

ANDREA RAMOS DE CASTRO MOREIRA

**Associação das variantes no gene do receptor de prolactina com a  
resposta à cabergolina em pacientes com prolactinoma**

São Paulo

2022

ANDREA RAMOS DE CASTRO MOREIRA

**Associação das variantes no gene do receptor de prolactina com a  
resposta à cabergolina em pacientes com prolactinoma**

**Versão Original**

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

Área de Concentração: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Marcello Delano  
Bronstein

Co-orientador: Dra. Ericka Barbosa  
Trarbach

São Paulo

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Andrea Ramos de Castro

Associação das variantes no gene do receptor de prolactina com a resposta à cabergolina em pacientes com prolactinoma / Andrea Ramos de Castro Moreira. - São Paulo, 2022.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientador: Marcello Delano Bronstein .

Coorientadora: Ericka Barbosa Trarbach.

Descritores: 1.Prolactinoma 2.Prolactina  
3.Hiperprolactinemia 4.Agonistas de dopamina  
5.Cabergolina 6.Gene do receptor de prolactina  
7.Variantes genéticas

USP/FM/DBD-378/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: MOREIRA, Andrea Ramos de Castro

Título: Associação das variantes do gene do receptor de prolactina com a resposta à cabergolina em pacientes com prolactinoma

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

---

Instituição:

---

Julgamento

---

*Aos meus pais, Patrícia e Eduardo, que me conduziram e me deram as bases para chegar até aqui. À minha irmã, Amanda, que sempre foi minha maior incentivadora e melhor amiga. Ao meu cunhado, Leonardo, que pude contar como um mentor e irmão. Ao Carlos Augusto, que esteve ao meu lado me apoiando e me ajudou em cada detalhe com paciência e carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço à toda Unidade de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, à disciplina de Endocrinologia e Metabologia e ao Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular, LIM 25. Ao querido Professor Dr. Marcello Delano Bronstein que foi o grande responsável pelo caminho escolhido, me incentivando e me dando essa oportunidade. A minha querida coorientadora Dra. Ericka B. Trarbach, que me auxiliou, ensinou e ajudou em todos os momentos. À Dra. Andrea Glezer, quem possibilitou todo meu estudo, não só no ambulatório mas durante todo o processo me orientou ativamente com toda disponibilidade e cuidado. Aos queridos professores que sempre estiveram me apoiando e contribuindo de alguma forma, Dra. Raquel Jallad, Dr. Márcio Machado, Dra. Cristina Formiga, Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge, Dr. Rafael Loch. A todos os funcionários, sempre prestativos, em especial à Graça Cavalcante. Aos colegas Isabella Passeti P. Grande, Anna Louise Stellfeld e todos os amigos que conheci durante esse percurso. Ao serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente ao Dr. Gustavo Maciel. Ao Departamento de Neurorradiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente ao Dr. Mário Padula. À toda minha família e amigos que foram compreensivos e parceiros durante todo o processo, me encorajando nos momentos de dúvidas e dificuldades.*

*"Se não fosse pela grande variabilidade entre os indivíduos, a medicina poderia muito bem ser uma ciência, não uma arte" (William Osler).*

## RESUMO

Moreira ARC. Associação das variantes do gene do receptor de prolactina com a resposta à cabergolina em pacientes com prolactinoma [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: Estudos recentes identificaram variantes no gene do receptor de prolactina em pacientes com prolactinoma e duas dessas variantes (p.Glu400/Asn516Ile) foram associadas ao aparecimento deste tumor. A análise funcional da variante p.Asn516Ile demonstrou que essa alteração levou ao aumento da expressão da Akt e da proliferação celular induzidas pela prolactina, estado que pode ser revertido pelo tratamento com inibidor de Akt. Contudo, a associação entre as variantes no gene do receptor de prolactina e a resposta ao tratamento com cabergolina não havia sido investigada. Objetivo: Este estudo visa analisar o gene do receptor de prolactina em uma extensa coorte de pacientes com prolactinomas, a fim de verificar a relação de suas variantes com o surgimento desses tumores e a resposta à cabergolina bem como com as características clínicas e tumorais desses pacientes. Métodos: O DNA foi extraído a partir de amostra de sangue periférico de 178 (141 mulheres e 37 homens) pacientes com prolactinoma, destes casos 146 receberam tratamento com cabergolina. O gene do receptor de prolactina foi analisado por técnicas de PCR e sequenciamento automático do tipo Sanger. Resultados: A média de idade ao diagnóstico foi de  $30.4 \pm 11,6$  anos e a mediana de prolactina sérica ao diagnóstico de 177,5 (86-500) ng/mL. Nos pacientes com prolactinoma, foram identificadas as variantes p.Ile100Val (n=18), p.Ile170Leu (n=6), p.Glu400Gln/p.Asn516Ile (n=3), p.Glu470Asp (n=1) e p.Ala591Pro (n=1), duas delas nunca descritas em prolactinomas, Glu470Asp e p.Ala591Pro. As variantes estavam em heterozigose e a Glu400Gln/p.Asn516Ile estavam em completo desequilíbrio de ligação, ou seja, herdadas juntas no mesmo alelo. Pela análise preditiva *in silico*, todas as variantes foram classificadas como benignas pela maioria das ferramentas, com exceção da p.Asn516Ile que apresentou potencial patogênico. Esta variante, junto com a p.Glu400Gln, foram encontradas em maior frequência alélica nos pacientes com prolactinoma do que no banco de variantes brasileiras ABraOM (0,01 versus 0,0004; P=0.001). Em relação a resposta à cabergolina, 111 (76%) casos eram

sensíveis enquanto que 35 (24%) foram classificados como resistentes. Destes, 10,8% e 42,9% dos pacientes sensíveis e resistentes, respectivamente, eram portadores de variantes no gene do receptor de prolactina ( $P < 0.0001$ ). Além da associação com a resistência à cabergolina, a presença das variantes foi associada a uma maior frequência de pacientes do sexo masculino (37,9% vs 17,1%  $P = 0,01$ ), maiores níveis de PRL ( $P = 0,007$ ) e maior tamanho tumoral ( $P = 0,001$ ). Conclusão: As variantes p.Glu400Gln/p.Asn516Ile do gene do receptor de prolactina parecem ter papel na tumorigênese dos prolactinomas e todas as variantes descritas podem estar implicadas na resistência ao tratamento padrão-ouro com cabergolina.

Palavras-chave: Prolactinoma. Prolactina. Hiperprolactinemia. Agonistas dopaminérgicos. Cabergolina. Gene do receptor de prolactina. Variantes genéticas.

## ABSTRACT

MOREIRA ARC. Genetic variants of prolactin receptor gene and its relationship with cabergoline response in patients with prolactinoma. [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Introduction: Recent studies identified variants in the prolactin receptor gene in patients with prolactinoma and two of these variants (p.Glu400/Asn516Ile) were associated with the appearance of this tumor. Functional analysis of the p.Asn516Ile variant showed that this alteration led to increased expression of Akt and cell proliferation induced by prolactin, a state that can be reversed by treatment with an Akt inhibitor. However, the association between variants in the prolactin receptor gene and the response to treatment with cabergoline had not been investigated.

Objectives: This study aims to analyze prolactin receptor gene in an extensive cohort of patients with prolactinomas, to relate its variants with the emergence of these tumors and its response to cabergoline, as well as with the clinical and tumoral characteristics of these patients. Methods: DNA was extracted from peripheral blood samples of 178 (141 women and 37 men) patients with prolactinoma, of which 146 received treatment with cabergoline. The prolactin receptor gene was analyzed by PCR techniques and automatic *Sanger* sequencing. Results: The mean age at diagnosis of the patients was  $30.4 \pm 11.6$  years and the median serum prolactin at diagnosis was 177.5 (86-500) ng/mL. The variants p.Ile100Val (n=18), p.Ile170Leu (n=6), p.Glu400Gln/p.Asn516Ile (n=3), p.Glu470Asp (n=1) and p.Ala591Pro (n= 1) were identified and both Glu470Asp and Ala591Pro have never been described in prolactinomas patients. All these variants were in heterozygosity and p.Glu400Gln/p.Asn516Ile were in complete linkage disequilibrium, inherited together on the same allele. By in silico predictive analysis, all variants were classified as benign by most tools, with the exception of p.Asn516Ile which showed pathogenic potential in all of them. This variant, associated with p.Glu400Gln, were found at a higher allelic frequency in patients with prolactinoma than in the Brazilian variant bank, ABraOM (0.01 versus 0.0004;  $P=0.001$ ). We found that 111 (76%) patients were cabergoline sensitive, while 35 (24%) were cabergoline resistant. Of these, 10.8% and 42,9%, of the sensitive and resistant, respectively, were carriers of variants ( $P<0.0001$ ). The presence of variants in the prolactin receptor gene

was associated with a higher frequency of male patients (37.9% vs 17.1%  $P = 0.01$ ), higher levels of prolactin ( $P=0.007$ ), larger tumor size ( $P=0.001$ ) and resistance to cabergoline ( $P<0.0001$ ). Conclusion: The p.Glu400Gln/p.Asn516Ile variants of prolactin receptor gene seem to play a role in the tumorigenesis of prolactinomas and all described variants may be implicated in resistance to the gold standard treatment with cabergoline.

Keywords: Prolactinoma. Prolactin. Hyperprolactinemia. Dopamine Agonists. Cabergoline. Prolactin receptor gene. Genetic Variants.

**LISTAS**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Representação esquemática do <b>(a)</b> gene <i>PRL-R</i> e de seus transcritos em humanos (isoformas longa, curta S1a, curta S1b, intermediária e solúvel) e <b>(b)</b> dos principais domínios proteicos do PRL-R .....	26
<b>Figura 1.2.</b> PRL/PRL-R e suas vias de sinalização: JAK2/STAT5, Ras/MAPK, PI3k/Akt/mTOR envolvidas na diferenciação e proliferação celular em <b>(a)</b> lactotrofos normais e <b>(b)</b> prolactinomas.....	27
<b>Figura 4.1.</b> Coorte do estudo .....	42
<b>Figura 5.1.</b> Eletroferogramas das seis variantes identificadas nos pacientes com prolactinoma .....	57
<b>Figura 6.1.:</b> Gene <i>PRL-R</i> e as variantes descritas previamente na literatura e no estudo atual .....	69
<b>Figura 6.2.:</b> Modelo PRL/PRL-R e mecanismos de tumorigênese .....	74

## LISTA DE GRÁFICOS

- Grafico 5.1.** Correlação entre os níveis de prolactina e o maior diâmetro tumoral dos pacientes com prolactinoma ..... 53
- Gráfico 5.2.** Relação dos níveis de prolactina **(a)** e maior diâmetro tumoral **(b)** entre pacientes portadores e não portadores de variantes no gene *PRLR* ..... 61
- Grafico 5.3.** Frequência de macroadenomas e microadenomas entre pacientes portadores e não portadores de variantes no gene *PRLR* ( $P=0.03$ ) ..... 62
- Grafico 5.4.** Comparação da frequência a resposta a CAB entre pacientes portadores e não portadores de variantes no gene *PRL-R* ( $P<0.0001$ ) ..... 62
- Grafico 5.5.** Relação dos níveis de prolactina **(a)** e maior diâmetro tumoral **(b)** entre pacientes portadores e não portadores de variantes no gene *PRLR* ..... 63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> Descrição das variantes no gene <i>PRL-R</i> descritas na literatura .....	34
<b>Tabela 1.2</b> Resumo dos estudos que avaliaram as variantes no <i>PRL-R</i> em doenças.....	35
<b>Tabela 4.1.</b> Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos exons codificantes do <i>PRL-R</i> .....	46
<b>Tabela 5.1.</b> Comparação das características dos pacientes estudados de acordo com o sexo .....	52
<b>Tabela 5.2.</b> Comparação das características dos pacientes estudados, ao diagnóstico, de acordo com a classificação tumoral em macro e microadenoma .....	52
<b>Tabela 5.3.</b> Características clínicas e tumorais dos pacientes com prolactinoma em relação a resposta ao tratamento a cabergolina .....	55
<b>Tabela 5.4.</b> Número de casos resistentes e sensíveis à CAB segundo a normalização do nível hormonal de PRL e redução tumoral (n=146) .....	56
<b>Tabela 5.5</b> Variantes encontradas no gene <i>PRL-R</i> em pacientes portadores de prolactinomas .....	56
<b>Tabela 5.6.</b> Frequência das variantes <i>missense</i> do PRL-R observadas em pacientes com prolactinoma e comparação com a frequência observada em banco de dados .....	57
<b>Tabela 5.7.</b> Análise <i>in silico</i> das variantes <i>missenses</i> observadas no <i>PRL-R</i> em pacientes com prolactinoma .....	58
<b>Tabela 5.8.</b> Características clínicas e tumorais nos pacientes com e sem variantes no gene do PRL-R .....	60
<b>Tabela 5.9.</b> Características dos pacientes portadores de variantes no gene <i>PRL-R</i> .....	64
<b>Tabela 6.1.</b> Variantes do PRL-R descritas na literatura e no presente estudo e suas análises funcionais .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Agonistas dopaminérgicos
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
BRC	Bromocriptina
CAB	Cabergolina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
COOH	Terminação carboxil
DEC	Domínio Extracelular
DIC	Domínio Intracelular
DL	Desequilíbrio de ligação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo
DP	Desvio padrão
D2R	Receptor 2 de dopamina
EGF	Fator de crescimento da epiderme
ER $\alpha$	Receptor de estrogênio tipo $\alpha$
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GAS	$\gamma$ interferon elementos sensíveis
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
His	Histidina
IC	Intervalo de confiança
Ile	Isoleucina
JAK2	Janus quinase 2

Leu	Leucina
Lys	Lisina
MAF	Frequência do alelo raro
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MEN1	Neoplasia endócrina múltipla tipo 1
n	Amostra
NH2	Terminação amino
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 quinase
PRL	Prolactina
PRL-R	Receptor da prolactina
<i>PRL-R</i>	gene do receptor da prolactina
Pro	Prolina
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
SNP	Polimorfismo de base única
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
SOCS	Inibidor de transdutor de sinal
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TM	Domínio transmembrana
UTR	Região não traduzida
Val	Valina

## LISTA DE SÍMBOLOS

=	Igual a
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
μl	Microlitro
L	Litro
M	Mol
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mM	Milimol
ng	Nanograma
ng/mL	Nanograma por mililitro
pmol	Picomol
U	Unidades

## SUMÁRIO

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Os prolactinomas.....	21
1.2	A regulação da prolactina.....	23
1.3	O receptor da prolactina.....	24
1.4	O sistema PRL/PRL-R.....	28
1.5	As variantes do gene <i>PRL-R</i> nas doenças.....	31
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	Objetivo primário.....	37
2.2	Objetivos Secundários.....	37
3	JUSTIFICATIVA.....	39
4	PACIENTES E MÉTODOS.....	41
4.1	Considerações éticas.....	41
4.2	Tipo e desenho do estudo.....	41
4.3	Coorte.....	41
4.3.1	Critérios de inclusão.....	42
4.3.2	Critérios de exclusão.....	43
4.3.3	Amostra controle .....	43
4.4	Avaliação clínica e laboratorial .....	43
4.5	Avaliação radiológica .....	44
4.6	Critérios clínicos de resposta ao tratamento com CAB .....	44
4.7	Análise molecular do gene <i>PRL-R</i> .....	45
4.7.1	Extração do DNA genômico .....	45
4.7.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	45
4.7.3	Purificação da PCR e reação de sequenciamento automático .....	46
4.7.4	Análise <i>in silico</i> das variantes <i>missense</i> .....	47
4.8	Análise estatística.....	49
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Seleção e avaliação dos pacientes .....	51
5.2	Resposta a cabergolina .....	53
5.3	Análise genética do <i>PRL-R</i> e avaliação <i>in silico</i> das variantes identificadas.....	54

5.4	Relação das variantes do <i>PRL-R</i> , com características clínicas, tumorais e resposta a cabergolina.....	59
6	DISCUSSÃO.....	66
7	CONCLUSÕES.....	76
	REFERÊNCIAS.....	78
	APÊNDICES.....	87
	ANEXOS.....	93

## **1 INTRODUÇÃO**

### 1.1. Os prolactinomas

Os prolactinomas, tumores com secreção autônoma de prolactina (PRL), são os tumores hipofisários mais comuns e constituem até 60% de todos esses casos<sup>1; 2</sup>. Esses tumores acometem mais frequentemente mulheres em idade fértil, entre as 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> décadas de vida<sup>2</sup>.

O quadro clínico decorrente da hiperprolactinemia é caracterizado por hipogonadismo hipogonadotrófico, infertilidade e galactorréia. Os principais sintomas nas mulheres são redução da fase lútea, ciclos anovulatórios, irregularidades menstruais como oligomenorréia ou amenorréia (primária ou secundária), infertilidade e ganho de peso<sup>3</sup>. Tanto nos homens quanto nas mulheres pode ocorrer redução de densidade mineral óssea e fraturas<sup>4</sup>.

Nos homens, o hipogonadismo pode levar à perda da libido, disfunção erétil, ginecomastia e infertilidade, com prejuízo da quantidade e viabilidade dos espermatozoides. O principal mecanismo envolvido no hipogonadismo pela hiperprolactinemia é a redução da expressão da kisspeptina no hipotálamo, reduzindo a secreção e a pulsatilidade das gonadotrofinas<sup>5</sup>.

Nos macroadenomas, cujo maior diâmetro tumoral é maior ou igual a 1 cm, pode haver sintomas adicionais por efeito de massa, tais como cefaléia, alteração visual, hidrocefalia e hipopituitarismo adicional ao hipogonadismo funcional<sup>6</sup>.

Os macroprolactinomas são mais frequentemente diagnosticados em pacientes menores de 20 anos de idade, homens e portadores de síndromes genéticas, como a neoplasia endócrina múltipla tipo 1<sup>7</sup>.

O tratamento padrão-ouro dos prolactinomas é o medicamentoso com agonistas dopaminérgicos (AD), promovendo normalização dos níveis séricos de PRL,

restauração do eixo gonadal e redução das dimensões tumorais em 80 a 90% dos casos<sup>6</sup>. Os AD disponíveis no Brasil são a bromocriptina (BRC) e a cabergolina (CAB). O AD de escolha é a CAB, por apresentar maior afinidade ao receptor de dopamina do tipo 2 (D2R), maior eficácia, mais fácil posologia e menos efeitos colaterais<sup>8; 9</sup>. A resposta aos AD pode ser avaliada pelos níveis séricos de PRL e pela redução das dimensões tumorais, especialmente nos macroprolactinomas<sup>10</sup>.

A definição de resistência aos AD é heterogênea na literatura, incluindo critérios como a não normalização dos níveis séricos de PRL, não restauração do eugonadismo ou, ainda, a não redução em 50% dos níveis séricos iniciais de PRL<sup>8-12</sup>. Outro parâmetro utilizado por alguns autores é a não redução tumoral, considerada como diminuição menor que 30%<sup>13; 14</sup> ou 50% do maior diâmetro tumoral<sup>12; 15; 16</sup>. Frequentemente, a normalização dos níveis de PRL é acompanhada por substancial redução do tamanho tumoral, porém, em algumas situações de seletiva resistência, há discordância entre as respostas de redução de PRL e da massa tumoral<sup>13</sup>.

Outro ponto importante de discordância na literatura é a dose de CAB para definição de resistência: 2mg semanais<sup>13; 17; 18</sup>, 3 mg semanais<sup>19-21</sup> ou 3,5 mg semanais<sup>13</sup>. Os principais fatores relacionados à resistência aos AD são o sexo masculino<sup>17</sup>, início do prolactinoma após a menopausa<sup>22</sup>, portadores de alterações genéticas como mutações do gene *MEN1*<sup>23</sup> ou *AIP*<sup>24</sup> e invasão tumoral para seios cavernosos<sup>25</sup>, que pode ser estimada pelos achados à ressonância magnética da região selar, utilizando-se a classificação de Knosp<sup>26</sup>.

Algumas estratégias terapêuticas podem ser indicadas nos casos de resistência parcial ou completa, tais como o aumento da dose de CAB, a remoção parcial de massa tumoral por cirurgia (*debulking*), com ou sem reintrodução de AD após o procedimento cirúrgico, e a radioterapia<sup>12</sup>. Os tumores invasivos/agressivos e

os carcinomas podem ser tratados com a temozolamida (TMZ), considerada quimioterapia de primeira linha<sup>17</sup>.

O principal mecanismo de resistência aos AD é a redução ou ausência de expressão de D2R tumoral. Anteriormente demonstramos que a média da expressão de D2R, avaliada por PCR quantitativo (qPCR) em 17 amostras tumorais, foi significativamente maior nos pacientes portadores de prolactinomas sensíveis aos AD quando comparados aos resistentes<sup>20</sup>. Porém, nem todos os pacientes resistentes apresentaram baixa expressão de D2R, evidenciando a existência de outros mecanismos de resistência, tais como a menor expressão da isoforma curta do D2R<sup>27</sup>, defeitos pós-receptor D2R<sup>28</sup>, menor expressão da filamina<sup>29</sup> e a redução das beta-arrestinas<sup>30</sup>, ambas são proteínas que participam do ciclo internalização/re-expressão do D2R.

## **1.2. A regulação da prolactina**

Os lactotrofos representam de 20 a 50% da população celular da adenohipófise<sup>31</sup> e pertencem à linhagem celular dependente do fator de transcrição Pit-1, membro do homeodomínio POU, juntamente com os somatotrofos e os tireotrofos. Essas células secretam a PRL, cuja ação hormonal clássica se dá na glândula mamária, participando da diferenciação celular e manutenção da lactação<sup>32</sup>.

A secreção da PRL é controlada principalmente pela inibição tônica da dopamina hipotalâmica secretada pelos neurônios da região tuberoinfundibular (TIDA). A dopamina inibe a transcrição e a secreção da PRL, reduz a proliferação dos lactotrofos, atuando preferencialmente nos receptores D2R<sup>33</sup>. A inibição da proliferação foi demonstrada através da indução à hiperplasia da hipófise em ratos

*knockout* para o D2R<sup>34</sup> e através da deficiência do transportador da dopamina, aumentando a disponibilidade da mesma, induzindo hipoplasia hipofisária<sup>35</sup>.

Além de um hormônio, devido a distribuição ubíqua de seu receptor (PRL-R), pertencente à superfamília dos receptores de citocina, a PRL também é considerada citocina e está envolvida em diversas funções como osmorregulação, resposta imune, diferenciação tecidual<sup>33</sup>, angiogênese e carcinogênese, por ação autócrina/parácrina<sup>36; 37</sup>.

A própria PRL auto-regula sua secreção, estimulando o tônus dopaminérgico hipotalâmico (*feedback* negativo por alça curta), bem como por ação autócrina/parácrina, através da ligação da PRL com o PRL-R no próprio lactotrofo, inibindo a proliferação celular, independente de dopamina<sup>38</sup>.

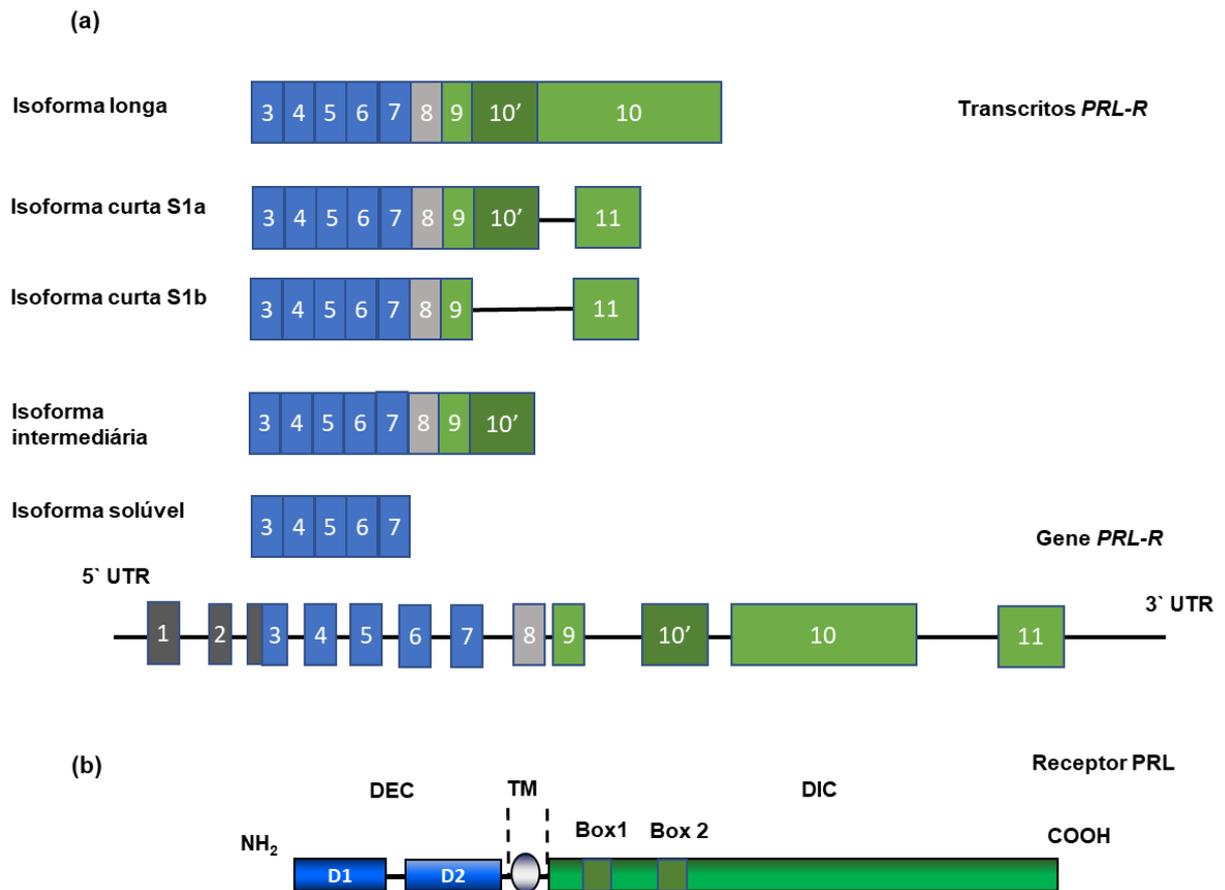
### 1.3. O receptor da prolactina

O gene que codifica o PRL-R está localizado no cromossomo 5p13-14 e contém 11 éxons<sup>39</sup> (ENST00000618457.5/ NM\_000949.7) sendo que os éxons 1 e 2 não são codificantes. Em humanos, a transcrição de diferentes isoformas do PRL-R pode ser regulada por três promotores diferentes: PI, PII e PIII. O promotor PI é ativo nas gônadas e sua transcrição depende da ativação do fator de transcrição SF-1, o promotor PII é específico do fígado e depende da ativação do HNF4, e o promotor PIII é ativo em todos tecidos sensíveis a PRL, como células linfóides, pulmonares, renais e hipofisárias e é ativado por fatores de transcrição como C/EBP $\beta$  (*CCAAT/enhancer-binding protein*) e Sp1/Sp3 (*specificity proteins (Sp)/Krüppel-like transcription factor family*)<sup>39; 40</sup>. A expressão do PRL-R pode ser estimulada pelo receptor de estrogênio (ER $\alpha$ ) e pelo fator de crescimento da epiderme (EGF)<sup>41</sup>.

O PRL-R é composto pelo domínio extracelular, que contém dois domínios para a ligação do ligante; uma porção transmembrana helicoidal e o domínio intracelular que contém o Box-1 e o Box-2, sendo que o primeiro interage com as quinases da família JAK2 e SRC. Múltiplas isoformas de PRLR, resultantes de *splicing* alternativo, foram identificadas em roedores e em humanos. Essas isoformas têm domínios extracelulares idênticos, mas diferem no tamanho e na sequência do domínio intracelular, que pode ser curta, intermediária ou longa<sup>42-45</sup>.

Existem ao menos cinco isoformas de PRL-R em humanos: longa, intermediária, duas curtas (S1a e S1b) e uma solúvel, sem os domínios transmembrana e citoplasmáticos (Figura 1.1.). As isoformas curtas tem afinidade à PRL e podem heterodimerizar com as isoformas longas levando a supressão da via de sinalização da isoforma longa e, portanto, controlando negativamente algumas ações da PRL<sup>41</sup>.

O PRL-R humano pode se ligar ao menos a três ligantes (PRL, lactogênio placentário e hormônio do crescimento), o que pode dificultar a determinação dos efeitos específicos da PRL *in vivo*<sup>46; 47</sup>. A sinalização é iniciada pela ligação de uma única molécula de ligante a dois sítios de interação extracelular de diferentes afinidades denominados domínio de ligação 1 e domínio de ligação 2, que desencadeia modificações na conformação do dímero do receptor<sup>48</sup>. O domínio transmembrana (TM) é codificado pelo exon 8 e o domínio intracelular, em sua maior parte, pelo exon 10. O PRL-R não tem atividade intrínseca da tirosina quinase, mas transmite um sinal por meio de proteínas citoplasmáticas associadas.

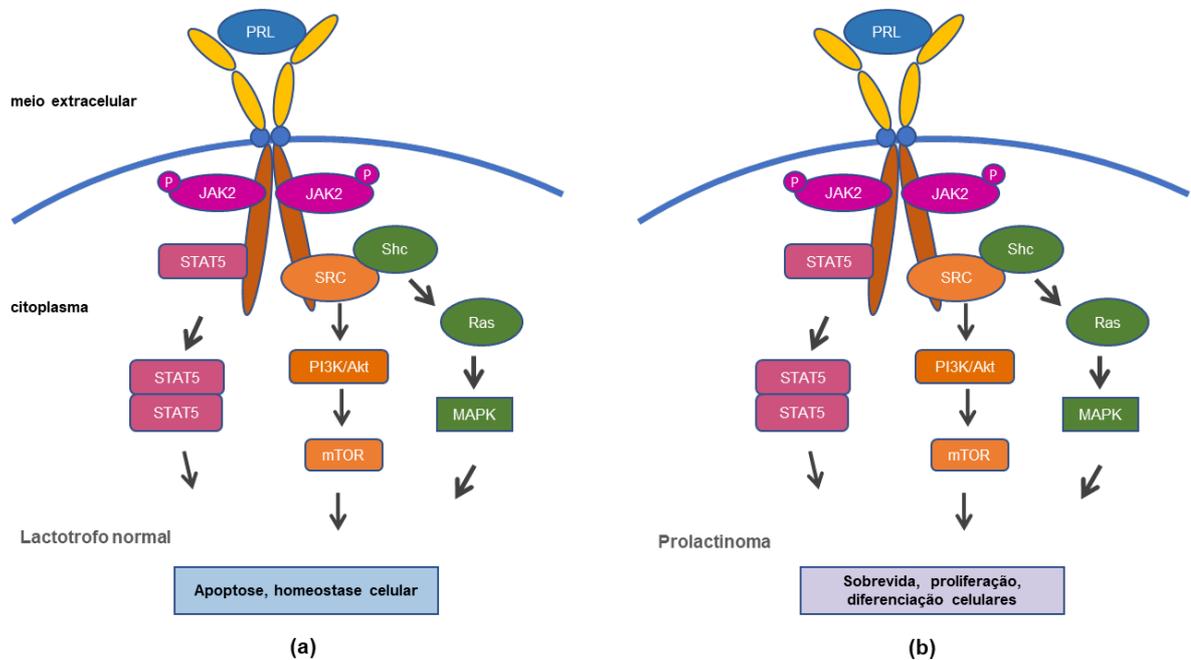


**Figura 1.1.** Representação esquemática do (a) gene *PRL-R* e de seus transcritos em humanos (isoformas longa, curta S1a, curta S1b, intermediária e solúvel) e (b) dos principais domínios proteicos do PRL-R

A ligação entre a PRL e a isoforma longa do PRL-R resulta na ativação de numerosas quinases, incluindo Janus quinase 2 (JAK2), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K) e Src quinase, bem como a serina/treonina Nek3/Vav2/Rac1 via da quinase. A JAK2 é constitutivamente vinculada ao domínio intracelular do receptor e sofre fosforilação e ativação quando os receptores se dimerizam, fosforilando e ativando os fatores de transcrição STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição), que sofrem homo e heterodimerização, migram para o núcleo e ativam genes com promotores contendo  $\gamma$  interferon elementos sensíveis (GAS), terminando a via de sinalização pela presença das

proteínas inibidoras de sinal de transcrição, SOCs 1 e 3, que competem com as STATs. Outras vias de sinalização são a da MAPK e da PI3K/Akt.

Portanto, o domínio citoplasmático pode interagir com vários parceiros, ativando vias de sinalização diferentes, envolvidos em diferentes processos como divisão e diferenciação celular, imunidade, apoptose, proliferação e tumorigênese<sup>33; 49</sup> (Figura 1.2.).



Fonte: próprio autor

**Figura 1.2.** PRL/PRL-R e suas vias de sinalização: JAK2/STAT5, Ras/MAPK, PI3k/Akt/mTOR envolvidas na diferenciação e proliferação celular em (a) lactotrofos normais e (b) prolactinomas.

Ciccarelli et al<sup>50</sup>. demonstraram a presença de PRL-R em tecidos humanos hipofisários, tanto normais quanto tumorais, especialmente em prolactinomas com maiores níveis séricos de PRL. Posteriormente, outros autores confirmaram a

expressão de PRL-R, em maiores níveis em lactotrófos, gonadotrófos e em prolactinomas. Em amostras tumorais de prolactinomas de pacientes tratados previamente com BRC, a expressão de PRL-R estava reduzida<sup>51</sup>. Esses dados sugeriram que o sistema PRL/PRL-R desempenha algum papel nos prolactinomas.

#### 1.4. O sistema PRL/PRL-R

A ligação da PRL com o PRL-R em diferentes tecidos promove ação estimulatória<sup>52; 53</sup>, sendo observado em ratos seu papel na proliferação de tumores prostáticos<sup>54; 55</sup> e mamários<sup>42; 56; 57; 58; 59</sup>. Porém em outros tecidos a PRL levou a inibição da proliferação celular, como nos ovários<sup>60; 61</sup>, adrenais<sup>61</sup> e no epitélio vascular<sup>62</sup>.

Os camundongos *knockout* para D2R desenvolveram hiperprolactinemia e apenas as fêmeas em idade adulta apresentaram hiperplasia dos lactotrófos, sem, entretanto, desenvolver prolactinoma. Os machos *knockout* para D2R apresentavam menores níveis séricos de PRL em comparação às fêmeas *wild-type*, e poderiam nunca atingir um limiar de PRL necessário para perpetuar a hiperplasia dos lactotrófos na ausência do tônus inibitório dopaminérgico<sup>63</sup>. Alguns autores consideraram que a maior expressão de receptores de estrógeno e a própria PRL, por ação autócrina/parácrina, poderiam justificar os achados apenas nas fêmeas<sup>63</sup>.

No entanto, outros autores avaliando esse mesmo modelo *knockout* D2R observaram o desenvolvimento de prolactinomas em animais mais velhos, tanto em fêmeas quanto em machos. Nas fêmeas, o aparecimento dos prolactinomas foi mais precoce e os autores relacionaram esses achados à hiperprolactinemia, uma vez que as fêmeas eram hipoestrogeneizadas mas tinham valores mais elevados de PRL séricas quando comparadas aos machos<sup>34</sup>.

Asa *et al.*<sup>64</sup>. também encontraram prolactinomas em camundongos mais velhos sem a expressão do D2R. Esses autores consideram que a exposição mais prolongada à hiperprolactinemia, tanto em machos como em fêmeas, levou ao aparecimento desses tumores. Os machos não apresentaram hiperplasia lactotrófica previamente ao aparecimento dos prolactinomas, sugerindo que mecanismos celulares distintos entre machos e fêmeas que estejam envolvidos na tumorigênese<sup>64</sup>. No entanto, não se pode descartar que a hiperprolactinemia seja um epifenômeno da hiperplasia e hipertrofia dos lactotrofos que antecede a formação dos prolactinomas e não um fenômeno promotor da tumorigênese.

Schuff *et al.*<sup>48</sup>. estudaram três modelos de camundongo *knockout*: *D2R*<sup>-/-</sup>, *PRL*<sup>-/-</sup> e duplo *D2R*<sup>-/-</sup>*PRL*<sup>-/-</sup>. Os níveis de PRL séricos foram mais elevados nas fêmeas quando comparados aos machos e a hiperprolactinemia foi mais precoce, em ambos os sexos, nos modelos *knockout PRL-R* e *D2R/PRL-R*. A hiperplasia dos lactotrófos e o aparecimento de prolactinomas maiores ocorreram mais precocemente no modelo com *PRL-R*<sup>-/-</sup> em fêmeas. O tratamento com BRC reduziu os níveis de PRL séricos nos animais wild-type e no modelo *knockout PRL-R* apenas, uma vez que o *knockout D2R* leva à resistência aos AD. O tratamento com PRL inibiu a proliferação dos lactotrófos nos animais selvagens e nos machos *D2R*<sup>-/-</sup>, sugerindo dessensibilização ou *downregulation* do PRL-R em resposta à hiperprolactinemia crônica. Os autores do trabalho concluíram que a PRL inibe a proliferação de lactotrófos diretamente e indiretamente, pela ativação do tônus dopaminérgico<sup>48</sup>.

O papel da PRL na regulação dos lactotrófos normais também foi visto em estudo com camundongos transgênicos que expressam constitutivamente e sistemicamente um antagonista do PRL-R, o 1-9-G129R-hPRL. Esses animais apresentaram aumento do peso da hipófise e aumento da expressão da isoforma

longa do PLR-R quando comparados aos camundongos selvagens. Também num modelo de linhagem celular que secreta PRL e GH, as células GH3, o bloqueio do PRL-R pelo antagonista levou ao aumento da proliferação e inibição da apoptose<sup>65</sup>.

Em estudo subsequente do mesmo grupo, demonstrou-se que as fêmeas do modelo de camundongo transgênico para o antagonista de PRL 1–9-G129R-hPRL apresentaram mudança na proporção isoforma longa/curta do PRL-R, nas fases diestro e proestro e que, portanto, a PRL pode regular não só sua própria expressão, como também, a expressão de seu receptor e a predominância de suas isoformas<sup>66</sup>.

Avaliando os prolactinomas dos camundongos *knockout* PLR-R, demonstrou-se alterações na sinalização do PRL-R que poderiam estar relacionadas à tumorigênese. Esses animais apresentam tumores com alto índice mitótico, sem redução das dimensões com o tratamento com CAB por três meses, podendo ser considerado um modelo de prolactinomas agressivos e resistentes<sup>67</sup>. Bernard et al<sup>38</sup>. avaliaram as vias de sinalização envolvidas nesse modelo de prolactinoma e, comparando com os achados em ratos com prolactinomas estrógeno-induzidos, verificaram as alterações na regulação de fatores de transcrição (STAT5, STAT3, AhR, ESR1, BRD4, CEBPD, YAP, FOXO1) e de quinases (JAK2, AKT1, BRAF, BMPR1A, CDK8, HUNK, ALK, FGFR1, ILK)<sup>38</sup>.

Alguns autores haviam demonstrado previamente em culturas de células GH3, os efeitos antiproliferativos e pró apoptóticos da PRL por ativação da via Jak2/STAT5 e inibição ERK1/2. Foi observado que a PRL induziu apoptose pela inibição da via Akt, concluindo que a PRL inibe a fosforilação desta via em situações fisiológicas, o que leva a redução da taxa proliferativa em células GH3<sup>68</sup>.

Portanto, o envolvimento das vias de sinalização do sistema PRL-PRL-R pode se diferenciar a depender do modelo estudado. Os diversos modelos animais e *in vitro*

sugerem que o sistema PRL/PRL-R está envolvido na tumorigênese dos prolactinomas. A ausência da PRL ou de sua ação permitem o desenvolvimento de hiperprolactinemia e prolactinomas em camundongos e as vias de sinalização envolvidas são complexas e necessitam ser melhor avaliadas.

### 1.5 As variantes do gene *PRL-R* nas doenças

Até 2008, não haviam doenças associadas ao *PRL* ou ao *PRL-R*, quando foi identificada uma variante no gene *PRL-R* em 4 de 74 pacientes mulheres com múltiplos fibroadenomas mamários. Essa variante, a p.Ile146Leu, foi encontrada em heterozigose e é de baixa frequência na população (MAF 1-5%)<sup>69</sup>. Múltiplos fibroadenomas mamários são definidos pela presença de mais de três fibroadenomas mamários, tumores benignos caracterizados por proliferação anormalmente alta do epitélio. A variante p.Ile146Leu pode levar a alteração no domínio extracelular do PRL-R e causar ativação constitutiva deste receptor<sup>69;70</sup>.

Em 2010, esse mesmo grupo, avaliando 95 mulheres com fibroadenomas mamários múltiplos, identificou, além da p.Ile146Leu, duas outras variantes germinativas p.Ile76Val e Glu554Gln. A variante Ile76Val, assim como a p.Ile146Leu, também mapeia no domínio extracelular e levou a ativação constitutiva do PRL-R em estudos funcionais. Essa variante foi identificada em oito pacientes e dez controles. A variante p.Glu554Gln, localizada no domínio intracelular, ocorreu em uma paciente e não foi estudada funcionalmente<sup>70</sup>.

Em 2013, foi descrita pela primeira vez em humanos uma variante germinativa com perda de função no gene *PRL-R*, a p.His188Arg. Essa variante foi encontrada em heterozigose em três irmãs portadoras de hiperprolactinemia sem imagem hipofisária indicativa de prolactinoma, sendo que uma delas apresentou galactorréia persistente

pós-parto e as demais apresentavam infertilidade e oligomenorréia<sup>71</sup>. A p.His188Arg está localizada no domínio extracelular do PRL-R e seu estudo funcional resultou na redução da JAK2/STAT5. Com isso, os autores concluíram que a menor ação da PRL sobre o tônus dopaminérgico poderia explicar a hiperprolactinemia encontrada nas pacientes, em semelhança aos modelos em roedores *knockout* para PRLR.

Em 2018, foi relatado o caso de uma mulher de 35 anos com hiperprolactinemia portadora de heterozigose composta p. Arg171Ter e p.Pro269Leu. Diferentemente da família portadora da variante His188Arg, esta paciente não tinha infertilidade, mas apresentou agalactia puerperal. A variante p.Arg171Ter, localizada no domínio extracelular, originou um códon de parada de tradução prematuro, o que pode acarretar num peptídeo truncado. A variante p.Pro269L, no domínio intracelular, consiste na substituição de aminoácidos no local de encaixe da proteína JAK2, o box 1, alterando sua capacidade de fosforilar a STAT5<sup>72</sup>.

Em 2016, foi realizado um estudo de rastreamento de variantes germinativas no *PRL-R* em 88 pacientes com prolactinomas esporádicos, encontrando quatro variantes *missense* p.Ile76Val, p.Ile146Leu, p.Glu108Lys e p.Glu554Gln em 16 pacientes (14 em heterozigose e duas em homozigose)<sup>73</sup>. Três dessas variantes já haviam sido descritas previamente e a variante p.Glu108Lys foi descrita pela primeira vez. As variantes p.Ile76Val, p.Ile145Leu e p.Glu108Lys estão localizadas no domínio extracelular do PRL-R, enquanto a variante p.Glu554Gln encontra-se no domínio intracelular. A frequência das variantes p.Ile76Val e p.Ile146Leu no banco de dados do *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) foi de 4,3 e 1,9%, respectivamente, enquanto as outras variantes eram mais raras. A p.Ile76Val foi encontrada em heterozigose em 9 pacientes e em homozigose em dois pacientes.

Na comparação de frequência com o banco de dados, apenas a variante p.Glu554Gln se mostrou super-representada na coorte de pacientes com prolactinoma. Nas análises *in silico*, utilizando cinco ferramentas diferentes, a variante p.Ile76Val foi predita como benigna, as variantes p.Ile146Leu e p.Glu108Lys foram preditas como patogênicas em uma ferramenta e a variante p.Glu544Gln foi predita como potencialmente patogênica em duas ferramentas. Nenhuma dessas variantes apresentou alterações da função em estudos *in vitro*, diferentemente de estudos prévios do mesmo grupo, que havia demonstrado ganho de função nas variantes p.Ile76Val e p.Ile146Leu<sup>70</sup>.

Em 2019, Gorvin *et al.*<sup>74</sup> avaliaram 50 amostras de ácido desoxirribonucleico (DNA de 46 pacientes com prolactinomas (35 amostras de sangue periférico, 15 amostras tumorais) e identificaram seis variantes germinativas no *PRL-R*: quatro raras (p.Gly57Ser, p.Glu376Gln, p.Arg453Trp e p.Asn492Ile) e duas de baixa frequência (p.Ile76Val e p.Ile146Leu). A p.Arg453Trp não havia sido previamente descrita na literatura e também não estava presente no banco de dados do ExAc. Nesse estudo, as variantes raras p.Glu376Gln e p.Asn492Ile, que se encontram em desequilíbrio de ligação, ocorreram em frequência significativamente maior na coorte de portadores de prolactinomas ( $P < 0.0001$ ) quando comparados aos dados do ExAC e ao biobanco de Oxford. A avaliação funcional *in vitro* mostrou que as variantes p.Ile76Val, p.Glu376Gln e p.Arg453Trp apresentaram resultados semelhantes às células com *PRL-R* selvagem. As variantes p.Gly57Ser e p.Ile176Leu, ambas localizadas no domínio extracelular, apresentaram aumento da sinalização intracelular via STAT5, mas às custas de níveis supra fisiológicos de PRL (500-100 ng/mL). Já a variante p.Asn492Ile mostrou aumento da expressão do pAkt e da proliferação celular, com concentrações menores de PRL (50-200 ng/mL), sugerindo um papel patogênico

dessa alteração. A via mTOR está associada a diversos tipos de neoplasias e já é um potencial alvo terapêutico. Neste estudo, os autores demonstraram o efeito do Everolimus, um inibidor da via mTOR, na redução da resposta pAkt e na proliferação celular das células transfectadas com a variante p.Asn492Ile. Em 2019 foi publicado um relato de caso de prolactinoma agressivo, refratário à CAB, cirurgias e radioterapia, que apresentou resposta ao Everolimus associado à CAB, sugerindo que a via mTOR esteja realmente ativada nos prolactinomas<sup>75</sup>.

As Tabelas 1.1 e 1.2 apresentam a descrição das variantes de todas as encontradas no *PRL-R* em prolactinomas e fibroadenomas mamário e um resumo dos principais achados desses estudos.

**Tabela 1.1** Descrição das variantes no gene *PRL-R* descritas na literatura.

<b>Variante</b>	<b>Localização</b>	<b>Domínio proteico</b>	<b>Tipo</b>	<b>MAF</b>	<b>Referência</b>	
<b>p.Gly57Ser</b>	Exon 5	D1	Missense	<1%	rs143138849	
<b>p.Ile76Val</b>	Exon 5	D1	Missense	1-5%	CM100406/ rs2228482	
<b>p.Glu108Lys</b>	Exon 6	D2	Missense	<1%	rs759275611	
<b>p.Ile146Leu</b>	Exon 6	D2	Missense	1-5%	rs72478580	
<b>p.Arg171Ter</b>	Exon 6	D2	nonsense	nova	-	
<b>p.Hist188Arg</b>	Exon 6	D2	Missense	5%	rs398122522/ CM1312032	
<b>p.Pro269Leu</b>	Exon 9	IC	Missense	<1%	rs754974807	
<b>p.Glu376Gln*</b>	Exon 10	IC	Missense	<1%	rs144399444	
<b>p.Arg453Trp</b>	Exon 10	IC	Missense	nova	-	
<b>p.Asn492Ile*</b>	Exon 10	IC	Missense	<1%	rs147265072	*as
<b>p.Glu554Gln</b>	Exon 10	IC	Missense	1-5%	rs146459777	variantes

p.Glu400Gln/p.Asn516Ile estão em desequilíbrio de ligação e foram encontradas em dupla heterozigose. D1 e D2: domínios de ligação a prolactina; IC: domínio intracelular. MAF: frequência do menor alelo.

**Tabela 1.2** Resumo dos estudos que avaliaram as variantes no *PRL-R* em doenças.

<b>Variantes</b>	<b>N</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>Resumo dos achados</b>
<b>2014 - Newey et al<sup>71</sup></b>			
<i>His188Arg</i>	3*	oligomenorréia, galactorréia persistente, infertilidade	- Perda de função do receptor
<b>2018 - Kobayashi et al<sup>72</sup></b>			
<i>Arg171Ter/Pro269L</i> <sup>&amp;</sup>	1**	hiperprolactinemia, agalactia	- Perda de função do receptor
<b>2008 - Bogorad et al<sup>69</sup></b>			
<i>Ile146Leu</i>	4/74	Fibroadenomas múltiplos de mama	- Ativação da via JAK/STAT
<b>2009 - Courtilot et al<sup>70</sup>.</b>			
<i>Ile76Val</i>	10/95	Fibroadenomas	-Ganho de função para as variantes p.Ile763Val e p.Ile146Leu
<i>Ile146Leu</i>	4/95	múltiplos de mama	
<i>Glu554Gln</i>	1/95		
<b>2016 -Bernard et al<sup>73</sup>.</b>			
<i>Ile76Val</i>	11/88	Prolactinoma esporádico	- Variante p.Glu554Gln mais frequente em prolactinomas vs controles
<i>Ile146Leu</i>	3/88		
<i>Glu108Lys</i>	1/88		- Sem evidências de alteração funcional das variantes.
<i>Glu554Gln</i>	1/88		
<b>2019 - Gorvin e col<sup>74</sup>.</b>			
<i>Ile76Val</i>	7/46	Prolactinoma	- Ganho de função para a variante <i>Asn492Ile</i> com ativação da via pAkt. - Variantes <i>Glu376Gln</i> e <i>Asn492Ile</i> mais frequente em prolactinomas vs controles - Variantes <i>Glu376Gln</i> e <i>Asn492Ile</i> mais frequente em homens e <i>pacientes tratados cirurgicamente.</i>
<i>Ile146Leu</i>	7/46		
<i>Gly57Ser</i>	1/46		
<i>Arg453Trp</i>	4/46		
<i>Glu376Gln/Asn492Ile</i> <sup>#</sup>	9/46		

\* descrição de uma família com 3 probando afetados; \*\* descrição de um caso;

<sup>&</sup>indivíduo portador de heterozigose composta; <sup>#</sup>alterações em desequilíbrio de ligação.

## **2 OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo primário

O presente estudo tem como objetivo descrever a frequência de variantes genéticas no *PRL-R* em pacientes portadores de prolactinoma de uma coorte brasileira e sua associação com a resposta ao tratamento com CAB.

## 2.2 Objetivos secundários

- Avaliar a frequência de variantes genéticas no *PRL-R* em pacientes brasileiros portadores de prolactinoma;
- Analisar funcionalmente as alterações encontradas do tipo *missense* utilizando-se ferramentas *in silico*;
- Verificar a associação dessas variantes com as características clínicas, de imagem e laboratoriais dos pacientes antes do tratamento com CAB;
- Associar a presença dessas variantes com a resposta ao tratamento com CAB;
- Comparar a frequência das variantes encontradas nos pacientes com a de uma população controle brasileira, a fim de se verificar sua relação com o risco de desenvolvimento de prolactinoma.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Há poucos estudos que avaliaram as variantes germinativas do PRL-R em pacientes portadores de prolactinomas, com resultados distintos quanto ao papel patogênico das variantes. Ademais, ainda que em paralelo aos modelos animais, esperaríamos encontrar variantes com perda de função. Porém, variantes com ganho de função que afetem a via de sinalização intracelular podem estar implicadas na tumorigênese e progressão dos prolactinomas.

O rastreamento de variantes no gene do *PRL-R* em uma nova coorte de pacientes com prolactinoma e sua correlação com as características clínicas, laboratoriais e de resposta ao tratamento com cabergolina, podem auxiliar na compreensão do sistema PRL/PRL-R na tumorigênese dos prolactinomas, bem como na descoberta de novas estratégias de abordagem desses tumores.

## **4 PACIENTES E MÉTODOS**

#### **4.1 Considerações éticas**

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), CAAE: 49883219.0.0000.0068 / número do comprovante: 080215/2021 e foi conduzido respeitando-se os princípios éticos relacionados aos estudos em seres humanos. Os indivíduos foram esclarecidos quanto aos procedimentos e objetivos do projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo A) antes de sua inclusão no estudo.

#### **4.2 Tipo e desenho do estudo**

Este é um estudo observacional, retrospectivo e transversal onde foram incluídos pacientes portadores de prolactinoma submetidos ao tratamento com CAB, selecionados no período de Outubro de 2019 até Dezembro de 2020. Foram levantados dados clínicos, laboratoriais, de imagem e de resposta ao tratamento farmacológico de cada paciente através de pesquisa em prontuários eletrônicos e físicos.

#### **4.3 Coorte**

A população desse estudo foi constituída por 193 pacientes portadores de prolactinoma, acompanhados na Unidade de Neuroendocrinologia da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia (n=188) e no Serviço de Ginecologia (n=5) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Quinze pacientes foram excluídos devido a indisponibilidade de coleta de sangue para

extração de DNA (n=9) ou material insatisfatório para completa análise genética (n=6), totalizando uma amostra de 178 pacientes.

Em 32 pacientes a resposta a cabergolina não pode ser avaliada por: falta de dados de seguimento (n=5), intolerância a CAB (n=5), dose mínima não alcançada (n=3), não uso de CAB (n=13) ou uso somente após cirurgia (n=6) e foram, dessa forma, incluídos apenas na análise de comparação da prevalência das variantes do PRL-R entre pacientes com prolactinomas e grupo controle, restando 146 pacientes para análise da associação das variantes com a resposta à CAB, características clínicas, laboratoriais e tumorais (Figura 4.1).



Fonte: próprio autor

**Figura 4.1.** Coorte do estudo.

#### 4.3.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com tumor hipofisário e hiperprolactinemia, sem outra causa identificada para o aumento dos níveis de PRL, com quadro sugestivo de prolactinomas.

- Disponibilidade de coleta de sangue para extração de DNA.

#### **4.3.2 Critérios de exclusão**

- Pacientes com hiperprolactinemia por desconexão/desvio de haste;
- Pacientes portadores de tumores hipofisários com co-secreção de GH;
- Pacientes portadores de neoplasia endócrina múltipla do tipo 1;
- Pacientes gestantes ou puérperas no diagnóstico;
- Pacientes sem imagem inicial disponível ou faltando dados clínicos;
- Casos familiares de prolactinoma;
- DNA insuficiente para análise genética.

#### **4.3.3 Amostra controle**

Para obtenção da frequência de alelos utilizada como referência na análise de predisposição das variantes identificadas no gene *PRL-R* ao surgimento de prolactinomas, foi utilizada a plataforma de dados do ABRaOM – Arquivo Brasileiro Online de Mutações (<https://abraom.ib.usp.br/>) e do *Exome Aggregation Consortium* – ExAC (acessado pelo <https://www.ensembl.org/index.html>). A última atualização do repositório do ABRaOM, depositado em setembro de 2020, compreende variantes genômicas de cerca de 1.171 indivíduos brasileiros não relacionados.

#### **4.4 Avaliação clínica e laboratorial.**

Foram coletados os seguintes dados de todos os participantes: sexo; idade ao diagnóstico; níveis séricos de PRL ao diagnóstico; resposta ao tratamento com CAB (dose máxima e atual, tempo de uso, resposta hormonal e resposta tumoral). A avaliação dos hormônios hipofisários foi realizada no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42, Divisão de Laboratório Central, do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, seguindo procedimentos diagnósticos de rotina.

#### **4.5 Avaliação radiológica**

A imagem de ressonância magnética foi utilizada para avaliação do tamanho tumoral, definido por seu maior diâmetro, e extensão tumoral de acordo com a classificação de Knosp-Steiner<sup>26</sup>. Foram considerados tumores invasivos para o seio cavernoso aqueles que apresentaram Knosp 3A, 3B e 4 e não invasivos aqueles com Knosp 0, 1 e 2.

Os tumores foram ainda classificados como microadenomas (menores que 1 cm) e macroadenomas (maiores ou iguais a 1 cm).

A classificação da invasão dos seios cavernosos foi realizada pelo Radiologista Dr. Mário Padula, dos grupos de Neurorradiologia e de Cabeça e Pescoço do INRAD – Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

#### **4.6 Critérios clínicos de resposta ao tratamento com CAB**

Os pacientes foram classificados como responsivos ou resistentes ao tratamento com CAB em termos de variação dos níveis de PRL e dimensões tumorais. O grupo responsivo foi composto pelos pacientes que obtiveram normalização dos

níveis de PRL com dose menor ou igual a 3 mg por semana de CAB<sup>19-21</sup>, utilizada por no mínimo seis meses e/ou redução tumoral em ao menos 30% do maior diâmetro<sup>13;14</sup>.

## **4.7 Análise molecular do gene *PRL-R***

### **4.7.1 Extração de DNA genômico**

O DNA genômico foi extraído de uma amostra de 10 mL de sangue total de acordo com o procedimento padronizado no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM25) da Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo.

### **4.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Os éxons 3-10 codificantes do gene *PRL-R* foram amplificados utilizando a técnica de PCR e sequenciados pelo sequenciamento automático do tipo Sanger. Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação do *PRL-R* estão descritos na Tabela 2 e foram criados com o auxílio do programa PRIMER3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3www.cgi/>) de acordo com a sequência PRLR-ENST00000618457.5 depositada no banco de dados do ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>). A Tabela 4.1. apresenta ainda a temperatura de anelamento de cada *primer*, bem como o tamanho esperado do amplificado.

A PCR foi realizada num volume final de 20 µL utilizando-se 50-100 ng de DNA genômico como molde, 0,2 mM de desoxinucleotídeos (dNTPs), 0,6 pmol de oligonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão de PCR 1x e 1 U de enzima *Taq polimerase*. As condições de reação foram: a) denaturação inicial a 95 grau celsius (95°C)/5 minutos, seguindo b) 35 ciclos de denaturação a 94°C/1 minuto, anelamento

a 56-58°C/1 minuto e c) extensão a 72°C/1 minuto, com extensão final 72°C/5 minutos. Ao final da reação, o tamanho dos fragmentos obtidos foi verificado na eletroforese em gel de agarose 1%.

**Tabela 4.1.** Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos exons codificantes do *PRL-R*.

Exon	Sequencia 5' → 3'	Anelamento (°C)	Amplificado (pb)
3	F: TAAAGTGGTGGATGTGCCTG R: ACAAAGGCAGAGAGCACAG	56	360
4	F: ACAGAGGAGTGTTGCTGGAT R: AACAGGAGAATGTGGGCATG	58	254
5	F: GCAGAACATGGAAGCCTAAG R: GGAAAGCACAGGAACACAAG	56	547
6	F: GTACAGTGGGAAGAGTGAGATG R: GAGGAGAGCTGTGAAGATGA	56	484
7	F: GATAGGGCTAAGACAGTGGA R: TGGGAATAGGGAAGATGGTG	56	575
8-9	F: ATGGAGGAAAACACTCTTGG R: GAGAGACAGTCCAAAAGGC	56	895
10	F: CAGAAGGTGATTCTAGATGGC R ATGGAGCATGAAAGGAGCTG IF*: CCTGAAACAACCCACACCTG IR*: GGTAAGGGCCATGTTGAACA	58	1300

pb - pares de bases; F- oligo *foward* (direto); R - oligo reverso; \*IF e IR foram utilizados apenas nas reações de sequenciamento.

#### 4.7.3 Purificação da PCR e reação de sequenciamento automático.

Os produtos de amplificação foram purificados com as enzimas Shrimp e exonuclease utilizando o estojo ExoSAP-IT (Affymetrix Inc., Cleveland, OH, EUA), sequenciados com o estojo de sequenciamento Big Dye terminator cycle (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA) e submetidos a eletroforese capilar no equipamento ABI Prism 3100 (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA), seguindo protocolos padrão. Os amplicons foram sequenciados em ambas as

direções com os mesmos primers utilizados na reação de amplificação. Apenas para o exon 10 foram realizadas duas reações de sequenciamento adicionais utilizando dois *primers* internos, para a completa leitura de toda sua região codificante (Tabela 2).

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de seus respectivos exons presentes na base de dados do ENSEMBL ([https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/ENST00000618457](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ENST00000618457)) utilizando o programa Sequencher® (Gene Codes, Corporation, Ann Arbor, MI, USA). Na presença de variações genéticas, estas foram confirmadas em uma nova reação de PCR e sequenciamento.

A descrição das variantes foi feita utilizando o transcrito mais representativo do ponto de vista biológico com convergência entre os bancos de dados do NCBI e EMBL-EBI, selecionado como padrão para relatos clínicos pelo projeto MANE (do inglês, *Matched Annotation from the NCBI and EMBL-EBI*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/MANE/>). Para facilitar a leitura, quando necessário, foi também apresentada entre parênteses a posição do aminoácido correspondente à relatos prévios das variantes.

#### **4.7.4 Análise *in silico* das variantes *missenses***

As variantes *missenses* identificadas foram submetidas a uma análise *in silico* utilizando quatro diferentes sites de predição. Foram utilizados dois programas que se baseiam na conservação evolucionária, SIFT ([http://star.edu.sg/www/SIFT\\_seq\\_submit2.html](http://star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html)) e PANTHER (<http://www.pantherdb.org/tools/csnpScore.do>), 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>).

O SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) é uma ferramenta computacional que classifica as trocas de aminoácidos, por homologia, como tolerável ou capaz de modificar a função da proteína. O algoritmo utilizado se baseia no fato de que a evolução proteica está relacionada com a função da proteína. Substituições com valor de tolerância menor do que 0,05 são preditas como deletérias.

O Panther calcula o valor Ptime (*preservation time*), que é apresentado em milhões de anos, e o valor Pdel, que diz a probabilidade da variante ter efeito deletério na função da proteína. É calculado o escore PSEP (*position-specific evolutionary preservation*), conforme o alinhamento de proteínas evolutivamente relacionadas. Quanto mais uma posição é preservada, maior é a probabilidade de que alterações nessa base tenham efeitos deletérios.

O Mutation Taster integra informações de diferentes bancos de dados biomédicos e utiliza ferramentas de análise de acordo com a conservação evolutiva, alterações em sítios de *splicing*, perda de características da proteína e modificações que possam afetar a expressão gênica. Ela classifica uma alteração como provavelmente deletéria, conhecida deletéria, provavelmente inofensiva ou conhecida inofensiva, quando se trata de um polimorfismo automático. Um valor de probabilidade é fornecido junto com o resultado, sendo que um valor próximo a 1 indica alta segurança da predição.

O 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 entre o alelo selvagem e o alelo mutante. Ela utiliza um escore numérico sendo que um escore maior do que 0.85

significa “provavelmente prejudicial”, maior que 0.15 e menor que 0.85 “possivelmente prejudicial” e menor que 0.15 “benigna”.

#### **4.8 Análise estatística**

As análises foram realizadas utilizando o programa Stata®, versão 17, (Stata Corp LLC, USA). O padrão de distribuição dos dados quantitativos foi avaliado pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis com distribuição paramétrica, ou normal, os dados foram apresentados como média e desvio padrão (DP) e avaliados pelo teste T de Student; quando necessários, essas variáveis foram transformadas pela escala logarítmica. As variáveis com distribuição não-paramétrica foram apresentadas como mediana e 25 e 75 percentis e avaliadas pelo teste de Mann-Whitney U. Os dados qualitativos foram expressos em valores absolutos e percentuais e analisados por frequência e intervalo de confiança pelos testes de qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher, conforme apropriado. As análises estatísticas foram realizadas comparando dois diferentes grupos: a) pacientes resistentes *versus* sensíveis ao tratamento com CAB; b) macroadenomas *versus* microadenomas; c) pacientes *versus* controle; d) portadores de variantes do *PRL-R* *versus* não portadores. O valor de significância adotado foi de 5% ( $P < 0,05$ ).

## **5. RESULTADOS**

### 5.1 Seleção e avaliação clínica dos pacientes

No total, 178 pacientes com prolactinoma foram avaliados. Destes, 141 são do sexo feminino (78%) e 37 (22%) do sexo masculino. A média de idade ao diagnóstico foi  $30.4 \pm 11.6$  anos e a mediana de PRL sérica ao diagnóstico de 177.5 (86-500) ng/mL.

De acordo com o tamanho tumoral ao diagnóstico, 161 tumores foram classificados em microadenomas (63 (39.1%)) e macroadenomas (98 (60.9%)). A classificação de Knosp para probabilidade de invasão paraselar foi avaliada em 124 casos sendo observada a seguinte frequência de classificação: Grau 0 = 102 (76.7%), Grau 1 = dois (1.5%), Grau 2= quatro (3%), Grau 3A= seis (4.5%), Grau 3B = 12 (9%) e Grau 4= sete (5.3%). Consideramos invasão paraselar os pacientes com as classificações 3A, 3B e 4 (n=25, 20%).

Os pacientes do sexo masculino apresentaram maior nível de PRL sérica ao diagnóstico, tumores com maior diâmetro tumoral e, conseqüentemente, maior número de macroadenomas ( $P < 0.0001$ ), em relação aos pacientes do sexo feminino (Tabela 5.1.).

Quando comparados de acordo com a classificação tumoral em micro e macroadenomas, os níveis de PRL foram maiores nos tumores maiores que 1 cm e estes, como esperado, também apresentaram maior índice de invasão paraselar e maiores graus na classificação de Knosp (Tabela 5.2).

Também foi observada uma forte correlação positiva entre os níveis de prolactina e o maior diâmetro tumoral (Gráfico 5.1;  $P < 0.0001$ , rho 0.8).

**Tabela 5.1.** Comparação das características dos pacientes estudados de acordo com o sexo

<b>Características</b>	<b>Mulheres</b>	<b>Homens</b>	<b>Total</b>	<b>P</b>
<b>n (%)</b>	141 (78%)	37 (22%)	178 (100%)	-
<b>Idade (anos)</b>	29.8±10.5	32.4±15.0	30.4±11.6	0.07
<b>PRL (ng/mL)</b>	147 (76-323.5)	1100(179.5-2477)	177.5 (86-500)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Tamanho tumoral</b>				
<b>Maior diâmetro (mm)</b>	12.3±9.4	28.1±17.4	15.7±13.3	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Macro:micro</b>	66 (52.4%): 60 (47.6%)	32 (91.4%): 3 (8.6%)	98 (60.9%): 63(39.1%)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Knosp</b>				
<b>0</b>	92 (82.1%)	10 (47.7%)	102 (76.7%)	<b>0.005</b>
<b>1</b>	1 (0.9%)	1 (4.7%)	2 (1.5%)	
<b>2</b>	3 (2.7%)	1 (4.7%)	4 (3.0%)	
<b>3A</b>	3 (2.7%)	3 (14.3%)	6 (4.5%)	
<b>3B</b>	9 (8.0%)	3 (14.3%)	12 (9.0%)	
<b>4</b>	4 (3.6%)	3 (14.3%)	7 (5.3%)	
<b>Invasão</b>				
<b>(não: sim)</b>	96(85.7%): 16(14.3%)	12(57.1%): 9(42.9%)	108(81.2%): 25(18.8%)	<b>0.005</b>

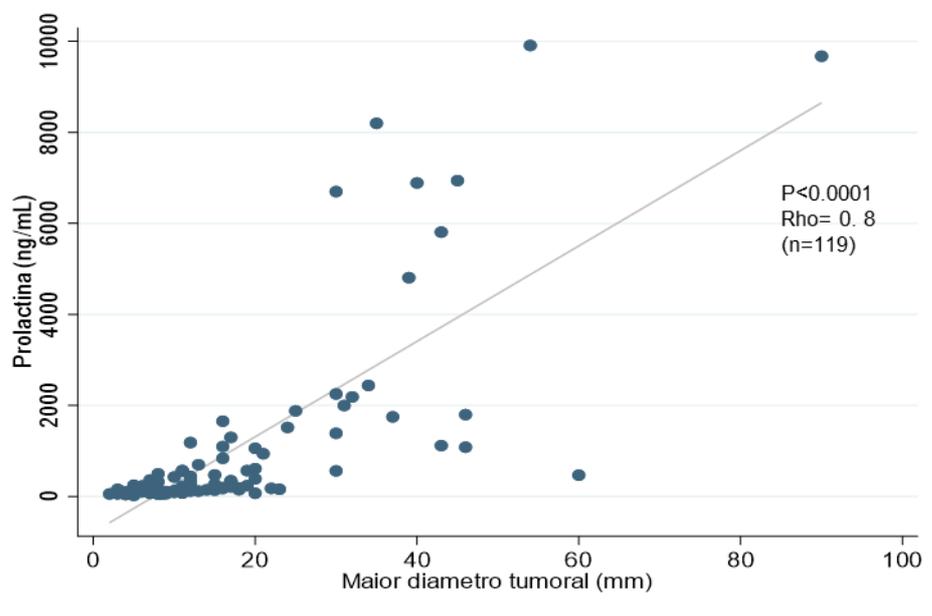
PRL: prolactina

**Tabela 5.2.** Comparação das características dos pacientes estudados, ao diagnóstico, de acordo com a classificação tumoral em macro e microadenoma

<b>Características</b>	<b>Macroadenomas</b>	<b>Microadenomas</b>	<b>Total</b>	<b>P</b>
<b>n (%)</b>	98 (61.0%)	63 (39.0%)	161 (100%)	-
<b>Idade (anos)</b>	28.7 ± 11.8	32.0 ± 9.6	30.0 ± 11.1	<b>0.02</b>
<b>PRL (ng/mL)</b>	410 (169-1300)	84 (60.5-130.5)	177.5 (86-500)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Knosp</b>				
<b>0</b>	33 (51.6%)	61 (100%)	94 (75.2%)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>1</b>	2 (3.1%)	0 (0.0%)	2 (1.6%)	
<b>2</b>	4 (6.2%)	0 (0.0%)	4 (3.2%)	
<b>3A</b>	6 (9.4%)	0 (0.0%)	6 (4.8%)	
<b>3B</b>	12 (18.8%)	0 (0.0%)	12 (9.6%)	
<b>4</b>	7 (10.9%)	0 (0.0%)	7 (5.6%)	
<b>Invasão</b>				
<b>Não</b>	39 (60.9%)	61 (100%)	100 (80.0%)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Sim</b>	25 (39.1%)	0 (0.0%)	25 (20.0%)	

PRL: prolactina

**Gráfico 5.1.** Correlação entre os níveis de prolactina e o maior diâmetro tumoral dos pacientes com prolactinoma



Fonte: próprio autor

## 5.2 Resposta a cabergolina

Em relação a análise da resposta a CAB, um total de 165 pacientes fizeram uso do medicamento, com mediana de tempo de 84 meses (36-132) e média de dose máxima de CAB de 1,25 (0,5 a 3,5) mg/semana. Desses, 19 foram excluídos por intolerância ou por seu uso irregular da medicação, restando 146 pacientes para serem analisados.

Utilizando o critério de normalização da PRL sérica com doses  $\leq 3,0$  mg por semana de CAB, 35 pacientes foram classificados como resistentes (24%) e 111 (76%) como sensíveis. Os pacientes classificados como resistentes foram mais jovens (média de idade de  $26,7 \pm 12,1$  vs  $31,8 \pm 11,3$  anos,  $P = 0,01$ ), tiveram níveis maiores de PRL inicial (1060 (174-2220) ng/mL vs 147 (82-329) ng/mL,  $P = < 0,0001$ ), tumores maiores (diâmetro  $29,1 \pm 18,8$  mm vs  $11,9 \pm 7,8$  mm,  $P = < 0,0001$ ), além de maior

proporção de macroadenomas (87.9% nos resistentes e 53.6% nos sensíveis,  $P=0,001$ ), maior frequência de invasão parasselar (44% nos resistentes e 14,6% nos sensíveis,  $P=0,001$ ) doses maiores de CAB (3,5 mg/ semana nos resistentes e 1mg/semana nos sensíveis,  $P<0,0001$ ) e maior tamanho tumoral após tratamento (10,3 mm versus 5,5mm  $P=0,02$ ) (Tabela 5.3).

Considerando o critério de redução tumoral maior que 30%, 88 foram classificados como tendo redução tumoral e 58 não tiveram redução tumoral. A comparação entre esses critérios é apresentada na Tabela 5.4, observa-se uma concordância em 74 e 22 casos quanto à sensibilidade e resistência, respectivamente, sendo que 14 casos apesar de resistentes apresentaram redução tumoral e 36 casos sensíveis não apresentaram redução tumoral significativa.

Considerando-se o critério de resistência redução de PRL associado a redução tumoral, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos em nenhuma característica. (Apêndice A).

### **5.3 Análise genética do *PRL-R* e avaliação *in silico* das variantes identificadas**

O gene *PRL-R* foi avaliado nos 178 casos. Não foram encontradas alterações novas na região codificante deste gene, apenas as variantes p.Ile100(76)Val (n=18), p.Ile170(146)Leu (n=6), p.Glu400(376)Gln/p.Asn516(492)Ile (n=3), p.Glu470Asp (n=1) e p.Ala591Pro (n=1), previamente descritas na literatura ou no banco de dados do NCBI (Tabela 5.5), em 29 pacientes. Todas as variantes são *missense*, são raras (MAF<1%) e foram encontradas em heterozigose. A Figura 5.1 mostra o eletroferograma das variantes encontradas.

As variantes p.Glu400(376)Gln e p.Asn516(492)Ile foram encontradas em completo desequilíbrio de ligação, ou seja, herdadas juntas no mesmo alelo, em três pacientes. Duas variantes, Ile100(76)Val e Ile170(146)Leu, se localizam no domínio extracelular, enquanto as demais no domínio intracelular.

**Tabela 5.3.** Características clínicas e tumorais dos pacientes com prolactinoma em relação a resposta ao tratamento a cabergolina.

<b>Características</b>	<b>Resistentes</b>	<b>Sensíveis</b>	<b>Total</b>	<b>P</b>
n (%)	35 (24.0%)	111 (76.0%)	146 (100%)	-
Sexo				
(feminino: masculino)	23 (65.7%): 12 (34.3%)	92 (82.9%): 19 (17.1%)	115 (78.8%): 31 (21.2%)	<b>0.03</b>
<b>Ao diagnóstico</b>				
Idade (anos)	26.7±12.1	31.8±11.3	30.6 ±11.6	<b>0.01</b>
PRL (ng/mL)	1060 (174-2220)	147 (82-329)	179 (98-561)	<b>&lt;0.0001</b>
Tamanho tumoral				
MD (mm)	29.1±18.8	11.9±7.8	16.14±13.6	<b>&lt;0.0001</b>
Macro:micro	29 (87.9%): 4 (12.1%)	60 (53.6%): 52 (46.4%)	57 (54.8%): 47 (45.2%)	<b>0.001</b>
Knosp				
0	12 (48.0%)	73 (82.0%)	85 (74.6%)	<b>0.001</b>
1	1 (4.0%)	1 (1.1%)	2 (1.7%)	
2	1 (4.0%)	2 (2.3%)	3 (2.6%)	
3A	1 (4.0%)	5 (5.6%)	6 (5.3%)	
3B	5 (20.0%)	7 (7.9%)	12 (10.5%)	
4	5 (20.0%)	1 (1.1%)	6 (5.3%)	
Invasão				
Não	14 (56.0%)	76 (85.4%)	90 (79.0%)	<b>0.001</b>
Sim	11 (44.0%)	13 (14.6%)	24 (21.0%)	
<b>Pós-tratamento com CAB</b>				
Dose máxima (mg/sem)	3.5 (3.5-7.0)	1 (0.5-1.5)	1 (0.5-2.5)	<b>&lt;0.0001</b>
Tempo de uso (meses)	74.5 (32.5-114)	84 (36-132)	72 (26-120)	0.83
MD tumor (mm)	10.3±13.1	5.5±5.6	6.6±8.2	<b>0.02</b>
Knosp				
0	18 (75.0%)	86 (86.0%)	104 (83.9%)	0.20
1	1 (4.2%)	2 (2.0%)	3 (2.4%)	
2	0 (0.0%)	3 (3.0%)	3 (2.4%)	
3A	1 (4.2%)	3 (3.0%)	4 (3.2%)	
3B	2 (8.3%)	5 (5.0%)	7 (5.7%)	
4	2 (8.3%)	1 (1.0%)	3 (2.4%)	
Invasão				
Não	19 (79.2%)	91 (91.0%)	110 (88.7%)	0.14
Sim	5 (20.8%)	9 (9.0%)	14 (11.3%)	

PRL: prolactina; MD: maior diâmetro; CAB: cabergolina

**Tabela 5.4.** Número de casos resistentes e sensíveis à CAB segundo a normalização do nível hormonal de PRL e redução tumoral (n=146).

<b>PRL sérica / redução tumoral</b>	<b>Sensível n=111</b>	<b>Resistente n=35</b>
<b>Com redução tumoral (n=88)</b>	<b>74</b>	<b>14</b>
<b>Sem redução tumoral (n=58)</b>	<b>36</b>	<b>22</b>

PRL: prolactina; CAB: cabergolina.

**Tabela 5.5** Variantes encontradas no gene *PRL-R* em pacientes portadores de prolactinomas.

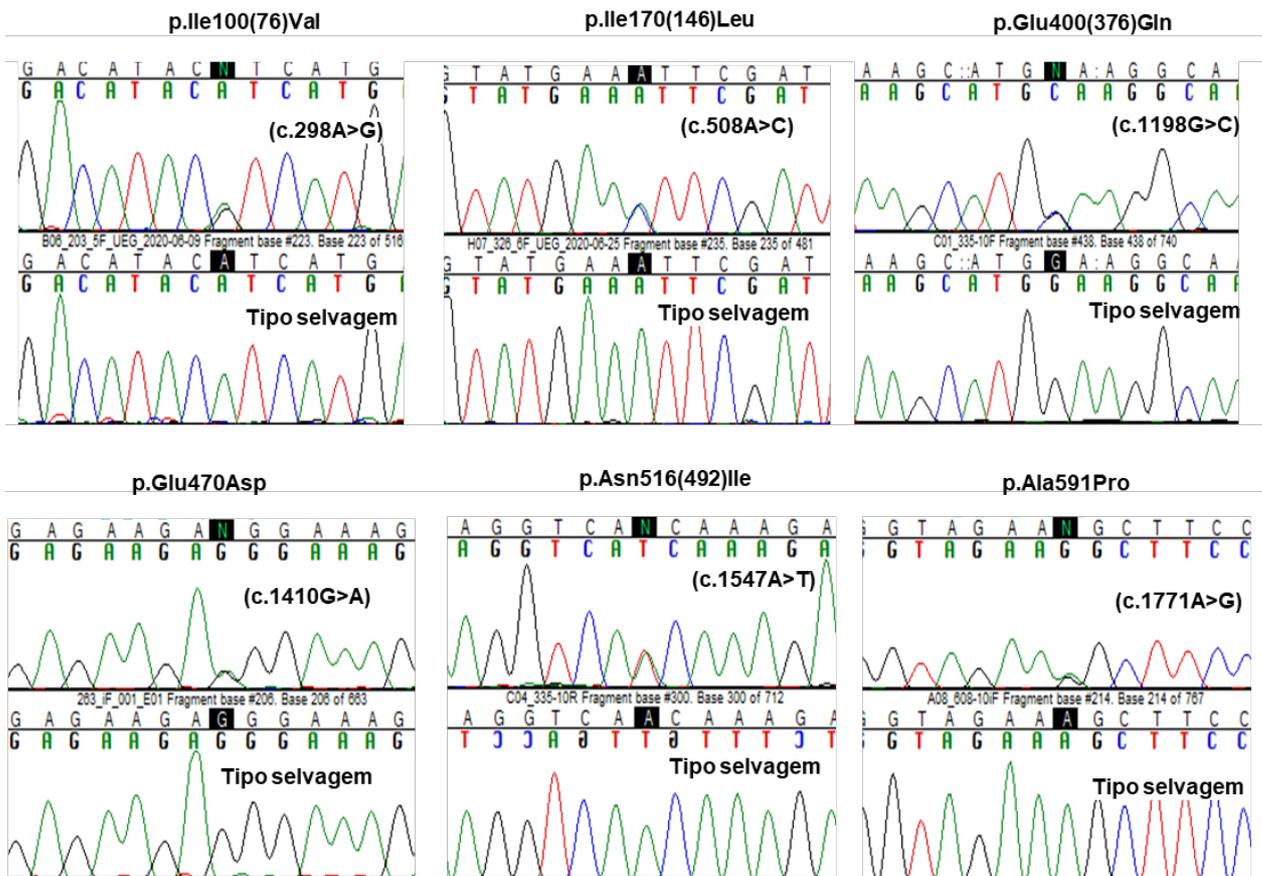
<b>Variante</b>	<b>Alteração nucleotídica</b>	<b>Localização</b>	<b>Domínio proteico</b>	<b>Tipo</b>	<b>Referência</b>
<b>p.Ile100(76)Val</b>	c.298A>G	Exon 5	D1	Missense	CM100406/ rs2228482
<b>p.Ile170(146)Leu</b>	c.508A>C	Exon 6	D2	Missense	rs72478580
<b>p.Glu400(376)Gln*</b>	c.1198G>C	Exon 10	IC	Missense	rs144399444
<b>p.Glu470Asp</b>	c.1735A>G	Exon 10	IC	Missense	rs62355478
<b>p.Asn516(492)Ile*</b>	c.1547A>T	Exon 10	IC	Missense	rs147265072
<b>p.Ala591Pro</b>	c.1771G>C	Exon10	IC	Missense	rs765841723

\*as variantes p.Glu400Gln/p.Asn516Ile foram encontradas em heterozigose dupla.

D1 e D2, domínios extracelulares de ligação a prolactina, IC, domínio intracelular.

Em parênteses é apresentado a posição do aminoácido nas descrições das variantes em estudos prévios.

As variantes encontradas neste estudo foram comparadas ao banco de pacientes brasileiros, ABRaOM e com a coorte ExAc, mostrando que as variantes p.Glu400(376)Gln/p.Asn516(492)Ile e p.Ala591Pro tiveram maior frequência nos portadores de prolactinoma, conforme mostrado a Tabela 5.6.



Fonte: próprio autor

**Figura 5.1** Eletroferogramas das seis variantes identificadas nos pacientes com prolactinoma.

**Tabela 5.6.** Frequência das variantes *missense* do PRL-R observadas em pacientes com prolactinoma e comparação com a frequência observada em banco de dados.

Variante	Pacientes	ABrAOM		ExAc	
	MAF (N)	MAF	P	MAF	P
<b>p.Ile100Val</b>	0.0612 (15)	0.0482	0.45	0.0434	0.44
<b>p.Ile170Leu</b>	0.0218 (7)	0.0269	0.85	0.0189	0.78
<b>p.Glu400Gln*</b>	0.0089 (3)	0.0004	<b>0.007</b>	0.0009	<b>0.015</b>
<b>p.Glu470Asp</b>	0.0031 (1)	0.0047	0.98	ND	-
<b>p.Asn516Ile*</b>	0.0089 (3)	0.0004	<b>0.007</b>	0.0009	<b>0.015</b>
<b>p.Ala591Pro</b>	0.0031 (1)	ND	-	0.00003	<b>0.013</b>

\*as variantes p.Glu400(376)Gln/p.Asn516(492)Ile foram encontradas em heterozigose dupla.  
ND: não disponível

As variantes *missenses* identificadas foram submetidas a uma análise *in silico* utilizando quatro diferentes sites de predição (SIFT, PANTHER, Mutation Taster e Polyphen-2). A variante p.Asn516(492)Ile foi considerada patogênica em todas as ferramentas. As variantes p.Ile100(76)Val e p.Ala591Pro foram consideradas benignas e as variantes p.Ile170(146)Leu, p.Glu400(376)Gln e p.Glu470Asp foram consideradas provavelmente benignas pela maioria das ferramentas utilizadas (Tabela 5.7).

**Tabela 5.7.** Análise *in silico* das variantes *missenses* observadas no *PRL-R* em pacientes com prolactinoma

Programa	Ile100(76) Val	Ile170(146) Leu	Glu400(376) Gln	Glu470Asp	Asn516(492)	Ala591Pro
<b>SIFT</b>	Tolerável Score: 1.0	Tolerável Score: 1.0	Tolerável Score: 0.24	Tolerável Score: 0.41	Afeta a função proteica** Score: 0.03	Tolerável Score: 0.07
<b>PANTHER</b>	Provavelmente benigna Ptime: 30/Pdel: 0.13	Provavelmente benigna Ptime:176/Pdel: 0.27	Provavelmente benigna Ptime:176/Pdel: 0.27	Provavelmente patogênica Ptime:220/Pdel: 0.5	Provavelmente patogênica Ptime:455/Pdel: 0.57	Provavelmente benigna Ptime:30/Pdel: 0.13
<b>Mutation Taster</b>	Polimorfismo prob: 0.9999	Causadora de doença* prob: 0.6120	Polimorfismo prob: 0.9999	Polimorfismo prob: 0.9999	Causadora de doença prob: 0.9536	Polimorfismo prob: 0.9999
<b>Polyphen-2</b>	Benigna Score HD= 0.001 Score HV= 0.003	Benigna Score HD= 0.051 Score HV= 0.011	Possivelmente patogênica Score HD= 0.955 Score HV= 0.770	Benigna Score HD= 0.019 Score HV= 0.049	Possivelmente patogênica Score HD= 0.987 Score HV= 0.878	Benigna Score HD= 0.004 Score HV= 0.001

\* leva em consideração a classificação no ClinVar que relaciona a variante ao fibroadenoma múltiplos de mama.

\*\* programa alerta para um baixo nível de confiança dessa previsão.

#### **5.4 Relação das variantes do *PRL-R*, com características clínicas, tumorais e resposta a cabergolina**

A Tabela 5.8 apresenta a comparação entre pacientes portadores e não portadores de variantes no gene *PRL-R*. Observamos uma maior frequência de pacientes do sexo masculino (37,9% vs 17,1%  $P = 0,01$ ) no grupo onde foram identificadas variantes no gene do *PRL-R*. Ainda, os pacientes portadores dessas variantes apresentavam maiores níveis de PRL (700 (137,5-1994) ng/mL vs 169 (91,5-376,5) ng/mL;  $P = 0,007$ ) e tumores com maiores diâmetros (23,0 (60-129) mm vs 8,0 (5,6-12,0) mm;  $P = 0,001$ ) (Tabela 5.8 e Gráfico 5.2).

A frequência de macroadenomas foi consequentemente maior entre os pacientes portadores de variante no gene *PRL-R* (82,1% vs 57,8%  $P = 0,03$ ; Tabela 5.8, Gráfico 5.3). Quanto a resposta a CAB usando o critério de não normalização de PRL, a frequência de pacientes resistentes foi maior no grupo portador de variantes versus não portador (51,7% vs 17,1%  $P < 0,0001$ ; Tabela 5.8, Gráfico 5.4). Contudo, as mesmas diferenças não foram observadas quando comparadas as variantes entre si (Gráfico 5.5).

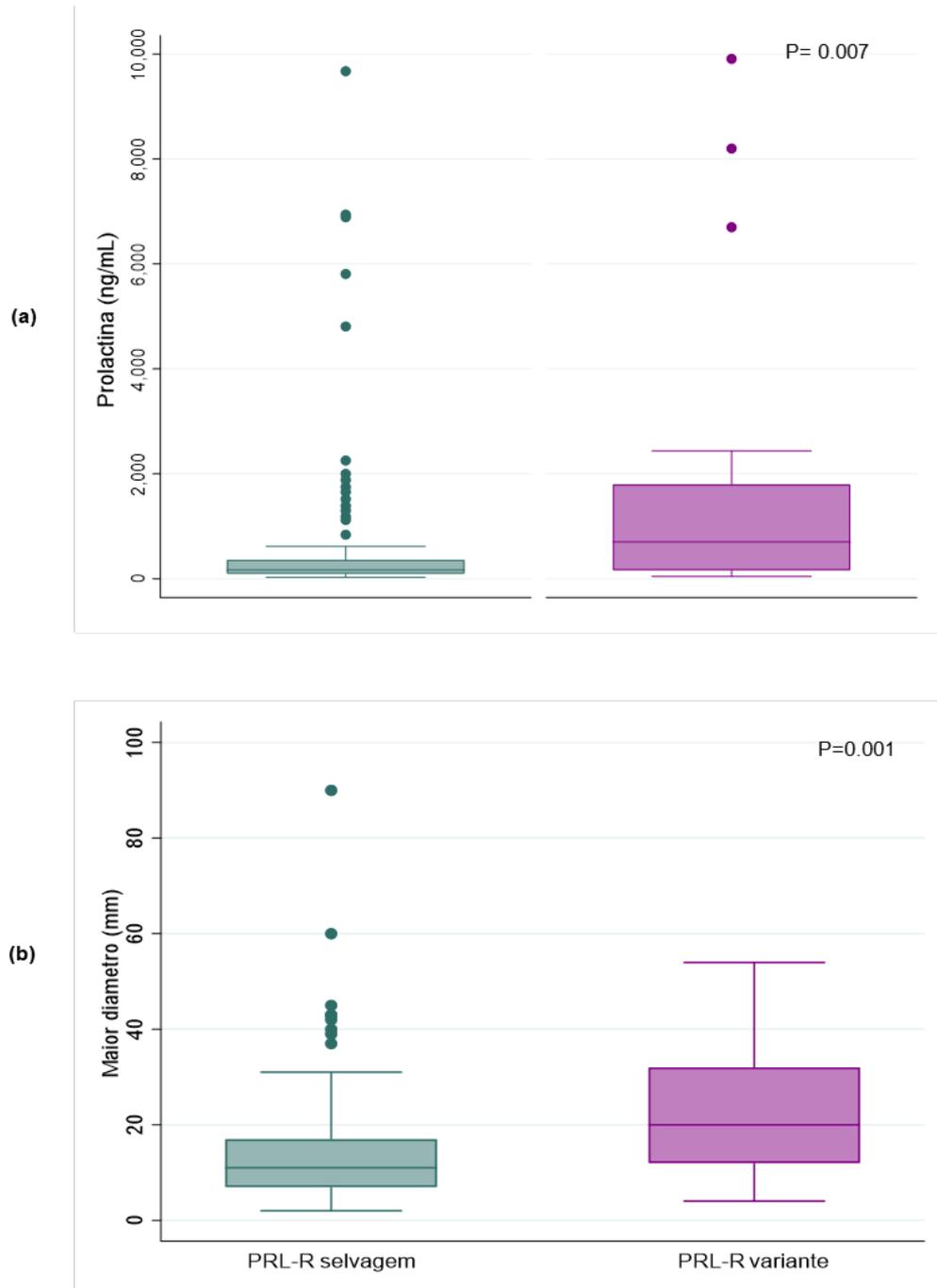
A Tabela 5.9 apresenta os dados individualizados de cada um dos 29 pacientes portadores das variantes no *PRL-R*. Os dados de todos os pacientes incluídos no estudo estão apresentados no Apêndice B.

**Tabela 5.8.** Características clínicas e tumorais nos pacientes com e sem variantes no gene do *PRL-R*.

Características	<i>PRL-R</i>			P
	Tipo selvagem	Variante	Total	
N (%)	119 (81.5%)	29 (18.5%)	146 (100%)	
Sexo (feminino: masculino)	97 (82.9%): 20 (17.1%)	18 (62.1%):11 (37.9%)	115 (78.8%): 31 (21.2%)	<b>0.01</b>
<b>Ao diagnóstico</b>				
Idade (anos)	30.2±13.4	31.7±9.6	30.6 ±11.6	0.14
PRL (ng/mL)	169 (91.5- 376.5)	700 (137.5- 1994)	179.5 (98- 561)	<b>0.007</b>
Tamanho tumoral MD (mm)	8.0 (5.6-12.0)	23.0 (60-129)	11 (7-19.5)	<b>0.001</b>
Macro: micro	63 (57.8%): 46 (42.2%)	23 (82.1%): 5 (17.9%)	86 (62.8%): 51 (37.2%)	<b>0.03</b>
Knosp				
0	73 (76.8%)	12 (63.2%)	85 (74.6%)	0.15
1	1 (1.0%)	1 (5.3%)	2 (1.7%)	
2	3 (3.3%)	0 (0%)	3 (2.6%)	
3A	6 (6.3%)	0 (0%)	6 (5.3%)	
3B	8 (8.4%)	4 (21.0%)	12 (10.5%)	
4	4 (4.2%)	2 (10.5%)	6 (5.3%)	
Invasão				
Não	58 (84.1%)	9 (69.2%)	67 (81.7%)	0.24
Sim	11 (15.9%)	4 (30.8%)	15 (18.3%)	
<b>Resposta a cabergolina</b>				
Resistente	20 (17.1%)	15 (51.7%)	35 (24%)	<b>&lt;0.0001</b>
Sensível	97 (82.9%)	14 (48.3%)	111 (76%)	

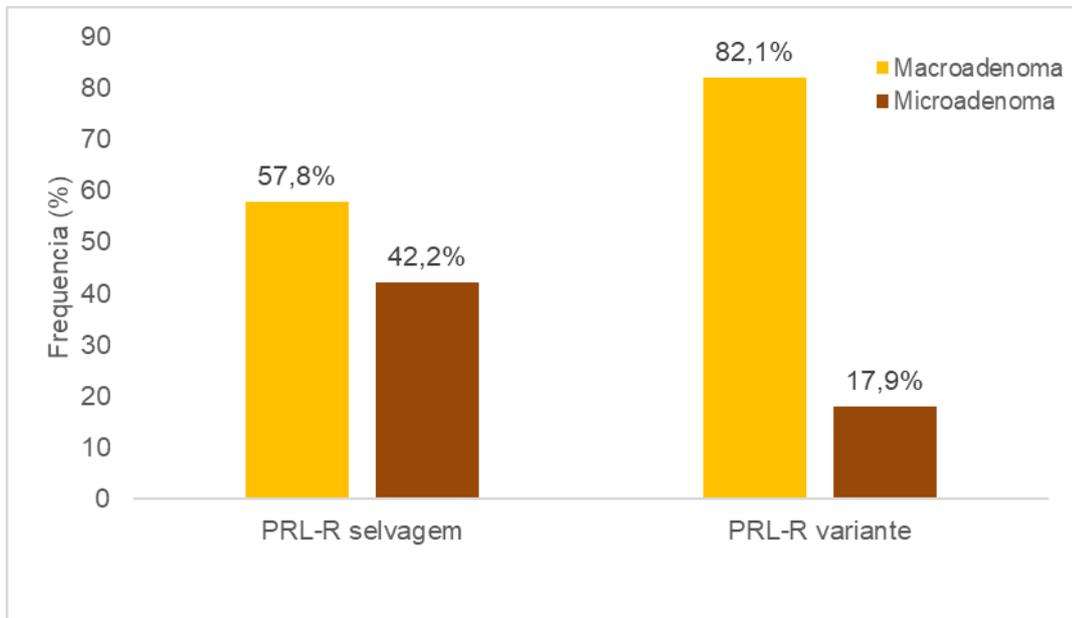
PRL: prolactina; MD: maior diâmetro;

**Gráfico 5.2.** Relação dos níveis de prolactina **(a)** e maior diâmetro tumoral **(b)** entre pacientes portadores e não portadores de variantes no gene *PRL-R*



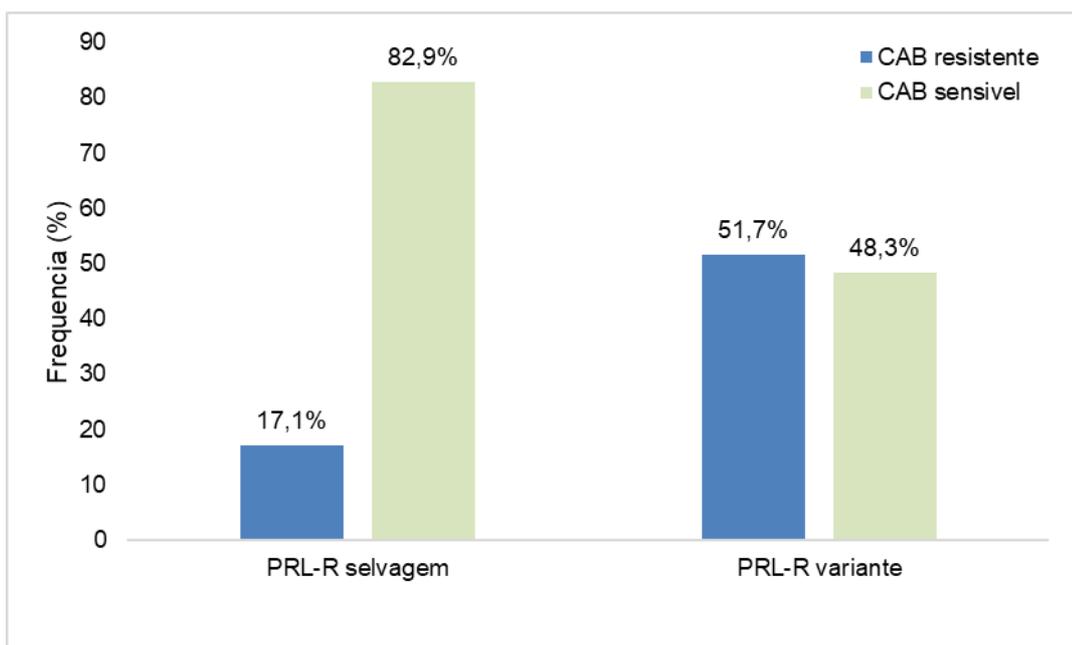
Fonte: próprio autor

**Grafico 5.3.** Frequência de macroadenomas e microadenomas entre pacientes portadores e não portadores de variantes no gene *PRL-R* (P=0.03)



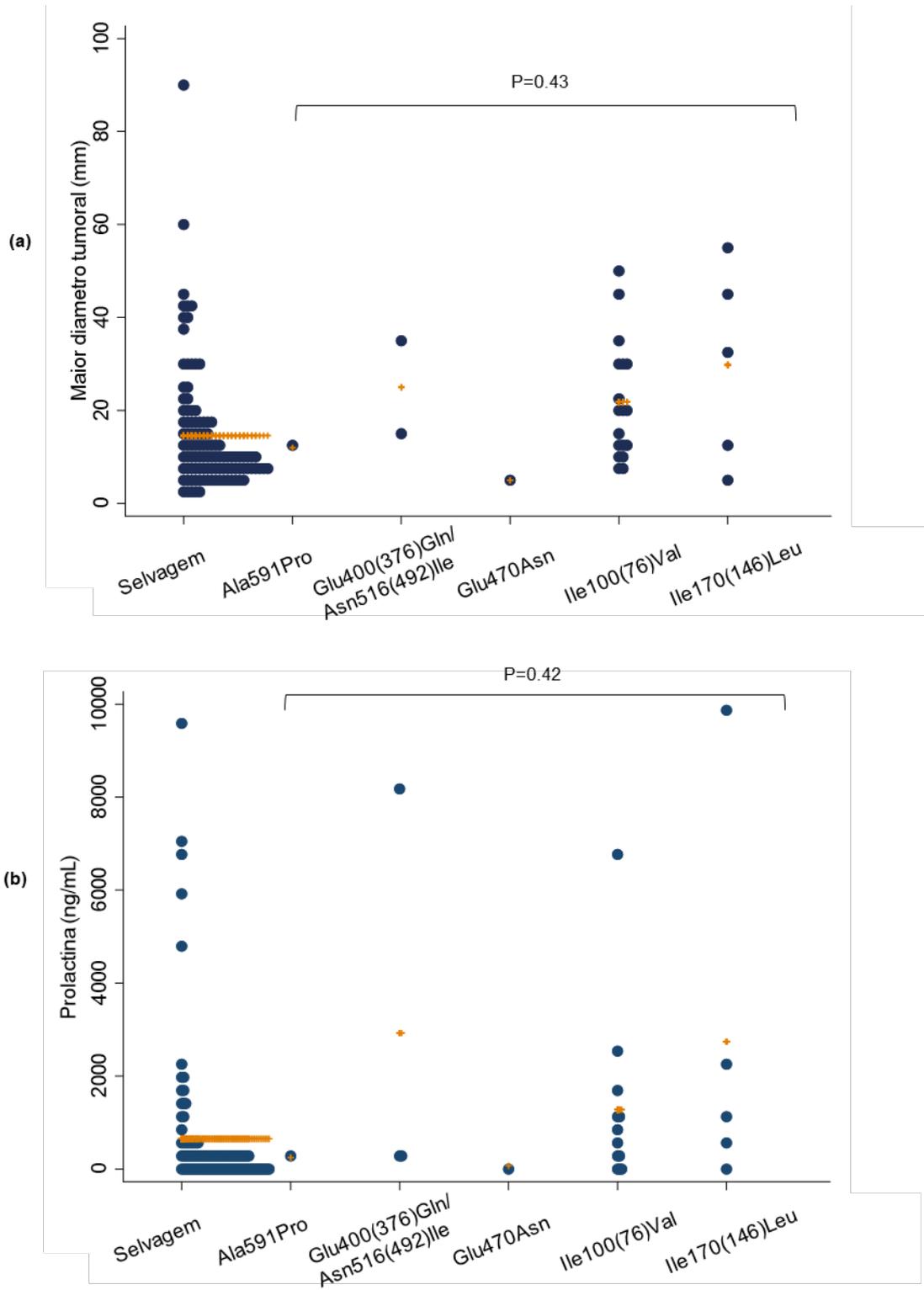
Fonte: próprio autor

**Grafico 5.4.** Comparação da frequência a resposta a CAB entre pacientes portadores e não portadores de variantes no gene *PRL-R* (P=<0.0001)



Fonte: próprio autor

**Gráfico 5.5.** Relação dos níveis de prolactina **(a)** e maior diâmetro tumoral **(b)** entre pacientes portadores e não portadores de variantes no gene *PRLR*



Fonte: próprio autor

**Tabela 5.9.** Características dos pacientes portadores de variantes no gene *PRL-R*.

ID	S e x o	Variante	Idade (anos)	Clínica	PRL (ng/mL)	MDT (mm)/ Knosp	Resposta CAB	Redução >30%
1	M	Ile100Val	23	Galactorréia e disfunção sexual	940,0	21/ND	Sensível	Sim
2	M	Ile100Val	26	Alteração visual	ND	50/3B	Resistente	Sim
3	F	Ile100Val	14	Galactorréia. Alteração visual	ND	30/ND*	Resistente	Não
4	M	Ile100Val	27	Galactorréia, amenorréia, redução de libido	700	13/0	Sensível	Sim
5	F	Ile100Val	34	Galactorréia, amenorréia	98	7/0	Sensível	Sim
6	M	Ile100Val	26	Cefaléia	1100	16/ND*	Sensível	ND
7	F	Ile100Val	33	Galactorréia, amenorréia	ND	11/0	Resistente	ND
8	F	Ile100Val	42	Galactorréia	ND	12/0	Sensível	Sim
9	F	Ile100Val	39	Galactorréia, amenorréia	72	20/ND	Sensível	Não
10	M	Ile100Val	29	Redução de libido, Cefaléia e Alteração visual	2000	31/3A	Resistente	Não
11	M	Ile100Val	38	Redução de libido	2254	30/ND	Sensível	Sim
12	F	Ile100Val	39	Galactorréia, dismenorréia	107	9/0	Sensível	Não
13	M	Ile100Val	16	Cefaléia e Alteração visual	1800	46/ND*	Resistente	ND
14	F	Ile100Val	17	Galactorréia, amenorréia, cefaléia	ND	30/3B	Resistente	Não
15	F	Ile100Val	19	Galactorréia, amenorréia, cefaléia	1060	20/ND	Resistente	ND
16	M	Ile100Val	40	Disfunção sexual	160	23/4	Resistente	Não
17	F	Ile100Val	37	Galactorréia	ND	12/0	Sensível	Sim
18	F	Ile100Val	18	Dismenorréia	300	11	ND	ND
19	M	Ile170Leu	20	Cefaléia	9910,0	54/ND	Resistente	Sim
20	F	Ile170Leu	26	Amenorréia, galactorréia, infertilidade	1084,0	46/3B	Sensível	Sim
21	F	Ile170Leu	24	Amenorréia, galactorréia, redução de libido	442	12/0	Resistente	Não
22	F	Ile170Leu	28	Amenorréia, galactorréia, cefaléia	85	5/0	Sensível	Sim
23	F	Ile170Leu	36	Amenorréia	ND	8/0	Sensível	ND
24	M	Ile170Leu	21	Alteração visual	2189	32/ND*	Sensível	Sim
25	F	Glu470Asp	38	Dismenorréia	44	4/0	Sensível	Não
26	F	Glu400Gln Asn516Ile	24	Amenorréia, cefaléia	312	ND	Resistente	Não
27	M	Glu400Gln Asn516Ile	41	cefaléia, alteração. visual e disfunção sexual	270	15/0	Sensível	Sim
28	M	Glu400Gln Asn516Ile	25	Atraso puberal	8200,0	35/4	Resistente	Sim
29	F	Ala591Pro	30	Galactorréia, infertilidade	248	12/0	Sensível	Sim

F: feminino; M: masculino; MDT: maior diâmetro tumoral. ND: não determinado; \*classificados como invasivos pela descrição de ressonâncias externas em prontuário médico do HCFMUSP.

## **6. DISCUSSÃO**

A coorte desse estudo foi composta por 78% de pacientes do sexo feminino, sendo que os pacientes do sexo masculino apresentaram maiores níveis de PRL inicial, tumores maiores e maior relação de macroadenomas *versus* microadenomas, comparados com os pacientes do sexo feminino, o que condiz com a literatura<sup>7; 17</sup>.

Dessa coorte, 24% dos pacientes foram classificados como resistentes à CAB e esses foram mais jovens, tiveram maiores níveis de PRL inicial, maiores diâmetros tumorais, proporcionalmente mais macroadenomas, maior frequência de invasão parasselar e utilizaram doses maiores de CAB, resultados também concordantes com análises anteriores<sup>17; 25</sup>.

A variante Ile100(76)Val havia sido descrita em pacientes portadoras de fibroadenomas mamários benignos (10 pacientes e oito controles)<sup>70</sup>, na coorte de prolactinomas publicada em 2016<sup>73</sup> (9 pacientes em heterozigose e em dois pacientes em homozigose) e em sete pacientes na coorte de prolactinomas publicada em 2019<sup>74</sup>. Embora já tenha sido descrita ativação constitutiva dessa variante pelas vias STAT5 e ERK1/2<sup>70</sup>, não foram confirmadas alterações funcionais noss estudo *in vitro* posteriores<sup>73;74</sup>. Essa variante foi encontrada em dezoito dos nossos pacientes, porém nas análises *in silico* foi considerada benigna e não houve diferença significativa em sua frequência quando comparada aos bancos de dados ABraOM e ExAC.

A variante Ile170(146)Leu havia sido descrita no estudo com pacientes portadoras de fibroadenomas mamários benignos (quatro pacientes), na coorte de prolactinomas publicada em 2016 (três pacientes) e na coorte de prolactinomas de 2019 (sete pacientes). Quanto às alterações funcionais dessa variante, houve ativação constitutiva, via STAT5<sup>69</sup> e ERK1/2<sup>70</sup>, e ainda aumento sinalização via STAT5 mas às custas de níveis supra fisiológicos de PRL<sup>74</sup>. Vale ressaltar que esses níveis podem ocorrer em pacientes portadores de prolactinomas e que talvez essa variante

tenha algum papel na progressão tumoral. Nos estudos *in silico*, foi considerada provavelmente benigna por Cortillout *et al*<sup>70</sup> e em nossa análise. Em nossa coorte foi encontrada em seis pacientes e não foi relacionada à presença de prolactinoma em estudos anteriores<sup>70; 74</sup> ou em nossa análise.

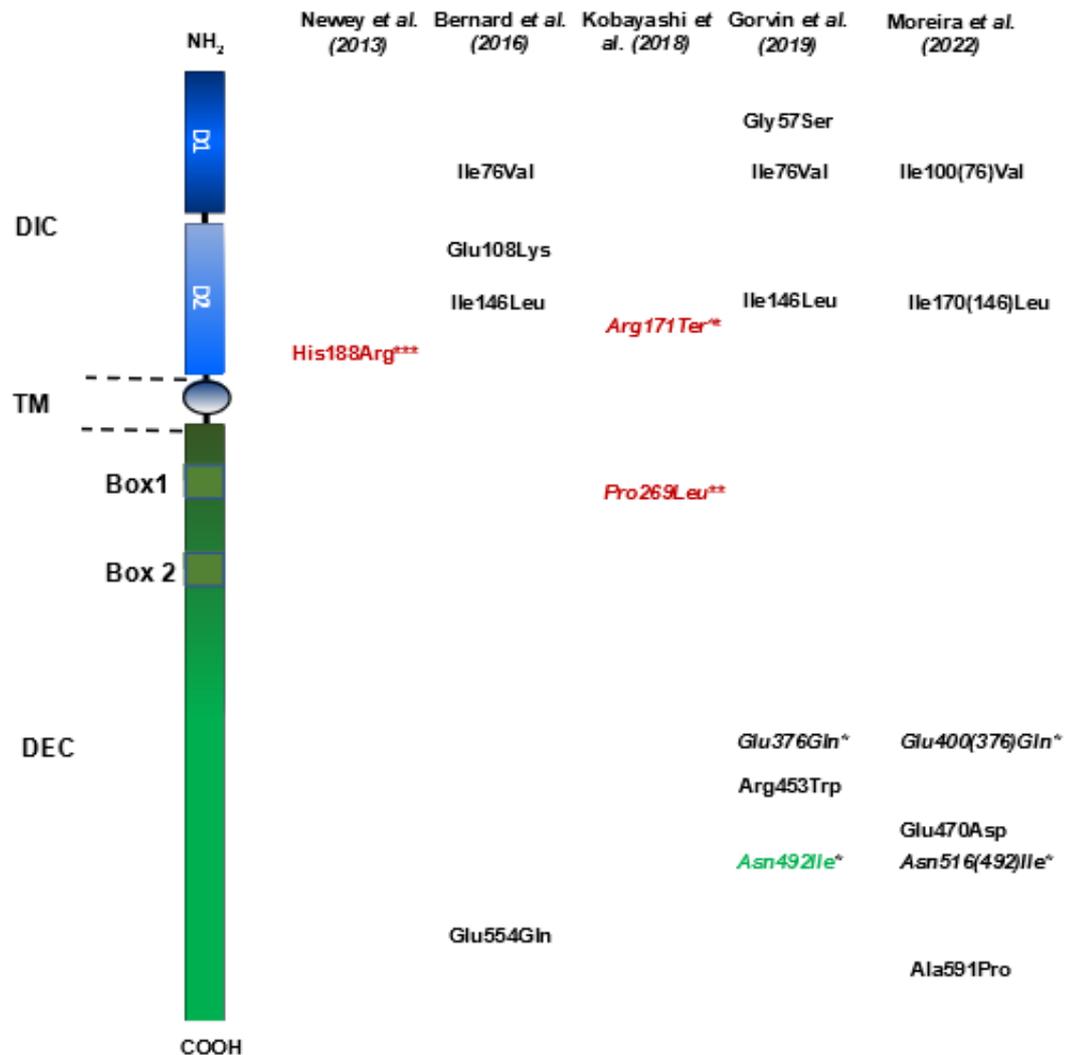
A variante p.Glu400(376)Gln foi descrita previamente na coorte de prolactinomas em heterozigose dupla com p.Asn516(492)Ile em nove pacientes<sup>74</sup>. As variantes p.Glu400(376)Gln/p.Asn516(492)Ile estiveram em maior frequência nos portadores de prolactinomas em estudo anterior<sup>74</sup> e em nossa análise, onde foram encontradas também em heterozigose dupla em três pacientes. A variante p.Glu400(376)Gln apresentou aumento da sinalização intracelular via STAT5 às custas de níveis supra fisiológicos de PRL<sup>74</sup>. Na análise *in silico*, foi anteriormente considerada como possivelmente patogênica nas duas ferramentas utilizadas<sup>74</sup> (SIFT e Polyphen-2), e somente na Polyphen-2 em nossa análise. Já a variante Asn516(492)Ile, também possivelmente patogênica em duas ferramentas, apresentou aumento da expressão do pAkt e da proliferação celular com concentrações menores de PRL<sup>74</sup>, e foi considerada patogênica em todas as ferramentas *in silico* utilizadas em nosso estudo.

Estudos prévio com antagonistas do PRL-R mostraram que a PRL inibe a fosforilação da via Akt em situações fisiológicas, reduzindo a proliferação de células GH3<sup>68</sup>, reforçando que o ganho de função do receptor com aumento da fosforilação do Akt possa levar à proliferação de lactotrófos tumorais. Portanto, as variantes p.Glu400(376)Gln/p.Asn516(492)Ile parecem ter papel no desenvolvimento e progressão dos prolactinomas.

Um paciente da coorte apresentou a variante p.Glu470Asp, descrita em bancos de dados porém até então não relatada em pacientes com prolactinomas. Essa

variante não foi encontrada com maior frequência em pacientes com prolactinoma, quando comparada com o banco brasileiro ABraOM e somente uma ferramenta *in silico*, PANTHER, a considerou provavelmente patogênica. O paciente que apresentou essa variante é sensível à CAB, porém não apresentou redução do tamanho tumoral significativo após o tratamento.

Outro paciente apresentou a variante p.Ala591Pro, também não descrita previamente em portadores de prolactinomas, e foi associada à maior frequência de prolactinoma quando comparado com o banco da ExAc. Foi considerada benigna pelas ferramentas *in silico* nesse estudo. Esse paciente também é sensível à CAB, mas sem redução do tamanho tumoral significativo após o tratamento. A Figura 6.1. localiza as variantes já descritas no PRL-R e as descritas no estudo atual. A Tabela 6.1 compara a frequência das variantes do PRL-R, estudos funcionais e análises *in silico* previamente descritos e no presente estudo.



Fonte: próprio autor

**Figura 6.1.** Gene PRL-R e as variantes descritas previamente na literatura e no estudo atual. DIC: Domínio intracelular; DEC: Domínio extracelular; TM: Domínio transmembrana; COOH: Terminação carboxil; NH<sub>2</sub>: Terminação amino. Em vermelho e verde, variantes com perda de e ganho de função, respectivamente.

**Tabela 6.1.** Comparação das variantes do PRL-R, e suas respectivas análises funcionais, identificadas no presente estudo com as descritas na literatura

Variantes PRL-R	FMM 2009, Courtilot et al <sup>70</sup> n=95		Prolactinomas 2016, Bernard et al <sup>73</sup> n=88		Prolactinomas 2019, Gorvin et al <sup>7</sup> n=46		Prolactinomas 2022, Moreira et al n=178	
	N	Análise funcional	N	Análise <i>in silico</i> / estudo funcional	N	Análise <i>in silico</i> / estudo funcional	N	Análise <i>in silico</i>
Ile100(76)Val	10	Ativação constitutiva (JAK/STAT)	11**	Benigna (5/5) / Sem alteração	7	Benigna (2/2) / Sem alteração	18	Benigna em 4/4
Ile170(146)Leu	4	Ativação constitutiva (JAK/STAT)	3	Patogênica (1/5) / Sem alteração	7	Benigna (2/2) / Aumento da sinalização*	6	Patogênica em 1/4
Glu400(376)Gln	-	-	-	-	9/+	Patogênica (2/2) / Aumento da sinalização*	3/+	Patogênica em 1/4
Asn516(492)Ile	-	-	-	-	9/+	Patogênica (2/2) / Aumento da proliferação (Akt)	3/+	Patogênica em 4/4
p.Glu470Asp	-	-	-	-	-	-	1	Provavelmente patogênica em 1/4
p.Ala591Pro	-	-	-	-	-	-	1	Benigna em 4/4

Legenda: FMM: fibroadenomas múltiplos de mama;

Ferramentas de análise *in silico*:

Bernard: Polyphen-2, UMD, Mutation taster, SNP&GO, SIFT.

Gorvin: SIFT, Polyphen-2.

Moreira: SIFT, Polyphen-2, PANTHER, Mutation taster;

\*em níveis suprafisiológicos de PRL; \*\*9 em heterozigose e 2 em homozigose; +heterozigose dupla

Como o número de portadores de cada variante foi pequeno nesse estudo para sua análise estatística individual, agrupamos os pacientes portadores de variantes e os comparamos com o grupo sem variantes. Nessa análise, os pacientes com polimorfismos foram significativamente relacionados a uma maior frequência de pacientes do sexo masculino, a maiores níveis de PRL sérica ao diagnóstico, maiores tamanhos tumorais e à maior resistência à CAB. Bernard et al<sup>67</sup> já haviam demonstrado que camundongos *knockout* para PRL-R representam um modelo de prolactinomas agressivos/invasivos, fato que tem certa correspondência com a preponderância de pacientes resistentes entre os portadores de variantes do PRL-R.

Os modelos *knockout* para PRL-R estão associados à hiperprolactinemia e ao desenvolvimento de prolactinomas<sup>48</sup>. Portanto, em prolactinomas humanos, poderia-se esperar menor expressão de PRL-R ou variantes com perda de função. Mas, ao contrário, parece haver maior expressão de PRL-R nesses tumores, proporcional à PRL sérica e a redução em amostras tumorais de pacientes tratados com BRC<sup>51</sup>. Em um relato de caso de prolactinoma extremamente agressivo e pouco diferenciado, houve hiperexpressão do gene *PRL-R* e ausência da expressão do receptor de estrogênio por imunohistoquímica<sup>79</sup>. Em cultura de células desse tumor, a adição de PRL ativou a via de sinalização JAK-STAT5 (JAK3) e induziu proliferação celular, indicando uma alça autócrina da PRL proliferante no tumor, via JAK3<sup>79</sup>.

Ademais, as variantes provavelmente patogênicas, p.Glu400(376)Gln/p.Asn516(492)Ile, se encontram no domínio intracelular, provavelmente com uma maior interferência das vias de sinalização pós receptor. A mudança da via de sinalização da JAK/STAT para a via Akt descrita na variante Asn516(492)Ile e relacionada à proliferação celular, também pode explicar o

mecanismo de formação tumoral presente nesses casos<sup>68</sup>, com implicações inclusive terapêuticas<sup>74</sup>.

Outro fator de importante influência para os prolactinomas é o estrogênio. Recentemente demonstrou-se que há um *crosstalk* entre o PRL-R e o receptor de estrógeno tipo alpha (ER $\alpha$ ). A maior expressão desses receptores foi associada à fosforilação de ERK1/2, ao aumento de invasividade do tumor e redução da resposta aos antagonistas de estrogênio<sup>77</sup>. Em outro estudo, verificou-se maior expressão de ER $\alpha$  e de PRL-R em amostras humanas de prolactinomas resistentes<sup>78</sup>. Os estrogênios se ligam ao ER $\alpha$  estimulando a proliferação dos lactotrofos e a inibição desses receptores restaura a sensibilidade das células do prolactinoma à BRC<sup>33</sup>. Portanto, as ações da dopamina e da prolactina podem ser moduladas por fatores relacionados ao sexo biológico.

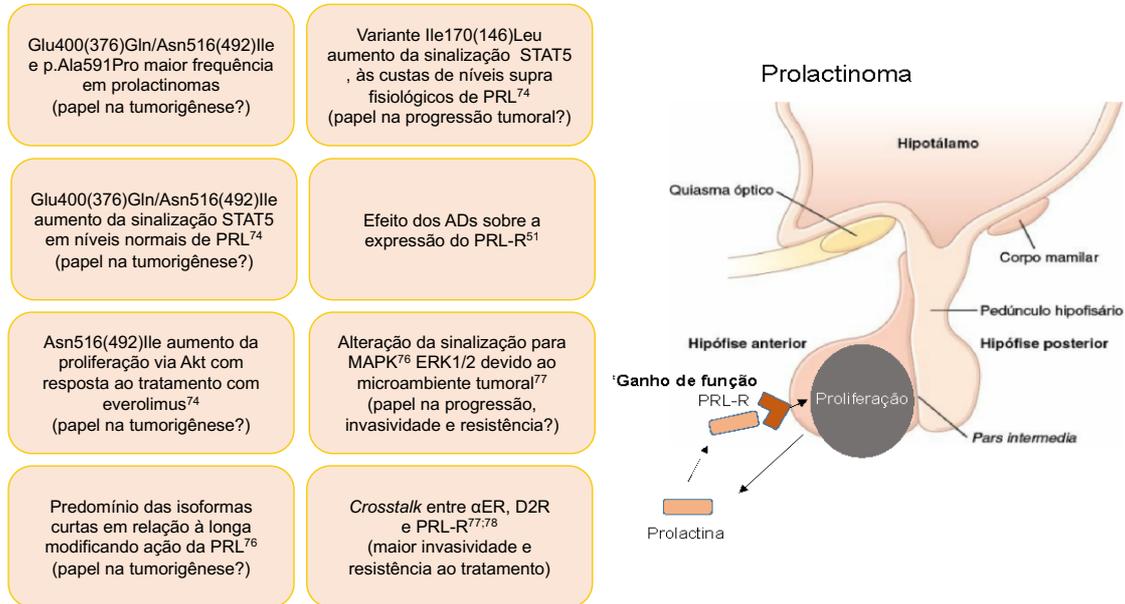
O câncer de mama é um modelo de estudo para ações de estrogênio e da PRL. Nessa neoplasia, há menor proporção de isoformas curtas sobre longa e alguns autores acreditam que a perda da inibição promovida pelas isoformas curtas possam contribuir para a tumorigênese<sup>76</sup>. O estradiol pode induzir aumento da transcrição do *PRL-R* em células de câncer de mama e, após o tratamento com PRL, houve ativação das vias PI3K/Akt e RAF/MEK/ERK, levando à proliferação celular<sup>76</sup>. A mudança na sinalização pelo PRL-R de vias mediadas por STAT5 para vias mediadas por MAPK pode ser causada por mudanças no microambiente tumoral, também promovidas pela PRL<sup>77</sup>. Há um aumento da transcrição de metaloproteinases de matriz extracelular frente à presença da PRL, tornando o microambiente tumoral mais rígido, achado relacionado a tumores mais agressivos e resistentes às terapêuticas habituais<sup>77</sup>. Portanto, em paralelo com os estudos em câncer de mama, ainda que as demais variantes do PRL-R não tenham sido relacionadas à presença de prolactinoma em

nosso estudo, elas ainda podem estar envolvidas em mecanismos de progressão tumoral, em um microambiente tumoral com altos níveis de PRL.

Gorvin et al<sup>74</sup> demonstraram que as variantes Ile170(146)Leu, Glu400(376)Gln, e Gly57Ser apresentaram aumento da sinalização intracelular com concentrações maiores de PRL. Além disso, algumas variantes podem favorecer determinadas vias de proliferação, levando a características tumorais mais agressivas que podem consequentemente levar à maior resistência aos ADs, provavelmente pelas vias Akt e MAPK. Também é possível que as isoformas curtas do PRL-R sejam mais afetadas pelas variantes, reduzindo sua ação em inibir a isoforma longa, como ocorre no ambiente fisiológico.

Gorvin et al<sup>74</sup> estudaram amostras de DNA tumoral e germinativo, em alguns casos pareado, mas não encontraram diferença nas variantes encontradas no PRL-R entre esses tecidos, ainda que poucas amostras tenham sido avaliadas.

É possível que diferentes variantes, mudança na proporção das isoformas, densidade do PRL-R, *crosstalk* com receptores D2R e ER alpha, mudanças nas vias de sinalização e características do microambiente tumoral estejam envolvidos nos mecanismos que influenciam o sistema PRL/PRL-R na tumorigênese e progressão dos prolactinomas. A Figura 6.2 esquematiza e sumariza esses mecanismos. Mais estudos avaliando as variantes de PRL-R germinativas e somáticas são necessários para esclarecer as características do sistema PRL/PRL-R nos prolactinomas, ampliando o entendimento da tumorigênese e o desenvolvimento de alvos terapêuticos.



Fonte: próprio autor

**Figura 6.2.** Modelo PRL/PRL-R nos prolactinomas e possíveis mecanismos envolvidos na tumorigênese e progressão tumoral

## **7. CONCLUSÕES**

Esse estudo mostrou uma maior frequência das variantes p.Glu400(376)Gln/p.Asn516(492)Ile e p.Ala591Pro no PRL-R nos portadores de prolactinomas quando comparados a banco de dados brasileiro e internacional.

A variante p.Asn516(492)Ile, herdada em conjunto com a p.Glu400(376)Gln, foi considerada patogênica em todas as ferramentas *in silico* utilizadas.

Os pacientes portadores de variantes no gene *PRL-R* apresentaram uma maior frequência de pacientes do sexo masculino, níveis mais elevados de PRL sérica, maior tamanho tumoral ao diagnóstico e mais casos de resistência a CAB, quanto à não normalização da PRL sérica.

Portanto, as variantes p.Glu400(376)Gln /p.Asn516(492)Ile parecem ter papel na tumorigênese dos prolactinomas e a ocorrência de variantes no PRL-R pode estar implicada na resistência ao tratamento padrão-ouro com CAB.

## **REFERÊNCIAS**

- <sup>1</sup> CHANSON, P.; MAITER, D. The epidemiology, diagnosis and treatment of Prolactinomas: The old and the new. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 33, n. 2, p. 101290, 04 2019. ISSN 1878-1594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31326373> >.
- <sup>2</sup> VROONEN, L.; DALY, A. F.; BECKERS, A. Epidemiology and Management Challenges in Prolactinomas. **Neuroendocrinology**, v. 109, n. 1, p. 20-27, 2019. ISSN 1423-0194. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30731464> >.
- <sup>3</sup> COLAO, A. et al. Gender differences in the prevalence, clinical features and response to cabergoline in hyperprolactinemia. **Eur J Endocrinol**, v. 148, n. 3, p. 325-31, Mar 2003. ISSN 0804-4643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12611613> >.
- <sup>4</sup> MAZZIOTTI, G.; FRARA, S.; GIUSTINA, A. Pituitary Diseases and Bone. **Endocr Rev**, v. 39, n. 4, p. 440-488, 08 01 2018. ISSN 1945-7189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29684108> >.
- <sup>5</sup> MILLAR, R. P. et al. Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis Reactivation by Kisspeptin-10 in Hyperprolactinemic Women With Chronic Amenorrhea. **J Endocr Soc**, v. 1, n. 11, p. 1362-1371, Nov 01 2017. ISSN 2472-1972. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29264460> >.
- <sup>6</sup> GLEZER, A.; BRONSTEIN, M. D. Prolactinomas. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 44, n. 1, p. 71-8, Mar 2015. ISSN 1558-4410. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25732643> >.
- <sup>7</sup> DALY, A. F.; BECKERS, A. The Epidemiology of Pituitary Adenomas. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 49, n. 3, p. 347-355, 09 2020. ISSN 1558-4410. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32741475> >.
- <sup>8</sup> DI SARNO, A. et al. Resistance to cabergoline as compared with bromocriptine in hyperprolactinemia: prevalence, clinical definition, and therapeutic strategy. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 11, p. 5256-61, Nov 2001. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701688> >.
- <sup>9</sup> WEBSTER, J. et al. A comparison of cabergoline and bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. Cabergoline Comparative Study Group. **N Engl J Med**, v. 331, n. 14, p. 904-9, Oct 06 1994. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915824> >.
- <sup>10</sup> BRUE, T. et al. Effects of the dopamine agonist CV 205-502 in human prolactinomas resistant to bromocriptine. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 74, n. 3, p. 577-84, Mar 1992. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1346788> >.

- <sup>11</sup> PELLEGRINI, I. et al. Resistance to bromocriptine in prolactinomas. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 69, n. 3, p. 500-9, Sep 1989. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2760167> >.
- <sup>12</sup> GILLAM, M. P. et al. Advances in the treatment of prolactinomas. **Endocr Rev**, v. 27, n. 5, p. 485-534, Aug 2006. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16705142> >.
- <sup>13</sup> DELGRANGE, E. et al. Characterization of resistance to the prolactin-lowering effects of cabergoline in macroprolactinomas: a study in 122 patients. **Eur J Endocrinol**, v. 160, n. 5, p. 747-52, May 2009. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19223454> >.
- <sup>14</sup> MAITER, D. Management of Dopamine Agonist-Resistant Prolactinoma. **Neuroendocrinology**, v. 109, n. 1, p. 42-50, 2019. ISSN 1423-0194. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30481756> >.
- <sup>15</sup> MICKO, A. S. et al. Invasion of the cavernous sinus space in pituitary adenomas: endoscopic verification and its correlation with an MRI-based classification. **J Neurosurg**, v. 122, n. 4, p. 803-11, Apr 2015. ISSN 1933-0693. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25658782> >.
- <sup>16</sup> MELMED, S. et al. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 2, p. 273-88, Feb 2011. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296991> >.
- <sup>17</sup> MOLITCH, M. E. Management of medically refractory prolactinoma. **J Neurooncol**, v. 117, n. 3, p. 421-8, May 2014. ISSN 1573-7373. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24146188> >.
- <sup>18</sup> VROONEN, L. et al. Prolactinomas resistant to standard doses of cabergoline: a multicenter study of 92 patients. **Eur J Endocrinol**, v. 167, n. 5, p. 651-62, Nov 2012. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22918301> >.
- <sup>19</sup> BUENO, C. et al. Cabergoline and prolactinomas: lack of association between DRD2 polymorphisms and response to treatment. **Pituitary**, v. 20, n. 3, p. 295-300, Jun 2017. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27848079> >.
- <sup>20</sup> PASSOS, V. Q. et al. Genes differentially expressed in prolactinomas responsive and resistant to dopamine agonists. **Neuroendocrinology**, v. 89, n. 2, p. 163-70, 2009. ISSN 1423-0194. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18791324> >.
- <sup>21</sup> FILOPANTI, M. et al. Dopamine D2 receptor gene polymorphisms and response to cabergoline therapy in patients with prolactin-secreting pituitary

adenomas. **Pharmacogenomics J**, v. 8, n. 5, p. 357-63, Oct 2008. ISSN 1473-1150. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18332900> >.

22 SARI, R. et al. Treatment Strategies for Dopamine Agonist-Resistant and Aggressive Prolactinomas: A Comprehensive Analysis of the Literature. **Horm Metab Res**, v. 53, n. 7, p. 413-424, Jul 2021. ISSN 1439-4286. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34282593> >.

23 DELEMER, B. MEN1 and pituitary adenomas. **Ann Endocrinol (Paris)**, v. 73, n. 2, p. 59-61, Apr 2012. ISSN 2213-3941. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22542456> >.

24 DALY, A. F. et al. AIP and MEN1 mutations and AIP immunohistochemistry in pituitary adenomas in a tertiary referral center. **Endocr Connect**, v. 8, n. 4, p. 338-348, Apr 2019. ISSN 2049-3614. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30822274> >.

25 DELGRANGE, E.; DUPREZ, T.; MAITER, D. Influence of parasellar extension of macroprolactinomas defined by magnetic resonance imaging on their responsiveness to dopamine agonist therapy. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 64, n. 4, p. 456-62, Apr 2006. ISSN 0300-0664. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16584520> >.

26 KNOSP, E. et al. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. **Neurosurgery**, v. 33, n. 4, p. 610-7; discussion 617-8, Oct 1993. ISSN 0148-396X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8232800> >.

27 CACCAVELLI, L. et al. Decreased expression of the two D2 dopamine receptor isoforms in bromocriptine-resistant prolactinomas. **Neuroendocrinology**, v. 60, n. 3, p. 314-22, Sep 1994. ISSN 0028-3835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7969790> >.

28 \_\_\_\_\_. Alteration of G alpha subunits mRNA levels in bromocriptine resistant prolactinomas. **J Neuroendocrinol**, v. 8, n. 10, p. 737-46, Oct 1996. ISSN 0953-8194. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910802> >.

29 PEVERELLI, E. et al. Filamin-A is essential for dopamine d2 receptor expression and signaling in tumorous lactotrophs. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 3, p. 967-77, Mar 2012. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22259062> >.

30 MANGILI, F. et al. Beta-Arrestin 2 Is Required for Dopamine Receptor Type 2 Inhibitory Effects on AKT Phosphorylation and Cell Proliferation in Pituitary Tumors. **Neuroendocrinology**, v. 111, n. 6, p. 568-579, 2021. ISSN 1423-0194. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32512568> >.

31 BEN-JONATHAN, N.; HNASKO, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. **Endocr Rev**, v. 22, n. 6, p. 724-63, Dec 2001. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739329> >.

- 32 MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary gland development. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 1, n. 4, p. 533-57, 2012 Jul-Aug 2012. ISSN 1759-7692. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844349> >.
- 33 BIAGETTI, B.; SIMÒ, R. Molecular Pathways in Prolactinomas: Translational and Therapeutic Implications. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 20, Oct 18 2021. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34681905> >.
- 34 SAIARDI, A. et al. Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. **Neuron**, v. 19, n. 1, p. 115-26, Jul 1997. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9247268> >.
- 35 CRISTINA, C. et al. Dopaminergic D2 receptor knockout mouse: an animal model of prolactinoma. **Front Horm Res**, v. 35, p. 50-63, 2006. ISSN 0301-3073. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16809922> >.
- 36 DAL TOSO, R. et al. The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. **EMBO J**, v. 8, n. 13, p. 4025-34, Dec 1989. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2531656> >.
- 37 MARANO, R. J.; BEN-JONATHAN, N. Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. **Mol Endocrinol**, v. 28, n. 5, p. 622-33, May 2014. ISSN 1944-9917. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24694306> >.
- 38 BERNARD, V. et al. Autocrine actions of prolactin contribute to the regulation of lactotroph function in vivo. **FASEB J**, v. 32, n. 9, p. 4791-4797, 09 2018. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29596024> >.
- 39 HU, Z. Z. et al. Complex 5' genomic structure of the human prolactin receptor: multiple alternative exons 1 and promoter utilization. **Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2139-42, Jun 2002. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021177> >.
- 40 ABRAMICHEVA, P. A.; SMIRNOVA, O. V. Prolactin Receptor Isoforms as the Basis of Tissue-Specific Action of Prolactin in the Norm and Pathology. **Biochemistry (Mosc)**, v. 84, n. 4, p. 329-345, Apr 2019. ISSN 1608-3040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31228925> >.
- 41 KLINE, J. B.; ROEHRS, H.; CLEVINGER, C. V. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. **J Biol Chem**, v. 274, n. 50, p. 35461-8, Dec 10 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10585417> >.
- 42 BOLE-FEYSOT, C. et al. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice.

**Endocr Rev**, v. 19, n. 3, p. 225-68, Jun 1998. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9626554> >.

43 HU, Z. Z.; MENG, J.; DUFAU, M. L. Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. **J Biol Chem**, v. 276, n. 44, p. 41086-94, Nov 02 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518703> >.

44 TROTT, J. F. et al. Multiple new isoforms of the human prolactin receptor gene. **Adv Exp Med Biol**, v. 554, p. 495-9, 2004. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15384631> >.

45 BERNARD, V. et al. New insights in prolactin: pathological implications. **Nat Rev Endocrinol**, v. 11, n. 5, p. 265-75, May 2015. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25781857> >.

46 BROOKS, C. L. Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. **Endocr Rev**, v. 33, n. 4, p. 504-25, Aug 2012. ISSN 1945-7189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577091> >.

47 GOFFIN, V.; MARTIAL, J. A.; SUMMERS, N. L. Use of a model to understand prolactin and growth hormone specificities. **Protein Eng**, v. 8, n. 12, p. 1215-31, Dec 1995. ISSN 0269-2139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8869634> >.

48 SCHUFF, K. G. et al. Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms. **J Clin Invest**, v. 110, n. 7, p. 973-81, Oct 2002. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370275> >.

49 BUGGE, K. et al. A combined computational and structural model of the full-length human prolactin receptor. **Nat Commun**, v. 7, p. 11578, 05 2016. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27174498> >.

50 CICCARELLI, E. et al. Prolactin receptors in human pituitary adenomas. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 42, n. 5, p. 487-91, May 1995. ISSN 0300-0664. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7621567> >.

51 JIN, L. et al. Prolactin receptor messenger ribonucleic acid in normal and neoplastic human pituitary tissues. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 3, p. 963-8, Mar 1997. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9062514> >.

52 VERGANI, G.; MAYERHOFER, A.; BARTKE, A. Acute effects of rat growth hormone (GH), human GH and prolactin on proliferating rat liver cells in vitro: a study of mitotic behaviour and ultrastructural alterations. **Tissue Cell**, v. 26, n. 3, p. 457-65, Jun 1994. ISSN 0040-8166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8073420> >.

- 53 LEBRUN, J. J. et al. Prolactin-induced proliferation of Nb2 cells involves tyrosine phosphorylation of the prolactin receptor and its associated tyrosine kinase JAK2. **J Biol Chem**, v. 269, n. 19, p. 14021-6, May 13 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8188682> >.
- 54 ROBERTSON, F. G. et al. Prostate development and carcinogenesis in prolactin receptor knockout mice. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3196-205, Jul 2003. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810576> >.
- 55 SACKMANN-SALA, L.; GOFFIN, V. Prolactin-induced prostate tumorigenesis. **Adv Exp Med Biol**, v. 846, p. 221-42, 2015. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25472541> >.
- 56 GORVIN, C. M. The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. **J Clin Transl Endocrinol**, v. 2, n. 3, p. 85-91, Sep 2015. ISSN 2214-6237. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29204371> >.
- 57 CLEVINGER, C. V. et al. The role of prolactin in mammary carcinoma. **Endocr Rev**, v. 24, n. 1, p. 1-27, Feb 2003. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12588805> >.
- 58 GOFFIN, V.; TOURAINÉ, P. The prolactin receptor as a therapeutic target in human diseases: browsing new potential indications. **Expert Opin Ther Targets**, v. 19, n. 9, p. 1229-44, 2015. ISSN 1744-7631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26063597> >.
- 59 BEN-JONATHAN, N.; LAPENSEE, C. R.; LAPENSEE, E. W. What can we learn from rodents about prolactin in humans? **Endocr Rev**, v. 29, n. 1, p. 1-41, Feb 2008. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18057139> >.
- 60 KIYA, T. et al. Apoptosis and PCNA expression induced by prolactin in structural involution of the rat corpus luteum. **J Endocrinol Invest**, v. 21, n. 5, p. 276-83, May 1998. ISSN 0391-4097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9648048> >.
- 61 BIGNON, C. et al. Prolactin induces growth inhibition and promotes differentiation of CHO cells stably transfected with prolactin receptor complementary DNA. **FEBS Lett**, v. 358, n. 1, p. 84-8, Jan 16 1995. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7821436> >.
- 62 MARTINI, J. F. et al. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. **Mol Endocrinol**, v. 14, n. 10, p. 1536-49, Oct 2000. ISSN 0888-8809. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11043570> >.
- 63 KELLY, M. A. et al. Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. **Neuron**, v. 19, n. 1, p.

103-13, Jul 1997. ISSN 0896-6273. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9247267> >.

<sup>64</sup> ASA, S. L. et al. Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice. **Endocrinology**, v. 140, n. 11, p. 5348-55, Nov 1999. ISSN 0013-7227. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10537166> >.

<sup>65</sup> FERRARIS, J. et al. Prolactin receptor antagonism in mouse anterior pituitary: effects on cell turnover and prolactin receptor expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 3, p. E356-64, Feb 2012. ISSN 1522-1555. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094470> >.

<sup>66</sup> \_\_\_\_\_. Prolactin induces apoptosis of lactotropes in female rodents. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e97383, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24859278> >.

<sup>67</sup> BERNARD, V. et al. Natural and molecular history of prolactinoma: insights from a. **Oncotarget**, v. 9, n. 5, p. 6144-6155, Jan 2018. ISSN 1949-2553. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29464061> >.

<sup>68</sup> DE DIOS, N. et al. JAK2/STAT5 Pathway Mediates Prolactin-Induced Apoptosis of Lactotropes. **Neuroendocrinology**, v. 108, n. 2, p. 84-97, 2019. ISSN 1423-0194. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30376668> >.

<sup>69</sup> BOGORAD, R. L. et al. Identification of a gain-of-function mutation of the prolactin receptor in women with benign breast tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 38, p. 14533-8, Sep 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779591> >.

<sup>70</sup> COURTILLOT, C. et al. Characterization of two constitutively active prolactin receptor variants in a cohort of 95 women with multiple breast fibroadenomas. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 1, p. 271-9, Jan 2010. ISSN 1945-7197. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19897676> >.

<sup>71</sup> NEWAY, P. J. et al. Mutant prolactin receptor and familial hyperprolactinemia. **N Engl J Med**, v. 369, n. 21, p. 2012-2020, Nov 2013. ISSN 1533-4406. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24195502> >.

<sup>72</sup> KOBAYASHI, T. et al. Variant Prolactin Receptor in Agalactia and Hyperprolactinemia. **N Engl J Med**, v. 379, n. 23, p. 2230-2236, 12 06 2018. ISSN 1533-4406. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30575453> >.

<sup>73</sup> BERNARD, V. et al. Germline Prolactin Receptor Mutation Is Not a Major Cause of Sporadic Prolactinoma in Humans. **Neuroendocrinology**, v. 103, n. 6, p. 738-45, 2016. ISSN 1423-0194. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26641246> >.

- <sup>74</sup> GORVIN, C. M. et al. Association of prolactin receptor (PRLR) variants with prolactinomas. **Hum Mol Genet**, Nov 2018. ISSN 1460-2083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30445560> >.
- <sup>75</sup> ZHANG, D. et al. Effect of Everolimus in Treatment of Aggressive Prolactin-Secreting Pituitary Adenomas. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 104, n. 6, p. 1929-1936, 06 01 2019. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30624667> >.
- <sup>76</sup> KAVARTHAPU, R.; DUFAU, M. L. Prolactin receptor gene transcriptional control, regulatory modalities relevant to breast cancer resistance and invasiveness. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 13, p. 949396, 2022. ISSN 1664-2392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36187116> >.
- <sup>77</sup> BARCUS, C. E. et al. Dense collagen-I matrices enhance pro-tumorigenic estrogen-prolactin crosstalk in MCF-7 and T47D breast cancer cells. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0116891, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25607819> >.
- <sup>78</sup> XIAO, Z. et al. Estrogen receptor  $\alpha$ /prolactin receptor bilateral crosstalk promotes bromocriptine resistance in prolactinomas. **Int J Med Sci**, v. 17, n. 18, p. 3174-3189, 2020. ISSN 1449-1907. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33173437> >.
- <sup>79</sup> GEORGESCU, M. M.; WHIPPLE, S. G.; NOTARIANNI, C. M. Novel neoplasms associated with syndromic pediatric medulloblastoma: integrated pathway delineation for personalized therapy. **Cell Commun Signal**, v. 20, n. 1, p. 123, 08 17 2022. ISSN 1478-811X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35978432> >.



**Apêndice A.** Características clínicas e tumorais dos pacientes com prolactinoma em relação a resposta ao tratamento a cabergolina considerando como critério de resposta normalização de prolactina e redução tumoral >30%.

<b>Características</b>	<b>Resistentes (n=74)</b>	<b>Sensíveis (n=55)</b>	<b>Total (n=129)</b>	<b>P</b>
<b>Sexo</b>				-
(feminino: masculino)	60(81.1%): 14(18.9%)	40(72.7%): 15(27.3%)	100(77.5%): 29(22.5%)	0.26
<b>Ao diagnóstico</b>				
<b>Idade (anos)</b>	29.4±11.7	32.7±12.2	30.9 ±11.9	0.12
<b>PRL (ng/mL)</b>	180 (104-1060)	159.5 (91.5-353)	178.5 (97-500)	0.24
<b>Tamanho tumoral</b>				
<b>Maior diâmetro (mm)</b>	17.9±16	14.2±10.6	16.4±14.2	0.15
<b>Macro:micro</b>	42 (60.0%): 28 (40.0%)	31 (62.0%): 19 (38.0%)	73(60.8%): 47(39.2%)	0.82
<b>Knosp</b>				
<b>0</b>	43 (72.8%)	28 (73.6%)	71 (73.2%)	0.79
<b>1</b>	2 (3.4%)	2 (5.3%)	4 (4.1%)	
<b>2</b>	2 (3.4%)	0 (0.0%)	2 (2.1%)	
<b>3A</b>	3 (5.1%)	1 (2.6%)	4 (4.1%)	
<b>3B</b>	5 (8.5%)	5 (13.2%)	10 (10.3%)	
<b>4</b>	4 (6.8%)	2 (5.3%)	6 (6.2%)	
<b>Invasão</b>				
<b>não</b>	47 (79.7%)	30 (78.9%)	77 (79.4%)	0.91
<b>sim</b>	12 (20.3%)	8 (21.1%)	20 (20.6%)	
<b>PRL-R</b>				
<b>Selvagem</b>	46 (82.1%)	29 (74.4%)	75 (78.9%)	0.83
<b>Variante</b>	10 (17.9%)	10 (25.6%)	20 (21.1%)	

PRL: prolactina; macro: macroadenoma; micro: microadenoma.

### Apêndice B. Dados individualizados de cada paciente com prolactinoma avaliado.

ID	Sexo	Idade	Ao diagnóstico							Pós- tratamento com CAB									
			Variante PRLR	Amen.	Irreg.	Galact.	Libido	Cefal.	Alt. visual (ng/mL)	PRL (ng/mL)	MDT (mm)	Knosp	Apop.	MDT (mm)	Knosp	PRL maior (ng/mL)	CAB resposta	CAB dose max.	CAB tempo uso
1	M	23	p.Ile100Val			sim	sim	não		940	21		não	0	0	940	SE	0.5	168
2	M	26	p.Ile100Val			não	não	não	sim		50	3B	não	30	3B	1000	RE	3.5	72
3	M	14	p.Ile100Val			sim	não	sim	sim		30		não	16		6000	RE	3.5	90
4	F	27	p.Ile100Val	sim	não	sim	sim			700	13	0	não	6	0	700	SE	1.5	108
5	F	34	p.Ile100Val	sim	não	sim	não	não	não	98	7	0	não	4	0	98	SE	1.5	168
6	M	26	p.Ile100Val			não		sim		1100	16		não			1100	SE	2	85
7	F	33	p.Ile100Val	sim	não	sim	não	não	não		11	0	não	0	0	62	RE	2	
8	F	42	p.Ile100Val	não	não	sim	não	não	não		12		não	5	0	150	SE	0.5	92
9	F	39	p.Ile100Val	sim	não	sim	não	não	não	72	20		não	1.6	0	72	SE	7	168
10	M	29	p.Ile100Val				sim	sim	sim	2000	31	3A	não	24	3A	2000	RE	3.5	96
11	M	38	p.Ile100Val			não	sim	não		2254	30		não	0	0	2250	SE	2	
12	F	39	p.Ile100Val	não	sim	sim	não	não		107	9	0	não	8	0	107	SE	1.5	156
13	M	16	p.Ile100Val			não	não	sim	sim	1800	46		não	11	0	18000	RE	7	
14	F	17	p.Ile100Val	sim	não	sim	não	sim	não		30	3B	não	15	0	4633	RE	3.5	42
15	F	19	p.Ile100Val	sim	sim	sim	não	sim		1060	20		não			50	RE	3.5	
16	M	40	p.Ile100Val			não	sim	não		160	23	4	não	20	4	160	RE	3.5	77
17	F	37	p.Ile100Val	não	sim	não	não	não	não	164	12		não	4	0	164	SE	0.5	96
18*	F	18	p.Ile100Val	não	sim	não	não	não	não	300	11	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
19	M	20	p.Ile170Leu			não	não	sim	sim	9910	54		não	7	0	9900	RE	7	120
20	F	26	p.Ile170Leu	sim	não	sim	não	não		1084	46	3B	não	0	0	1084	RE	3.5	145
21	F	24	p.Ile170Leu	sim	sim	sim	sim	não		442	12	0	não	4	0	442	RE	3.5	108
22	F	28	p.Ile170Leu	sim	não	sim	não	sim	não	85	5	0	não	0	0	84	SE	1	62
23	F	36	p.Ile170Leu	sim	não	não	não	não	não		8	0	não	8	0	100	SE	0.5	
24	M	21	p.Ile170Leu			não	não	não	sim	2189	32		sim	0	0	2189	SE	2	111
25	F	38	p.Glu470Aap p.Glu400Gln/ p.Asn516Ile	não	sim	não	não	não	não	44	4	0	não	3	0	44	SE	0.25	96
26	F	24	p.Asn516Ile	sim	não	não	não	sim	não	312		0	não	0.8	0	312	RE	3.5	108
27	M	41	Asn516Ile			não	sim	sim	sim	270	15	0	não	8	0	270	SE	2	132
28	M	25	Asn516Ile			não	não	não	não	8200	35	1	não	0	0	8200	RE	3.5	168
29	F	30	p.Ala591Pro	não	sim	sim	não	não	não	248	12	0	não	3	0	248	SE	1	120
30	M	24				não	não	sim	sim		42		não	29		1500	RE	5.25	60
31	F	31		sim	não	sim	não	não	não	183			não	0	0	183	SE	1.5	168
32	F	33		não	sim	sim					13	0	não	7	0	200	SE	1.5	108
33	F	33		sim	não	sim	sim	não		179	22	0	não	0	0	179	RE	1	11
34	F	13		sim	não	não	não	não	sim	570	19			12	0	569.9	SE	2.5	132
35	M	51				não	sim	não	não		22		não	18		470	SE	2	84
36	F	39		sim	sim	sim	não	sim		315	17	3B	não	15	3B	315	SE	2.5	79
37	F	38		sim	não	não	não	não	não	57	5	0	não	4	0	57	SE	0.5	120
38	F	23		não	não	sim	não	não	não	127	8	0	não	0		127	SE	1	8
39	F	55		sim	não	não	não	não		390	20	0	não	15	0	390	SE	1	24
40	F	30		não	sim	sim	não	não	não	430	10		sim	0	0	430	SE	2.5	48
41	F	30		não	sim	sim	não	não	não	127	10	0	não	0	0	127	SE	0.5	84
42	F	26		sim	não	sim	não	não			18	0	não	10	2	100	SE	0.5	72
43	F	18		sim	não	sim	não	sim	sim	6890	40	4	não	0	0	6890	RE	7.5	108
44	M	30				não	sim	não	não	142	11	0	não	10	0	142	RE	3.5	140
45	F	23		sim	não	sim	não	não	não	1519	24	4	não	1.7		1519	RE	10	7
46	F	45		sim	não	sim	não	não		105	4	0	não	4	0	104	SE	1	108
47	F	21		sim	não	sim	sim	não		38		0	não	7	0	37	SE	1	50
48	F	35		sim	não	sim	não	não		169	12	0	não	0	0	52	RE	3.5	96
49	F	16		não	sim	não	não	sim		76		0	não	0	0	210	SE	0.375	96
50	F	26		sim	não	não				363	7	0	não	4	0	362.9	SE	1.25	132

## Apêndice B. Continuação.

ID	Sexo	Idade	Ao diagnóstico										Pós- tratamento com CAB						
			Variante PRLR	Amen.	Irreg.	Galact.	Libido	Cefal.	Alt. visual (ng/mL)	PRL	MDT (mm)	Knosp	Apop.	MDT (mm)	Knosp	PRL maior (ng/mL)	CAB resposta	CAB dose max.	CAB tempo uso
51	F	20		não	sim	sim	não	não		71	4	0	não	2	0	71	SE	0.5	108
52	F	16		sim	não	sim	não	não	não	270	12	0	não	0	0	270	RE	7	12
53	F	59		sim	não	não	não	não		614	20	3B	não	20	3B	600	SE	1.5	96
54	F	19		sim	não	sim	não	não		474	15		não	4	0	474	SE	2.5	180
55	M	58				não	sim	não		116	3.5	0	não	0	0	116	SE	1	36
56	F	24		não	sim	sim	não	não	não	135	8	0	não	5	0	134	SE	1	72
57	M	60				não	sim			840	16		não	13		879	SE	2	168
58	F	23		não	sim	não	não	não	não	561	11	0	sim	0	0	561	SE	0.5	216
59	M	19				não			sim	1120	43		não	8		1120	RE	3.5	180
60	F	20		não	sim	sim	não	sim	não	76	8	0	não	0	0	76	SE	1.5	72
61	F	21		não	sim	não	não	não		76	11	0	sim	5	0	76	SE	0.5	23
62	F	31		não	não	não	não	não			10	0	não	0.5	0	62	SE	2	120
63	F	41							não	100	6	0	não	0	0	99	SE	0.5	36
64	F	26		não	sim	sim	não	não		250	5	0	não	5	0	200	SE	0.5	17
65	F	24		não	não	sim	não	não		76	5	0	não	0	0	76	SE	1	190
66	F	23		sim	sim	não	não	não	não	1656	16	3B	não	13	3B	1656	SE	1	132
67	F	45		não	não	sim	não	não		71	5	0	não	5	0	70	SE	0.375	31
68	F	27		sim	não	sim	não	não		122	10		não	0	0	122	SE	2	180
69	F	31		sim	não	sim	não	não	não	232	6	0	não	3	0	232	SE	2	156
70	F	49		não	sim	sim	não	não	não	111	11	1	não	9	1	111	SE	1	55
71	F	30		sim	sim	sim	não	não		177	18		não	5	0	177	SE	1.5	36
72	M	33				não	sim	sim	não	79	8	0	não			86	SE	0.75	12
73	F	41		sim	não	sim	não	não	não	180		0	não	0	0	180	SE	1.5	168
74	F	31		não	sim	sim	não	não	não	178	16		não	0	0	200	SE	2	24
75	F	25		sim	não	sim	não	não	não	84	4	0	não	2	0	84	SE	0.5	138
76	M	60				não	não	não	não	68	8	0	não	5	0	67.9	SE	0.75	48
77	F	28		sim	não	sim				134	8	0	não	5	0	134	RE	3.5	45
78	F	33		não	não	sim	não	não		125	7		não	5	0	125	SE	1.5	17
79	F	29		não	não	sim				54	8.5	0	não	4		53	SE	0.5	26
80	F	41		não	sim	não	não	não		97	7	0		6	0	96	SE	0.5	36
81	F	24		sim	não	sim	não	não		1186	12	3A	não	15	3A	1186	SE	1	12
82	F	28		não	sim	não	não	não		1390	30		não	12	1	1390	RE	3.5	6
83	F	34		sim	não	não				180	11	0	não	0	0	180	SE	0.5	132
84	F	34		sim	não	sim	não	não		159	3	0	não	3	0	159	SE	1.5	17
85	M	58				não	não	não	sim	9674	90	4		60		9674	RE	7	156
86	F	32		não	não	não	não	não	não	25	5	0	não	6	0	60	SE	0.25	96
87	F	17		sim	não	sim	não	não		120	13	0	não	5	0	120	SE	0.5	156
88	F	42		sim	não	não	não	sim	não	180	8	0	não	6	0	180	SE	1	72
89	F	19		sim	não	sim	não	não	não	500	8	0	não	4	0	500	SE	1	96
90	F	23		não	não	sim	não	não	não	90	7	0	não	5	0	90	SE	0.25	144
91	F	32		não	não	não	não	não	não	62	3	0	não	3	0	62	SE	0.5	60
92	M	37				não	sim	sim	sim	1750	37		sim	15	1	1750	SE	2.5	264
93	F	45		não	não	não				109	10		não	8	0	129	SE	0.5	180
94	M	31				não	não	sim	não	6700	30	3B	não	25	3B	6700	RE	7	200
95	F	33		sim	não	sim	sim	não	não	120	12	3B	não	0.8	0	120	SE	0.5	108
96	F	13		sim	não	sim	não	sim		1883	25	3B	não	0	0	1880	RE	7	84
97	F	37		sim	não	sim	não	não		140	6	0	não	0	0	140	SE	1	156
98	F	16		sim	sim	não	sim	sim	sim	151	18	0	sim	0	0	151	SE	1	8
99	M	19				não	não	sim	sim			30	não	0	0	5	SE	1	108

## Apêndice B. Continuação.

ID	Sexo	Idade	Ao diagnóstico										Pós- tratamento com CAB						
			Variante PRLR	Amen.	Irreg.	Galact.	Libido	Cefal.	Alt. visual (ng/mL)	PRL (ng/mL)	MDT (mm)	Knosp	Apop.	MDT (mm)	Knosp	PRL maior (ng/mL)	CAB resposta	CAB dose max.	CAB tempo uso
100	F	20		não	não	sim	não	não	não	147	14	0	não	7	0	147	SE	1.5	168
101	F	29		sim	não	sim	não	não		238	19	0	não	11	0	238	SE	1.5	79
102	F	20		sim	não	sim	não	não		66	3	0	não	0	0	66	SE	0.5	8
103	F	33		sim	não	sim	não	não	não		7	0	não	6	0	200	SE	0.5	132
104	F	17		não	sim	não	não	não	não	115	11	0	não	0	0	115	RE	7	120
105	F	15		sim	não	sim	sim	sim	não	217	12	3A		3	0	217	SE	0.25	72
106	F	54		não	não	não	sim	sim	não	93	10	0	não	5	0	93	SE	0.25	60
107	F	13		não	sim	não				147	12	0	não	0	0	147	SE	1	24
108	M	27				não	sim	não	não	343	12	3A	não	8		343	SE	1.5	200
109	F	28		não	não	sim	não	sim		190	18	0	não	0	0	190	SE		
110	F	28		sim	sim	não	não	não	não	110	9	0	não	9		110	RE	3.5	8
111	F	42		sim	não	sim	não	não		70	8	0	não	9	0	70	SE	0.5	120
112	M	11				não	não	sim	não	1300	17	0	sim	0	0	1300	SE	3.5	160
113	F	18		sim	não	sim	não	não	não		8	0	não	4	0	300	SE	1	48
114	F	25		não	não	não	não	não		51	8	0	não	5	0	51	SE	0.5	20
115	F	30		não	sim	sim				209	17	3B	não	6	0	209	SE	1	48
116	F	34		não	sim	não	não	sim	não	115	8	0	não	3	0	115.2	SE	0.5	96
117	F	39		sim	não	sim	não	não	não	221	5	0	não	12		221	SE	1.5	40
118	F	26		sim	não	sim	não	sim		223	11	3A	não	11	3A	223	SE	1	72
119	F	23		sim	sim	não	não	não	não	210			não	0	0	210	SE	1.5	192
120	F	21		não	sim	não				166	8	0	não	0	0	166	SE	1	180
121	F	29		sim	não	sim	não	não	não	50	5	0	não	7	0	50	SE	1	108
122	F	16		sim	não	sim	não	não	sim	2440	34	4	não	12	4	2000	RE	3.5	7
123	F	17		sim	não	não	não	não	não	470	60		não	1.1		470	RE	7	29
124	M	34				não	sim			199	16	2	não	14	2	198.7	SE	1.5	14
125	M	28				não	sim	sim	sim	4808	39	3B	não	26	3B	4808	SE	3.5	30
126	F	38		sim	não	sim			não	564	30	3B	não	20	3B	564.1	SE	1	24
127	M	44				não	sim	sim	sim	572	11	0	não	4	0	572	SE	1	48
128	M	51				não	sim	não	não	86	11	0	não	10	0	86	SE	0.5	60
129	F	73				não	não	não	sim					27			RE	2.5	60
130	F	32		não	sim	não	não	não		80		0	não	0	0	80	SE	0.5	
131	F	17		sim	não	sim	não	não	sim	141	15	2	não	11	2	140	SE	1.5	24
132	F	36		sim	não	sim		não	não	57	2	0	não	0	0	57	SE	0.5	62
133	F	24		sim	sim	sim	sim	não		184	11	0	não	9	0	184	SE	1	84
134	F	34		sim	não	não	sim	sim	sim	6941	45	2	sim	0	0	6941	RE	3.5	36
135	F	16		sim	não	sim	não	não	não	320	12		não	11		320	RE	2.5	20
136	F	32		sim	não	sim	não	não			7	0	não			88	SE	0.5	12
137	F	37		não	sim	não	sim	sim	não	46	4	0	não	3	0		RE	3.5	36
138	F	40		sim	sim	sim	não	sim	não	63	9	0	não	3	0	63	SE	1	20
139	F	20		sim	sim	sim	não	sim	não	57	5	0	não	3	0	57	SE	0.5	84
140	F	37		não	não	sim	não	não	não		5	0	não	4	0		SE	0.5	72
141	F	27		sim	sim	sim	não	não	não	348	17	4	não	17	4	349	SE	1	84
142	M	69				não	não	sim	sim	5809	43	3A	não	25	3A	5809	SE	2	26
143	F			não	não	não	não	não			4	0	não	4			SE	1.5	
144	F	25		sim	sim	sim	não	sim			10		não	9		200	SE	1	8
145	F	38		não	não	sim						0	não	0	0	80.3	SE	0.75	60
146	F	29		sim	não	sim	não	não	não	327	8	0	não			326.8	RE	2	36
147	F	31		sim	sim	sim	não	não	não	70	7	0	não	5	0	122	SE	1.25	

## Apêndice B. Continuação.

ID	Sexo	Idade	Variante PRLR	Ao diagnóstico									Pós-tratamento com CAB						
				Amen.	Irreg.	Galact.	Libido	Cefal.	Alt. visual (ng/mL)	PRL	MDT (mm)	Knosp	Apop.	MDT (mm)	Knosp	PRL maior (ng/mL)	CAB resposta	CAB dose max.	CAB tempo uso
148	F	33		sim	não	sim	não	não		111	1.1	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
149	M	18				não	sim	sim		2700	10	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
150	F	35		não	não	sim	sim	sim		450	22		não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
151	F	25		sim	não	não	não	não	não	130	12	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
152	F	38												NA	NA	NA	NA	NA	NA
153	F	27		não	sim	não	não	não		56	5	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
154	M	20				não	sim	sim	sim	469			não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
155	F	24		não	não	não	não	não	não	70	5	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
156	F	41		sim	não	não	não	não		75	8	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
157	F	15		não	sim	sim	não	não	não	110	5	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
158	F	40		sim	não	sim	não	não	sim	2600				NA	NA	NA	NA	NA	NA
159	F	17		sim	não	sim	não	não		66		0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
160	F	37		sim	não	sim	sim	sim	não	172	10	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
161	F	21		sim	não	não	não	não		500	13			NA	NA	NA	NA	NA	NA
162	M	17				não	não	sim	sim			35		sim	NA	NA	NA	NA	NA
163	M	38				não	não	sim	sim				0	não	NA	NA	NA	NA	NA
164	F	35		sim	não	sim	não	não	não	71	5	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
165	F	26		sim	não	não	não	sim	não			35		não	NA	NA	NA	NA	NA
166	F	50		não	não	sim	não	não		41	6	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
167	F	21		não	não	sim	não	não		52	7			não	NA	NA	NA	NA	NA
168	M	21				não	não	sim	sim			22		sim	NA	NA	NA	NA	NA
169	F	26		sim	sim	não	não	não		1835	25			não	NA	NA	NA	NA	NA
170	F	48		não	não	sim	não	não		52	4	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
171	F	13		não	sim	sim	não	não	não	59	7	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
172	F	61		sim	não	não	não	não	sim	1943				não	NA	NA	NA	NA	NA
173	F	31		sim	não	sim	não	não	não			18	0	sim	NA	NA	NA	NA	NA
174	F	28		sim	não	não	não	não		280	6	0	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA
175	F	23		sim	não	sim	não	sim		476	17	2	sim	NA	NA	NA	NA	NA	NA
176	F	42		não	não	não	não	sim						NA	NA	NA	NA	NA	NA
177	F	25		não	não	sim	não	não						NA	NA	NA	NA	NA	NA
178	M	22				não	não	sim	não	80	45	4	não	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Amen: amenorreia; Apop: Apoplexia; Irreg: irregularidade menstrual; Galact: galactorreia; Cefal: cefaleia; Alt: alteração visual; PRL: prolactina; MDT: maior diametro tumoral; CAB: cabergolina; Max: máxima; NA: não se aplica.



**ANEXO A****HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DA PESQUISA**

**Título da pesquisa:** Estudo do gene do receptor de prolactina em pacientes com prolactinoma: correlação de suas variantes com a resposta aos agonistas dopaminérgicos.

**Pesquisador responsável:** Dr. Marcello Delano Bronstein

**Instituição:** Serviço de Clínica Geral da Divisão de Clínica Médica I do Instituto Central – ICHC

Convidamos o (a) Sr(a) para participar da pesquisa: “Estudo do gene do receptor de prolactina em pacientes com prolactinoma: correlação de suas variantes com a resposta aos agonistas dopaminérgico” Você **é livre para decidir se quer participar ou não do estudo.**

**1 DESENHO E OBJETIVOS DO ESTUDO:**

Prolactinoma são tumores da hipófise que produzem o hormônio prolactina. O excesso da prolactina no organismo leva a alterações do ciclo menstrual e infertilidade nas mulheres e problemas sexuais e infertilidade nos homens. O principal tratamento para esses tumores são os medicamentos chamados Agonistas dopaminérgicos, que temos disponível a cabergolina e a bromocriptina. Sendo que a cabergolina é a mais utilizada por ter melhor eficácia e tolerância. Porém, alguns pacientes não respondem bem a esses medicamentos e precisam de outros tratamentos como cirurgia. Esse estudo será feito para buscar alguma alteração genética nos pacientes que não respondem bem que possa justificar isso, correlacionando as possíveis alterações encontradas com o grau de resposta e os níveis de prolactina.

**2 DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS:**

Sua participação consiste em realizar a coleta de sangue nos períodos definidos em consulta médica, no laboratório da instituição, através de punção simples (com agulha) de uma veia de seu antebraço. Durante a coleta de sangue, você poderá sentir um pequeno desconforto (como uma picada). Após a coleta, poderá aparecer no local da picada uma mancha roxa, inchaço ou, em casos raros, infecção. Estas alterações devem desaparecer em um dia. Os resultados da análise do seu material estarão disponíveis para você a qualquer momento. Para este estudo, além dos exames de sangue, será coletada amostra do seu tumor durante o ato cirúrgico, indicado para o tratamento da doença.

<b>Projeto:</b> Estudo do gene receptor de prolactina em pacientes com prolactinoma: correlação de suas variantes com a resposta aos agonistas dopaminérgicos	<b>Confidencial</b>
<b>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> versão 1.0, 05 de maio de 2021.	

**Pesquisador Responsável:** Marcello Delano Bronstein  
Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP

\_\_\_\_\_  
Rubrica do Participante da  
Pesquisa/Representante legal

\_\_\_\_\_  
Rubrica do Pesquisador  
Responsável

### 3 DESCONFORTOS E RISCOS DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA:

Não haverá desconfortos da pesquisa, pois os dados serão coletados em consultas de rotina e obtidos dos registros de prontuários.

### 4 BENEFÍCIOS PARA O PARTICIPANTE:

Durante a realização da pesquisa, não haverá nenhum benefício direto para o participante, pois se trata de estudo que avalia características laboratoriais decorrentes do tratamento proposto. No entanto, a análise destes dados poderá permitir no futuro uma melhor indicação do tipo de tratamento, bem como um potencial auxílio no desenvolvimento de novas opções de tratamento.

### 5 ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA PARA OS PARTICIPANTES:

Os participantes da pesquisa serão acompanhados clinicamente no ambulatório de referência em prolactinoma do ICHC a cada 3 a 4 meses, ou a critério do pesquisador responsável. Após término da pesquisa os mesmos continuarão seguindo no referido serviço. Ao participante fica garantida, também, assistência imediata e/ou integral, durante todas as fases da pesquisa, tanto pela Instituição quanto pelos pesquisadores envolvidos, bem como sua indenização, diante eventuais danos e complicações diretos ou indiretos decorrentes da pesquisa, previstos ou não no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### 6 GARANTIA DE LIBERDADE E DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE:

**É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.** As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. É compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. No futuro, caso surjam novas pesquisas, o material colhido somente será analisado após o seu consentimento e a assinatura de um novo consentimento. Toda nova pesquisa só será realizada com aprovação do sistema CEP – CONEP, que são os órgãos que fiscalizam a ética em pesquisa

### 7 DIREITO DE SER MANTIDO ATUALIZADO SOBRE OS RESULTADOS:

Em qualquer momento você poderá ser atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

**Projeto:** Estudo do gene receptor de prolactina em pacientes com prolactinoma: correlação de suas variantes com a resposta aos agonistas dopaminérgicos

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** versão 1.0, 05 de maio de 2021.

**Pesquisador Responsável:** Marcello Delano Bronstein  
Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP

Confidencial

	Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal	Rubrica do Pesquisador Responsável
--	--	---------------------------------------

## 8 DESPESAS E COMPENSAÇÕES:

Você não terá despesas pessoais para participar do estudo incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

## 9 GARANTIA DE ACESSO:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é Dr. Marcello Delano Bronstein que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155 - Cerqueira César, São Paulo, 5o andar, bloco 4 e/ou pelo Telefone(s) (11) 2661-7845 (horário comercial).

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: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: [cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br)

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Estudo do gene do receptor de prolactina em pacientes com prolactinoma: correlação de suas variantes com a resposta aos agonistas dopaminérgicos”. Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Dr. Marcello Delano Bronstein ou pessoa (s) por ele delegada (s) Dra Andrea Ramos de Castro Moreira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante /representante legal

-----

Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo

-----

Data / /

<b>Projeto:</b> Estudo do gene receptor de prolactina em pacientes com prolactinoma: correlação de suas variantes com a resposta aos agonistas dopaminérgicos	<b>Confidencial</b>
<b>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> versão 1.0, 05 de maio de 2021.	
	_____

**Pesquisador Responsável:** Marcello Delano Bronstein  
Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP

\_\_\_\_\_  
—  
**Rubrica do Participante da  
Pesquisa/Representante legal**

**Rubrica do Pesquisador  
Responsável**