO	A/-	0.2	2.2
6	M	61	ACNF					3.2	MACRO	NAO	SIM	A/A	0.0	0.0
7	F	66	ACNF					3.3	MACRO	SIM	SIM	A/-	0.1	0.0
8	M	62	ACNF					6.0	MACRO	SIM	SIM	A/-	0.0	0.5
9	M	56	ACNF					3.4	MACRO	NAO	NAO	A/A	0.2	0.4
10	F	57	ACNF					3.5	MACRO	NAO	NAO	A/-	0.3	0.0
11	F	55	ACNF					4.0	MACRO	SIM	SIM	A/-	0.5	0.2
12	F	69	ACNF					2.8	MACRO	SIM	SIM	A/A	0.1	1.1
13	F	61	ACNF					2.4	MACRO	SIM	NAO	A/A	0.2	0.9
14	F	46	ACNF					3.0	MACRO	NAO	NAO	A/-		
15	F	45	ACNF					1.2	MACRO	NAO	NAO	A/A	0.2	0.4
16	M	19	ACNF					1.2	MACRO	NAO	NAO	A/A	0.5	0.0
17	F	50	ACNF					1.8	MACRO	NAO	SIM	A/A	0.1	0.0
18	F	39	ACNF					2.2	MACRO	NAO	NAO	A/A	0.1	0.1
19	F	47	ACNF					2.6	MACRO	NAO	NAO	A/A	0.1	0.1
20	M	57	ACNF					2.7	MACRO	SIM	SIM	A/A	0.5	1.2
21	F	25	ACNF					2.8	MACRO	NAO	NAO	A/A	0.1	0.0
22	F	33	ACNF					3.0	MACRO	SIM	SIM	A/-	0.2	0.0
23	F	61	ACNF					2.8	MACRO	SIM	NAO	A/A	0.2	0.0
24	M	17	ACNF					4.0	MACRO	SIM	NAO	A/-	0.1	0.0
25	M	51	ACNF					3.0	MACRO	NAO	NAO	A/-		
26	M	39	ACNF					2.3	MACRO	SIM	NAO	A/-		
27	M	52	ACNF					5.2	MACRO	SIM	NAO	A/-	0.2	0.0
28	M	36	ACNF					5.5	MACRO	SIM	SIM	-/-		
29	M	42	ACNF					2.2	MACRO	NAO	NAO	-/-		
30	M	45	ACNF					4.1	MACRO	NAO	SIM	A/A	0.1	0.1
31	F	64	ACNF					5.4	MACRO	SIM	SIM	A/-	0.1	0.0
32	F	51	ACNF					3.7	MACRO	NAO	NAO	A/-		
33	F	51	ACNF					2.5	MACRO	NAO	NAO	A/A		

N	Sexo	ID	Diag.	GH	IGF1	ULNR-IGF1	RH	MDT (cm)	Tamanho	ISC	ISE	rs5780218	KISS1 (RQ)	KISS1R (RQ)
34	M	76	ACNF					2.5	MACRO	NAO	NAO	A/-	0.1	0.0
35	M	58	ACNF					1.6	MACRO	NAO	NAO	A/-	0.3	0.0
36	M		ACNF					2.7	MACRO	NAO	SIM	A/-		
37	M	50	ACNF					2.1	MACRO	NAO	NAO	A/-		
38	M	28	ACNF					1.9	MACRO	SIM	NAO	-/-		
39	F	73	ACNF					3.7	MACRO	SIM	NAO	A/A	0.1	0.0
40	F		ACNF					6.4	MACRO	NAO	SIM	A/A		
41	M	50	ACNF					2.5	MACRO	NAO	NAO	A/-		
42	M	84	ACNF					5.1	MACRO	NAO	SIM	A/-	0.2	0.2
43	F	71	ACNF					3.3	MACRO	SIM	NAO	A/-	0.1	0.1
44	F	43	ACNF					2.2	MACRO	NAO	NAO	A/A		
45	M	33	ACNF					5.2	MACRO	NAO	SIM	-/-		
46	M	31	ACNF					4.2	MACRO	NAO	NAO	A/A	0.3	0.0
47	M		ACNF					2.5	MACRO	SIM	NAO	A/-		
48	M	64	ACNF					3.7	MACRO	NAO	NAO	A/-	0.3	0.0
49	F	33	GH	47.8	1141	297	NAO	2.9	MACRO	SIM	NAO	-/-	0.1	0.0
50	F	51	GH	1261.0	1074	233	NAO	4.8	MACRO	SIM	SIM	A/-	0.1	0.0
51	M	20	GH	1.7	923	457	NAO	2.1	MACRO	NAO	NAO	A/A		
52	M	39	GH	183.0	1206	277	NAO	2.6	MACRO	SIM	SIM	A/A	0.3	0.0
53	F	42	GH	99.0	1136	261	NAO	4.0	MACRO	SIM	NAO	A/A	0.3	0.0
54	M	32	GH	121.8	1245	297	NAO	2.3	MACRO	SIM	SIM	A/A	0.3	
55	F	41	GH	6.7	501	277	NAO	3.5	MACRO	SIM	SIM	-/-	0.2	0.0
56	M	34	GH	25.0	1150	297	NAO	1.6	MACRO	NAO	NAO	A/-	0.0	0.0
57	M	71	GH	6.2	594	184	NAO	1.7	MACRO	SIM	SIM	-/-		
58	F	55	GH	9.6	1096	233	NAO	1.0	MACRO	NAO	NAO	A/A		
59	M		GH	77.6	1167	246	NAO	6.4	MACRO	SIM	SIM	A/-		
60	M	24	GH	15.1	1078	341	NAO	1.6	MACRO	NAO	NAO	A/-	0.0	0.0
61	F	64	GH	12.9	1102	207	NAO	1.3	MACRO	NAO	SIM	A/A	0.3	0.0
62	F	36	GH	1.6	524	277	NAO	2.0	MACRO	SIM	SIM	-/-		
63	M	36	GH	6.2	770	277	NAO	0.6	MICRO	NAO	NAO	A/-		
64	M	47	GH	51.7	1067	246	SIM	2.0	MACRO	NAO	SIM	-/-		
65	M	44	GH	0.8	386	261	SIM	2.3	MACRO	NAO	NAO	A/A	0.4	0.0
66	F	71	GH	14.3	1588	184	NAO	1.8	MACRO	SIM	NAO	A/-	0.1	0.0
67	F	37	GH	7.7	305	227	NAO	1.4	MACRO	NAO	NAO	A/A	0.2	0.0
68	M	39	GH	3.6	1029	277	SIM	0.8	MICRO	NAO	NAO	-/-	0.2	0.0
69	F	54	GH	37.9	1072	233	NAO	2.2	MACRO	NAO	NAO	A/-	0.2	0.1

N	Sexo	ID	Diag.	GH	IGF1	ULNR-IGF1	RH	MDT (cm)	Tamanho	ISC	ISE	rs5780218	KISS1 (RQ)	KISS1R (RQ)
70	F	61	GH	2.9	724	207	NAO	1.1	MACRO	NAO	NAO	—/—	0.2	0.1
71	F	51	GH	20.6	1297	233	NAO	2.5	MACRO	SIM	SIM	—/—	0.0	0.0
72	F	29	GH	34.2	1092	270	NAO	1.8	MACRO	NAO	NAO	A/—	0.0	0.0
73	F	30	GH	34.9	608	321	NAO	2.2	MACRO	SIM	SIM	—/—	0.0	0.0
74	M	58	GH	2.9	661	220	NAO	0.6	MICRO	NAO	NAO	A/A	0.3	0.0
75	F	48	GH	27.2	997	246	NAO	1.1	MACRO	NAO	NAO	A/A	0.0	0.2
76	F	21	GH	71.3	1433	342	NAO	3.4	MACRO	SIM	SIM	A/—	0.2	0.0
77	M	48	GH	3.6	1090	246	SIM	0.8	MICRO	NAO	NAO	A/A	0.3	0.0
78	F	37	GH	156.7	1051	277	NAO	3.7	MACRO	SIM	SIM	A/—	0.1	0.0
79	M	40	GH	7.8	934	277	NAO	5.9	MACRO	SIM	SIM	A/—	0.0	0.0
80	M	34	GH	33.8	812	297	NAO	3.4	MACRO	SIM	SIM	A/A	0.0	0.0
81	F	37	GH	29.6	1523	277	NAO	2.2	MACRO	SIM	SIM	A/A	0.3	0.0
82	F	40	GH	15.9	1114	277	NAO	1.5	MACRO	NAO	NAO	—/—	0.4	0.0
83	F	54	GH	3.7	815	233	NAO	1.2	MACRO	SIM	NAO	—/—	0.3	0.0
84	F	26	GH	1.7	350	270	NAO	2.0	MACRO	SIM	NAO	A/—	0.5	0.1
85	M	48	GH	8.4	976	246	SIM	0.9	MICRO	NAO	NAO	A/A		
86	F	41	GH	6.3	931	261	NAO	1.3	MACRO	SIM	NAO	—/—	0.2	0.0
87	F	59	GH	3.5	1032	220	NAO	1.1	MACRO	NAO	NAO	A/—	0.1	0.2
88	F	53	GH	22.5	729	190	SIM	2.2	MACRO	SIM	NAO	A/—	0.2	0.1
89	F	57	GH	6.6	806	172	SIM	1.7	MACRO	NAO	NAO	A/—	0.1	0.0
90	F	44	GH	148.8	1087	261	NAO	2.0	MACRO	SIM	NAO	A/—	0.1	0.0
91	M	29	GH	76.6	895	322	NAO	2.7	MACRO	SIM	SIM	—/—	0.0	0.0
92	M		GH					1.9	MACRO	NAO	NAO	A/—		
93	M	46	GH	5.1	920	246	NAO	2.7	MACRO	SIM	NAO	A/—	0.1	0.1
94	M	35	GH					1.6	MACRO	NAO	NAO	—/—		
95	M	49	GH					1.1	MACRO	NAO	NAO	—/—		
96	M	45	GH					1.2	MACRO	SIM	NAO	—/—		
97	F	51	GH					1.3	MACRO	NAO	NAO	A/—		

ID: idade diagnostica; Diag.: diagnostico; ULNR: *upper limit normal range* de IGF-1; RH: remissão hormonal; MDT: maior diâmetro tumoral; ISC: invasão seio cavernoso; ISE: invasão seio esfenoidal; RQ: valor de expressão gênica pelo método de *relative quantification*

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Molitch M. Nonfunctioning Pituitary Tumors and Pituitary Incidentalomas. 2008;37(1):151-71.
2. Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. J Clin Invest. 1122003. p. 1603-18.
3. Shimon I, Melmed S. Genetic basis of endocrine disease: pituitary tumor pathogenesis. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(6):1675-81.
4. Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. Endocr Rev. 1998;19(6):798-827.
5. Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumours. Nat Rev Cancer. 2002;2(11):836-49.
6. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. Cancer. 2004;101(3):613-9.
7. Trouillas J, Roy P, Sturm N, Dantony E, Cortet-Rudelli C, Viennet G, et al. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. Acta Neuropathol. 2013;126(1):123-35.
8. Turner HE, Nagy Z, Esiri MM, Harris AL, Wass JA. Role of matrix metalloproteinase 9 in pituitary tumor behavior. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85(8):2931-5.
9. Moreno CS, Evans CO, Zhan X, Okor M, Desiderio DM, Oyesiku NM. Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. Cancer Res. 2005;65(22):10214-22.
10. Liu W, Kunishio K, Matsumoto Y, Okada M, Nagao S. Matrix metalloproteinase-2 expression correlates with cavernous sinus invasion in pituitary adenomas. J Clin Neurosci. 2005;12(7):791-4.
11. Liu W, Matsumoto Y, Okada M, Miyake K, Kunishio K, Kawai N, et al. Matrix metalloproteinase 2 and 9 expression correlated with cavernous sinus invasion of pituitary adenomas. J Med Invest. 2005;52(3-4):151-8.
12. Pinto EM, Bronstein MD. [Molecular aspects of pituitary tumorigenesis]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008;52(4):599-610.

13. Lloyd R, Kovacs K, Young WJ, Farrell W, Asa S, Trouillas J, et al. Tumours of the pituitary gland. In: DeLellis R, Lloyd R, Heitz P, editors. *Pathology and Genetics Tumours of Endocrine Tumours*. Lyon: International Agency for Research and Cancer (IARC); 2004. p. 9–48.
14. Chatzellis E, Alexandraki KI, Androulakis, II, Kaltsas G. Aggressive pituitary tumors. *Neuroendocrinology*. 2015;101(2):87-104.
15. Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(5):257-66.
16. Robertson AM, Heaney AP. Molecular markers in pituitary tumors. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2016;23(4):324-30.
17. Korbonits M, Storr H, Kumar AV. Familial pituitary adenomas - who should be tested for AIP mutations? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77(3):351-6.
18. Mete O, Ezzat S, Asa SL. Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol*. 2012;49(2):R69-78.
19. Martinez-Fuentes AJ, Molina M, Vazquez-Martinez R, Gahete MD, Jimenez-Reina L, Moreno-Fernandez J, et al. Expression of functional KISS1 and KISS1R system is altered in human pituitary adenomas: evidence for apoptotic action of kisspeptin-10. *Eur J Endocrinol*. 2011;164(3):355-62.
20. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(23):1731-7.
21. West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics*. 1998;54(1):145-8.
22. Luan X, Zhou Y, Wang W, Yu H, Li P, Gan X, et al. Association study of the polymorphisms in the KISS1 gene with central precocious puberty in Chinese girls. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(1):113-8.
23. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*. 2001;276(37):34631-6.
24. Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res*. 1997;57(12):2384-7.

25. Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 8):1319-28.
26. Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, et al. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci.* 2009;29(12):3920-9.
27. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1235-316.
28. Makri A, Pissimissis N, Lembessis P, Polychronakos C, Koutsilieris M. The kisspeptin (KiSS-1)/GPR54 system in cancer biology. *Cancer Treat Rev.* 2008;34(8):682-92.
29. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 1999;446(1):103-7.
30. Roa J, Castellano JM, Navarro VM, Handelsman DJ, Pinilla L, Tena-Sempere M. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides.* 2009;30(1):57-66.
31. Castano JP, Martinez-Fuentes AJ, Gutierrez-Pascual E, Vaudry H, Tena-Sempere M, Malagon MM. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides.* 2009;30(1):10-5.
32. Wahab F, Atika B, Shahab M, Behr R. Kisspeptin signalling in the physiology and pathophysiology of the urogenital system. *Nat Rev Urol.* 2016;13(1):21-32.
33. Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med.* 2008;14(11):1197-213.
34. Silveira LG, Latronico AC, Seminara SB. Kisspeptin and clinical disorders. *Adv Exp Med Biol.* 2013;784:187-99.
35. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, et al. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2276-80.
36. Teles MG, Trarbach EB, Noel SD, Guerra-Junior G, Jorge A, Beneduzzi D, et al. A novel homozygous splice acceptor site mutation of KISS1R in two siblings with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol.* 2010;163(1):29-34.

37. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem*. 2001;276(31):28969-75.
38. Debies MT, Welch DR. Genetic basis of human breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001;6(4):441-51.
39. Bringuier PP, Girolodi LA, Umbas R, Shimazui T, Schalken JA. Mechanisms associated with abnormal E-cadherin immunoreactivity in human bladder tumors. *Int J Cancer*. 1999;83(5):591-5.
40. Sanchez-Carbayo M, Capodieci P, Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Am J Pathol*. 2003;162(2):609-17.
41. Yoshioka K, Ohno Y, Horiguchi Y, Ozu C, Namiki K, Tachibana M. Effects of a KiSS-1 peptide, a metastasis suppressor gene, on the invasive ability of renal cell carcinoma cells through a modulation of a matrix metalloproteinase 2 expression. *Life Sci*. 2008;83(9-10):332-8.
42. Zhu C, Takasu C, Morine Y, Bando Y, Ikemoto T, Saito Y, et al. KISS1 Associates with Better Outcome via Inhibiting Matrix Metalloproteinase-9 in Colorectal Liver Metastasis. *Ann Surg Oncol*. 2015;22 Suppl 3:S1516-23.
43. Gao GL, Liu LD, Zou XS, Chen WX. [Expression of KiSS-1, matrix metalloproteinase-9, nuclear factor-kappaBp65 in ovarian tumour]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2007;42(1):34-8.
44. Paez-Pereda M, Kuchenbauer F, Arzt E, Stalla GK. Regulation of pituitary hormones and cell proliferation by components of the extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(10):1487-94.
45. Takino T, Koshikawa N, Miyamori H, Tanaka M, Sasaki T, Okada Y, et al. Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/metastin by matrix metalloproteinases. *Oncogene*. 2003;22(30):4617-26.
46. Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. 2007;151(8):1143-53.
47. Shirasaki F, Takata M, Hatta N, Takehara K. Loss of expression of the metastasis suppressor gene KiSS1 during melanoma progression and its association with LOH of chromosome 6q16.3-q23. *Cancer Res*. 2001;61(20):7422-5.

48. Mitchell DC, Stafford LJ, Li D, Bar-Eli M, Liu M. Transcriptional regulation of KiSS-1 gene expression in metastatic melanoma by specificity protein-1 and its coactivator DRIP-130. *Oncogene*. 2007;26(12):1739-47.
49. Hori A, Honda S, Asada M, Ohtaki T, Oda K, Watanabe T, et al. Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;286(5):958-63.
50. Hesling C, D'Incan M, Mansard S, Franck F, Corbin-Duval A, Chevenet C, et al. In vivo and in situ modulation of the expression of genes involved in metastasis and angiogenesis in a patient treated with topical imiquimod for melanoma skin metastases. *Br J Dermatol*. 2004;150(4):761-7.
51. Kostadima L, Pentheroudakis G, Pavlidis N. The missing kiss of life: transcriptional activity of the metastasis suppressor gene KiSS1 in early breast cancer. *Anticancer Res*. 2007;27(4b):2499-504.
52. Stark AM, Tongers K, Maass N, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131(3):191-8.
53. Becker JA, Mirjolet JF, Bernard J, Burgeon E, Simons MJ, Vassart G, et al. Activation of GPR54 promotes cell cycle arrest and apoptosis of human tumor cells through a specific transcriptional program not shared by other Gq-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;326(3):677-86.
54. Quevedo EG, Aguilar GM, Aguilar LA, Rubio SA, Martinez SE, Rodriguez IP, et al. Polymorphisms rs12998 and rs5780218 in KiSS1 suppressor metastasis gene in Mexican patients with breast cancer. *Dis Markers*. 2015;2015:365845.
55. Pentheroudakis G, Kostadima L, Dova L, Georgiou I, Tzavaras T, Vartholomatos G, et al. A twisted kiss: in vitro and in vivo evidence of genetic variation and suppressed transcription of the metastasis-suppressor gene KiSS1 in early breast cancer. *Neoplasma*. 2010;57(1):47-54.
56. Ruiz MT, Galbiatti AL, Pavarino EC, Maniglia JV, Goloni-Bertollo EM. Q36R polymorphism of KiSS-1 gene in Brazilian head and neck cancer patients. *Mol Biol Rep*. 2012;39(5):6029-34.
57. Yaron M, Renner U, Gilad S, Stalla GK, Stern N, Greenman Y. KISS1 receptor is preferentially expressed in clinically non-functioning pituitary tumors. *Pituitary*. 2015;18(3):306-11.

58. 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.
59. Kontogeorgos G, Thoudou E. The gonadotroph origin of null cell adenomas. *Hormones (Athens)*. 2016 Apr;15(2):243-7. doi: 10.14310/horm.2002.1652.
60. Richard N, Galmiche G, Corvaisier S, Caraty A, Kottler ML. KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol*. 2008 Mar;20(3):381-92. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01653.x. Epub 2008 Jan 17.