

THAIS CHILE

**Análise da expressão dos genes *CRABP1*, *CRABP2*, *GRP* e
RERG em adenomas hipofisários funcionantes e clinicamente
não funcionantes**

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. Ricardo Rodrigues Giorgi

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Chile, Thais

Análise da expressão dos genes *CRABP1*, *CRABP2*, *GRP* e *REG* em adenomas hipofisários funcionantes e clinicamente não funcionantes / Thais Chile. -- São Paulo, 2009.

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

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientador: Ricardo Rodrigues Giorgi.

Descritores: 1.Neoplasias hipofisárias 2.Expressão gênica 3.Proteínas de ligação do ácido retinóico 4.Peptídeo liberador de gastrina 5.Proteínas de ligação a GTP

USP/FM/SBD-372/09

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, exemplos de fé e perseverança, por me ensinarem a sonhar e a persistir em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

A Deus, fonte de sabedoria, pela força, iluminação e por nunca deixar faltar coragem em minha caminhada.

Aos meus pais, José Roberto e Auzenir, pelo amor incondicional, dedicação e incentivo.

Ao meu irmão, Felipe, pelo afeto e apoio demonstrados.

Aos meus avós, José (*in memoriam*) e Aramita, pelo carinho e preocupação durante esta jornada.

Às amigas Maria Auxiliadora Higa e Patrícia Lopes Pereira por, simplesmente, existirem em minha vida.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi, pelos ensinamentos, apoio e esforço demonstrados durante o desenvolvimento deste trabalho e pela confiança em mim depositada.

À bióloga Maria Angela Zanella Fortes pela colaboração fundamental neste estudo, pela amizade e pelos momentos de descontração que tornaram meus dias mais alegres.

À biomédica Ana Mercedes Cavaleiro pela convivência e incentivo.

À Profª Drª Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannela, responsável pelo Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM25), pelo estímulo, boa vontade e colaboração durante o trabalho.

À Divisão de Neurocirurgia e à Unidade de Neuroendocrinologia do Hospital as Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela permissão na obtenção das amostras tumorais.

A todos os integrantes do LIM25 pelo carinho com o qual me receberam.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram na elaboração deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro durante estes anos.

“Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento”.

Clarice Lispector

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Hipófise.....	2
1.2 Tumores hipofisários.....	4
1.2.1 Bases moleculares.....	6
1.2.1.1 Ativação de proto-oncogenes.....	6
1.2.1.2 Genes supressores tumorais.....	9
1.2.1.3 Expressão gênica.....	11
2 OBJETIVOS.....	19
3 MÉTODOS.....	21
3.1 Casuística.....	21
3.2 Coleta do material.....	21
3.3 Extração e quantificação de RNA.....	22

3.4 RT-qPCR em tempo real.....	24
3.5 Sequenciamento.....	33
3.6 Imuno-histoquímica.....	38
3.6.1 Hidratação e bloqueio.....	38
3.6.2 Recuperação antigênica.....	38
3.6.3 Incubação com os anticorpos primários e secundários.....	39
3.6.4 Revelação.....	39
3.7 Análise estatística.....	40
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Análise da expressão do transcrito nos diferentes subtipos de tumores hipofisários.....	43
4.1.1 Expressão do RNAm do gene <i>CRABP1</i>	43
4.1.2 Expressão do RNAm do gene <i>CRABP2</i>	46
4.1.3 Expressão do RNAm do gene <i>GRP</i>	51
4.1.4 Expressão do RNAm do gene <i>REG</i>	54
4.2 Análise da expressão protéica nos diferentes subtipos de tumores hipofisários.....	59
5 DISCUSSÃO.....	61
5.1 Expressão diferencial do RNA mensageiro entre os diferentes subtipos de tumores hipofisários.....	61
5.1.1 <i>CRABPs</i>	61
5.1.1.1 <i>CRABP1</i>	63

5.1.1.2 <i>CRABP2</i>	65
5.1.2 <i>GRP</i>	68
5.1.3 <i>REG</i>	70
5.2 Dissociação entre a expressão do transcrito e a expressão protéica.....	73
6 CONCLUSÕES.....	77
7 ANEXOS.....	79
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

Lista de Abreviaturas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
<i>BAG1</i>	<i>Bcl2-associated athanogene</i>
<i>bFGF</i>	Fator de crescimento de fibroblastos básico (<i>Basic fibroblast growth factor</i>)
<i>BRS3</i>	Receptor bombesina-símile subtipo 3 (<i>Bombesin-like receptor 3</i>)
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CAPPESQ	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
<i>CRABP1</i>	Proteína de ligação ao ácido retinóico celular 1 (<i>Cellular retinoic acid binding protein 1</i>)
<i>CRABP2</i>	Proteína de ligação ao ácido retinóico celular 2 (<i>Cellular retinoic acid binding protein 2</i>)
CRABPs	Proteínas de ligação ao ácido retinóico celular
C _T	ciclo limiar (<i>threshold cycle</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
<i>FGF2</i>	Fator de crescimento de fibroblastos 2 (<i>Fibroblast growth factor 2</i>)

<i>FGF4</i>	Fator de crescimento de fibroblastos 4 <i>(Fibroblast growth factor 4)</i>
<i>FR-α</i>	Receptor de folato- α <i>(Folate receptor-alpha)</i>
FS	Células foliculo-estelares
FSH	Hormônio foliculo-estimulante
GADD45 γ	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma</i>
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase <i>(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)</i>
GH	Hormônio do crescimento
<i>GNAS1</i>	Proteína de ligação ao nucleotídeo guanina (proteína G), subunidade α <i>(Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha stimulating activity polypeptide 1)</i>
<i>GRP</i>	Peptídeo liberador de gastrina <i>(Gastrin-releasing peptide)</i>
<i>GRPR</i>	Receptor do peptídeo liberador de gastrina <i>(Gastrin-releasing peptide receptor)</i>
GTPase	Guanosina trifosfatase
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

<i>HPRT1</i>	Hipoxantina fosforibosil transferase (<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>)
<i>LAPTM4B</i>	Proteína transmembrana associada ao lisossomo (<i>Lysosomal-associated protein transmembrane-4-β</i>)
LH	Hormônio luteinizante
LOH	Perda de heterozigose
M	Molar
MEN-1	Neoplasia endócrina múltipla tipo 1
MEN1	Neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (gene) (<i>Multiple endocrine neoplasia 1</i>)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
<i>MT3</i>	Metalotioneína 3 (<i>Metallothionein 3</i>)
NF-	Adenomas hipofisários não funcionantes negativos para imuno-histoquímica
NF+	Adenomas hipofisários não funcionantes positivos para imuno-histoquímica
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
<i>NMB</i>	Neuromedina B (<i>Neuromedin B</i>)

<i>NMBR</i>	Receptor de neuromedina B <i>(Neuromedin B receptor)</i>
°C	Graus Celsius
<i>p16</i>	Inibidor de quinase dependente de ciclina <i>(Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)</i>
<i>p18</i>	Inibidor de quinase dependente de ciclina <i>(Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C)</i>
pb	Pares de bases
pmol	picomol
PRL	Prolactina
<i>PTTG</i>	Gene transformador de tumor hipofisário <i>(Pituitary tumor transforming gene)</i>
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RA	Ácido retinóico
<i>RAR</i>	Receptor de ácido retinóico <i>(Retinoic acid receptor)</i>
RARE	Elemento responsivo ao ácido retinóico
<i>RERG</i>	<i>RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA _{se}	Ribonuclease
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase pós-transcrição reversa

RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa
<i>RXR</i>	<i>Receptor X retinóide</i> (<i>Retinoid X receptor</i>)
<i>siRNA</i>	RNA de interferência (<i>small interfering RNA</i>)
SVO	Serviço de Verificação de Óbitos
TSH	Hormônio tireoestimulante
µg	micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

- Figura 1.** Gel representativo dos RNAs isolados dos tumores hipofisários demonstrando a integridade do material analisado. As setas indicam as subunidades 28S e 18S dos RNAs ribossomais.....23
- Figura 2.** Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *CRABPI*, *GAPDH* e *HPRT1*. O primeiro gráfico demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *CRABPI* e *GAPDH*; o segundo, por sua vez, demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *CRABPI* e *HPRT1*. Em ambos os casos, a inclinação da reta foi inferior a 0,1, indicando eficiências de amplificação semelhantes.....28
- Figura 3.** Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *GRP*, *GAPDH* e *HPRT1*. O primeiro gráfico demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *GRP* e *GAPDH*; o segundo, por sua vez, demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *GRP* e *HPRT1*. Em ambos os casos, a inclinação da reta foi inferior a 0,1, indicando eficiências de amplificação semelhantes.....29
- Figura 4.** Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *REG*, *GAPDH* e *HPRT1*. O primeiro gráfico demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *REG* e *GAPDH*; o segundo, por sua vez, demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *REG* e *HPRT1*. Em ambos os casos, a inclinação da reta foi inferior a 0,1, indicando eficiências de amplificação semelhantes.....30

Figura 5. Avaliação da eficiência de amplificação dos genes <i>CRABP2</i> , <i>GAPDH</i> e <i>HPRT1</i> . O primeiro gráfico demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes <i>CRABP2</i> e <i>GAPDH</i> ; o segundo, por sua vez, demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes <i>CRABP2</i> e <i>HPRT1</i> . Em ambos os casos, a inclinação da reta foi superior a 0,1, indicando eficiências de amplificação discrepantes e, portanto, a utilização do método descrito por Pfaffl.....	31
Figura 6. Gráficos demonstrando as curvas de dissociação para os genes <i>CRABP1</i> , <i>CRABP2</i> , <i>GRP</i> , <i>REG</i> , <i>GAPDH</i> e <i>HPRT1</i>	32
Figura 7. Gel de agarose 2% demonstrando o produto da RT-PCR em tempo real dos genes <i>CRABP1</i> , <i>CRABP2</i> , <i>GRP</i> , <i>REG</i> , <i>GAPDH</i> e <i>HPRT1</i>	33
Figura 8. Cromatograma demonstrando o sequenciamento dos genes <i>CRABP1</i> e <i>CRABP2</i>	35
Figura 9. Cromatograma demonstrando o sequenciamento dos genes <i>GRP</i> e <i>REG</i>	36
Figura 10. Cromatograma demonstrando o sequenciamento dos genes <i>GAPDH</i> e <i>HPRT1</i>	37
Figura 11. Expressão de RNAm do gene <i>CRABP1</i> nos diferentes grupos tumorais hipofisários, na metástase do carcinoma e no conjunto de tecidos hipofisários normais. A , indica valores de expressão normalizados por <i>GAPDH</i> ; B , indica valores de expressão normalizados por <i>HPRT1</i> . NF - tumores não funcionantes; GH - tumores secretores de GH; ACTH - tumores secretores de ACTH; PRL - tumores secretores de prolactina, HN - tecido hipofisário normal, CA - metástase do carcinoma hipofisário não funcionante.....	44

Figura 12. Expressão diferencial de RNAm do gene *CRABP1* entre o subgrupo tumoral secretor de prolactina (PRL) e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,05$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,0233$).....45

Figura 13. Expressão de RNAm do gene *CRABP2* nos diferentes grupos tumorais hipofisários, na metástase do carcinoma e no conjunto de tecidos hipofisários normais. **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH*; **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1*. **NF** - tumores não funcionantes; **GH** - tumores secretores de GH; **ACTH** - tumores secretores de ACTH; **PRL** - tumores secretores de prolactina, **HN**- tecido hipofisário normal, **CA** - metástase do carcinoma hipofisário não funcionante.....47

Figura 14. Expressão diferencial de RNAm do gene *CRABP2* entre o grupo de adenomas funcionantes (F) e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,0039$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,0005$).....48

Figura 15. Expressão diferencial de RNAm do gene *CRABP2* entre o subgrupo tumoral secretor do hormônio do crescimento (GH) e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,0052$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,0019$).....49

Figura 16. Expressão diferencial de RNAm do gene *CRABP2* entre o subgrupo tumoral secretor de prolactina (PRL) e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,0068$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,0043$).....50

Figura 17. Expressão de RNAm do gene *GRP* nos diferentes grupos tumorais hipofisários, na metástase do carcinoma e no conjunto de tecidos hipofisários normais. **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH*; **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1*. **NF** - tumores não funcionantes; **GH** - tumores secretores de GH; **ACTH** - tumores secretores de ACTH; **PRL** - tumores secretores de prolactina, **HN** - tecido hipofisário normal, **CA** - metástase do carcinoma hipofisário não funcionante.....52

Figura 18. Expressão diferencial de RNAm do gene *GRP* entre o grupo de adenomas clinicamente não funcionantes (NF) e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* (p=0,0012); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* (p=0,0009).....53

Figura 19. Expressão de RNAm do gene *RERG* nos diferentes grupos tumorais hipofisários, na metástase do carcinoma e no conjunto de tecidos hipofisários normais. **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH*; **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1*. **NF** - tumores não funcionantes; **GH** - tumores secretores de GH; **ACTH** - tumores secretores de ACTH; **PRL** - tumores secretores de prolactina, **HN**-tecido hipofisário normal, **CA** - metástase do carcinoma hipofisário não funcionante.....55

Figura 20. Expressão diferencial de RNAm do gene *RERG* entre o grupo de adenomas clinicamente não funcionantes (NF) e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* (p=0,0072); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* (p=0,05).....56

Figura 21. Expressão de RNAm do gene *REG* no grupo adenomas clinicamente não funcionantes (NF) de pacientes do sexo feminino e no conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,06$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,1607$).....57

Figura 22. Expressão diferencial de RNAm do gene *REG* entre o grupo de adenomas clinicamente não funcionantes (NF) de pacientes do sexo masculino e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,0005$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,0041$).....58

LISTA DE TABELAS

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Amplímeros utilizados para a amplificação dos genes.....25

Tabela 2 - Resumo dos dados anatomopatológicos e demográficos dos pacientes portadores dos diferentes subtipos de tumores hipofisários.....42

RESUMO

Resumo

Chile, T. Análise da expressão dos genes *CRABP1*, *CRABP2*, *GRP* e *REG* em adenomas hipofisários funcionantes e clinicamente não funcionantes [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 106p.

Os tumores hipofisários representam cerca de 10% a 15% das neoplasias intracranianas. Embora a etiopatogenia ainda não seja plenamente caracterizada, muitos mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese hipofisária já foram desvendados. Utilizando-se da metodologia de arranjos de cDNA contendo aproximadamente 20.000 genes, nosso grupo recentemente comparou a expressão de duas condições distintas: um *pool* de quatro adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e a metástase de um carcinoma hipofisário não funcionante. Vários genes mostraram-se diferencialmente expressos, entre eles, *CRABP1* (*cellular retinoic acid binding protein 1*), *CRABP2* (*cellular retinoic acid binding protein 2*), *GRP* (*gastrin-releasing peptide*) e *REG* (*RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor*). Este estudo visou avaliar a expressão desses quatro genes em uma série de 59 adenomas hipofisários (30 adenomas clinicamente não funcionantes, 13 somatotrofinomas, 8 corticotrofinomas e 8 prolactinomas), comparando cada grupo tumoral com um conjunto de tecidos hipofisários normais. Enquanto os prolactinomas demonstraram expressão reduzida do RNAm dos genes *CRABP1* e *CRABP2* quando comparados ao grupo de tecidos normais, os somatotrofinomas apresentaram expressão reduzida apenas do RNAm de *CRABP2*.

Os adenomas clinicamente não funcionantes, por sua vez, demonstraram menor expressão do RNAm de *GRP* e maior expressão do RNAm de *REG* quando comparados ao grupo de hipófises normais. Portanto, observou-se que tanto o gene *CRABP1* quanto os genes *CRABP2*, *GRP* e *REG* apresentaram diferenças na expressão do transcrito entre os grupos de adenomas de hipófise, contudo, seu papel na tumorigênese hipofisária permanece a ser investigado.

Descritores: neoplasias hipofisárias; expressão gênica; proteínas de ligação do ácido retinóico; peptídeo liberador de gastrina; proteínas de ligação a GTP.

SUMMARY

Summary

Chile T. Analysis of CRABP1, CRABP2, GRP and RERG gene expression in functioning and clinically nonfunctioning pituitary adenomas [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 106p.

Pituitary tumors account for approximately 10%-15% of the intracranial neoplasms. Although the pathogenesis is not fully characterized, many molecular mechanisms involved in pituitary tumorigenesis have been unraveled. Using the methodology of cDNA microarray containing approximately 20000 genes, our group recently compared the expression of two distinct conditions: a pool of four clinically nonfunctioning pituitary adenomas and a spinal cord metastasis of a nonfunctioning pituitary carcinoma. Several genes were shown to be differentially expressed, among them, CRABP1 (cellular retinoic acid binding protein 1), CRABP2 (cellular retinoic acid binding protein 2), GRP (gastrin-releasing peptide) and RERG (RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor). This study aimed to evaluate the expression of these four genes in a series of 59 pituitary adenomas (30 nonfunctioning, 13 GH-secreting, 8 ACTH-secreting and 8 PRL-secreting adenomas), comparing each tumor group with a set of normal pituitary tissues. While PRL-secreting adenomas showed lower expression of CRABP1 and CRABP2 mRNA when compared with normal tissues, GH-secreting adenomas had only lower expression of CRABP2 mRNA. Clinically nonfunctioning adenomas showed lower expression of GRP mRNA and higher expression of RERG mRNA when

compared with the normal pituitary glands. Therefore, it was observed that not only the CRABP1 gene but also the CRABP2, GRP and RERG genes showed differences in transcript expression between the groups of pituitary adenomas. However, their role in pituitary tumorigenesis remains to be investigated.

Descriptors: pituitary neoplasms; gene expression; retinoic acid binding proteins; gastrin-releasing peptide; GTP-binding proteins.

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Hipófise

A hipófise, uma pequena glândula situada na sela túrcica e conectada ao hipotálamo pela haste hipofisária, mede cerca de 12 a 15 milímetros no seu maior diâmetro (transversal), 8 a 10 milímetros no plano sagital e 5 a 7 milímetros no plano vertical. Essa glândula ocupa cerca de 75% da sela normal e é dividida em dois lobos com origens embriológicas distintas, o lobo anterior, também conhecido como hipófise anterior ou adeno-hipófise, constituindo 80% do volume total da glândula; e o lobo posterior, também designado hipófise posterior ou neuro-hipófise (Valença et al., 2005).

Quase toda a secreção da hipófise é controlada por sinais nervosos, ou hormonais, procedentes do hipotálamo. Nessas condições, enquanto a secreção da hipófise posterior é controlada por sinais nervosos que originam-se no hipotálamo e terminam nesta porção da glândula; a secreção da hipófise anterior é regulada por hormônios de liberação ou inibição hipotalâmicos, secretados pelo próprio hipotálamo e, a seguir, transportados até a hipófise anterior por meio dos vasos porta hipotalâmico-hipofisários. Na hipófise anterior, esses hormônios de liberação ou inibição atuam sobre as células glandulares para controlar sua secreção (Guyton e Hall, 2002).

Os hormônios da hipófise posterior são sintetizados por neurônios denominados magnocelulares, cujos corpos celulares localizam-se nos núcleos supra-óptico e paraventricular hipotalâmicos e os axônios estendem-se até alcançarem a neuro-hipófise,

onde os peptídeos são secretados nos capilares sanguíneos e armazenados em grânulos neurosecretórios (Valença et al., 2002).

Em contraste à descrição acima, a hipófise anterior é composta por cinco grandes tipos celulares nomeados de acordo com os hormônios tróficos que produzem. São eles: corticotrófos, células produtoras do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); tireotrófos, células produtoras do hormônio tireoestimulante (TSH); gonadotrófos, células produtoras do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo-estimulante (FSH); somatotrófos, células produtoras do hormônio do crescimento (GH); e lactotrófos, células produtoras de prolactina (PRL). Uma pequena população de mamossomatotrófos também existe, a qual produz tanto GH quanto PRL (Yeung et al., 2006).

Cabe destacar que as células hormonais da hipófise anterior, isto é, as células produtoras de hormônios, estão associadas a um tipo celular não-hormonal composto por células denominadas folículo-estelares (FS), as quais possuem atividade fagocitária e podem estar associadas à regulação das demais células hipofisárias por comunicação intercelular ou por ação parácrina, uma vez que produzem muitas citocinas e fatores de crescimento (Danila et al., 2000; Devnath e Inoue , 2008).

As células da hipófise anterior são altamente diferenciadas e destinadas, muito precocemente durante o desenvolvimento, a sintetizar produtos hormonais únicos. Os somatotrófos representam o maior tipo celular do lobo, constituindo aproximadamente 50% da população celular, seguido pelos lactotrófos (10-25%), corticotrófos (10-20%), tireotrófos (10%) e gonadotrófos (10%) (Yeung et al., 2006).

1.2 Tumores hipofisários

Os tumores hipofisários são adenomas monoclonais e representam 10% a 15% das neoplasias intracranianas. Embora benignos e raramente metastáticos, podem apresentar comportamento invasivo estando associados à alta morbidade e mortalidade (Kovacs e Horvarth, 1987; Herman et al., 1990; Faglia, 1993).

A classificação dos adenomas hipofisários é baseada não só em suas características funcionais, mas também em suas características morfológicas. Estas neoplasias são denominadas funcionantes quando produzem hormônios em quantidade suficiente para induzir manifestações clínicas, compreendendo, em ordem decrescente de frequência, os tumores lactotróficos (prolactinomas), tumores somatotróficos (somatotrofinomas), tumores adrenocorticotróficos (corticotrofinomas) e os tumores produtores de hormônios glicoprotéicos (gonadotrofinomas e tirotrofinomas). Os tumores hipofisários também podem produzir mais de um hormônio, sendo mais frequente a associação de hormônio do crescimento e prolactina. As neoplasias hipofisárias que não secretam quantidades mensuráveis de hormônios intactos para a circulação, não levando, portanto, ao quadro de hipersecreção hormonal, são denominadas adenomas clinicamente não secretores ou “não funcionantes”. Morfologicamente, os tumores hipofisários são classificados como microadenomas e macroadenomas. Geralmente, os microadenomas são adenomas circunscritos à sela túrcica com diâmetro inferior a 10 milímetros, já os macroadenomas apresentam diâmetro igual ou superior a 10 milímetros, podendo ser circunscritos à sela túrcica; expansivos, quando ultrapassam os limites da sela; ou, invasivos, quando infiltram estruturas vizinhas (Bronstein e Melmed, 2005).

Embora não existam diferenças histológicas características entre adenomas não invasivos e adenomas invasivos, os últimos apresentam crescimento mais rápido, provocam erosão selar e infiltram estruturas adjacentes. O grau de invasão tumoral nem sempre é facilmente caracterizado, uma vez que os adenomas hipofisários não possuem cápsula, sendo envolvidos por células adeno-hipofisárias e rede de reticulina condensada pertencentes ao lobo anterior não-adenomatoso. Desta forma, ainda que os macroadenomas sejam mais associados com invasão dural, os microadenomas também podem ser invasivos (Scheithauer et al., 1986).

Os adenomas hipofisários originam-se na hipófise anterior, acometendo um ou mais tipos celulares, e são responsáveis por síndromes clínicas características: os prolactinomas, que secretam PRL, acarretam galactorréia e hipogonadismo; os somatotrofinomas, que produzem GH, levam à acromegalia ou gigantismo; e, finalmente, os corticotrofinomas, que hipersecretam ACTH, levam à doença de Cushing. Raramente, os adenomas hipofisários produzem TSH, LH ou, também, FSH. Como já mencionado, podem também ser pluri-hormonais, onde a co-secreção mais comum é a de PRL e GH (Asa e Ezzat, 2002 ; Melmed, 2003).

Aproximadamente 25% a 30% das neoplasias da hipófise não cursam com síndromes clínicas de hipersecreção hormonal, caracterizando os chamados tumores não funcionantes. No entanto, apesar de considerados não funcionantes, estes tumores podem secretar subunidades hormonais ou hormônios em quantidade insuficiente para detecção na corrente sanguínea, todavia, podem ser evidenciados por métodos de imunohistoquímica no tecido tumoral (Asa e Kovacs, 1992; Asa et al., 1992; Katznelson et al, 1993).

Mais raramente ocorre a formação de carcinomas hipofisários, ou seja, tumores hipofisários que, por definição, apresentam metástase crânio-espinhal e/ou sistêmica. A maioria desses tumores ocorre no quadro de recorrências múltiplas de adenomas hipofisários invasivos (Ragel e Couldwell, 2004; Lopes et al., 2005).

1.2.1 Bases moleculares

O entendimento sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela formação e progressão dos adenomas hipofisários ainda permanece incompleto, contudo, algumas informações têm sido acumuladas nos últimos anos. Foi demonstrado, por inativação do cromossomo X, que os adenomas hipofisários possuem origem monoclonal (Herman et al., 1990). Assim, embora um papel permissivo do hipotálamo não possa ser desconsiderado, as evidências apontam um mecanismo hipofisário primário para o desenvolvimento tumoral, como a replicação de uma única célula mutada na qual a vantagem de proliferação resulta ou da ativação de um proto-oncogene ou da inativação de genes supressores tumorais (Melmed, 2003).

1.2.1.1 Ativação de proto-oncogenes

Proto-oncogenes são genes que codificam proteínas envolvidas no controle da proliferação e diferenciação celular, como os transdutores de sinais que atuam acoplados aos receptores transmitindo sinais para o núcleo celular. Um dos transdutores de sinais mais estudados é a proteína G, que controla a síntese de AMP cíclico (cAMP). Mutações na proteína G eliminam sua atividade de GTPase intrínseca aumentando os níveis de cAMP, o qual irá ativar proteínas quinases dependentes de cAMP, que através de uma

cascata de fosforilação, ativarão outras moléculas sinalizadoras, causando desregulação na proliferação celular .

Uma das anormalidades mais específicas já relatadas e associadas à etiopatogenia genética dos adenomas hipofisários foi a observação de que aproximadamente 40% dos adenomas secretores de GH (Spada et al., 1990), 10% dos adenomas não funcionantes (Williamson et al., 1994) e 6% dos adenomas secretores de ACTH (Williamson et al., 1995) apresentam uma mutação de ponto no gene que codifica a subunidade α da proteína G (*GNAS1*), impedindo, por conseguinte, a formação do complexo $\alpha\beta\gamma$ inativo e o controle da proliferação celular. Substituições de aminoácidos no códon 201, ou menos frequentemente, no códon 227, foram identificadas em uma série de adenomas secretores de GH caracterizados por atividade de adenilato ciclase e níveis de cAMP extremamente elevados (Landis et al., 1990).

Embora a presença de mutações na proteína G possa ser considerada um mecanismo significativo na tumorigênese dos somatotrofinomas, sua importância clínica não permite considerá-la como evento único na tumorigênese hipofisária, porquanto são infrequentes em outros subtipos de adenomas hipofisários.

Se por um lado as proteínas G representam a classe trimérica de GTPases, por outro, as proteínas codificadas pelo gene *RAS* representam a classe monomérica. Dessa maneira, os três genes funcionais pertencentes à família *RAS*, *H-RAS*, *K-RAS* e *N-RAS*, codificam uma proteína que se liga ao nucleotídeo de guanina e possui atividade de GTPase, regulando, em última análise, a proliferação e diferenciação celular. As mutações do gene *RAS* são detectadas em uma variedade de tumores humanos, incluindo carcinomas de pâncreas, cólon, pulmão, tireóide e leucemia mielóide. A maioria dessas

mutações são representadas por substituições de aminoácidos nos códons 12, 13 e 61, as quais convertem o proto-oncogene *RAS* em oncogene ativo, afetando a função de GTPase da proteína codificada. Um estudo com 19 adenomas hipofisários, funcionantes e não funcionantes, identificou uma mutação no códon 12 do gene *H-RAS* com substituição do aminoácido glicina por valina em um prolactinoma recorrente e altamente invasivo (Karga et al., 1992). Mutações de ponto no gene *H-RAS* também foram observadas em 3 de 5 metástases à distância, mas não em seus respectivos carcinomas hipofisários primários ou em seis adenomas invasivos (Pei et al., 1994). Este oncogene pode, portanto, ter um papel na indução ou manutenção de metástases à distância, todavia, um estudo com 78 tumores hipofisários, entre eles, seis carcinomas, não detectou nenhuma alteração no gene *H-RAS* (Cai et al., 1994).

O gene *PTTG* (*pituitary tumor transforming gene*) foi originalmente isolado de células GH4 de tumor hipofisário de rato e mostrou ter capacidade transformante tanto *in vitro* quanto *in vivo*, induzindo a formação de tumores (Pei e Melmed, 1997). A expressão do homólogo humano, que localiza-se no cromossomo 5q33 e codifica uma proteína de 199 aminoácidos, foi observada não só em tecidos normais, entre eles, testículo, timo, cólon e intestino, como também em diversas linhagens celulares malignas humanas, havendo uma correlação positiva entre a expressão de *PTTG* e o grau de agressividade em tumores de cólon (Zhang et al., 1999a; Heaney et al., 2000). Adenomas hipofisários testados por RT-PCR demonstraram expressão aumentada de *PTTG* quando comparados aos tecidos hipofisários normais, havendo, inclusive, correlação positiva entre o grau de expressão e o grau de invasão tumoral em prolactinomas e somatotrofinomas (Zhang et al., 1999b). Um dos mecanismos propostos

para a atividade transformante desse gene é o seu papel na indução da expressão do fator de crescimento de fibroblastos básico (*bFGF*), um potente ativador da proliferação celular e da angiogênese (McCabe et al., 2003).

1.2.1.2 Genes supressores tumorais

A neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (MEN-1) é uma desordem autossômica dominante caracterizada pela ocorrência de tumores em paratireóides, pâncreas e hipófise anterior. O gene *MEN1*, envolvido nesta síndrome, localiza-se no cromossomo 11q13, apresenta 10 éxons e codifica uma proteína de 610 aminoácidos nomeada menina, a qual possui localização predominantemente nuclear e participa da regulação da transcrição e do controle da estabilidade genômica (Lemmens et al., 1997; Chandrasekharappa et al., 1997; Guru et al., 1998).

Mais de 90% dos pacientes portadores de MEN-1 apresentam mutações germinativas em heterozigose na região codificadora ou nas junções exon-intrônicas do gene que codifica a proteína menina, contudo, a caracterização fenotípica dessas mutações só é evidenciada após uma deleção somática no segundo alelo, fato, este, que corrobora o modelo dos dois eventos Knudson (1971), no qual o indivíduo herda um alelo mutante e uma nova mutação causa perda da função do alelo remanescente, favorecendo o desenvolvimento tumoral. Na neoplasia endócrina múltipla tipo 1, o segundo evento de Knudson envolve, tipicamente, a perda de heterozigose (LOH) na região cromossômica 11q13, a qual também é observada em 30% dos adenomas hipofisários esporádicos (Bates et al., 1997). No entanto, neste último caso, mutações no gene *MEN1* esclarecem apenas algumas das ocorrências, o que implica o envolvimento

de outro gene, distinto daquele codificador de menina, mas também localizado na região 11q13, na tumorigênese hipofisária.

Satta et al. (1999), em estudo com 23 adenomas hipofisários esporádicos não associados à MEN-1 (4 prolactinomas, 11 somatotrofinomas e 8 adenomas não funcionantes), avaliaram a expressão do RNA mensageiro do gene codificador da proteína menina e não identificaram qualquer alteração quando os tumores foram comparados aos tecidos hipofisários normais; de modo semelhante, ASA et al. (1998) relataram a expressão equivalente de RNA mensageiro entre adenomas hipofisários esporádicos e tecidos hipofisários normais, com exceção de dois casos, nos quais a expressão de RNA mensageiro foi reduzida quando comparada àquela observada em outros adenomas e na glândula normal. Esses achados sustentam a evidência da existência de um gene adicional na região cromossômica 11q13, que estaria envolvido na patogênese das neoplasias hipofisárias esporádicas.

Em contrapartida, McCabe et al. (1999) estudaram a expressão do RNA mensageiro do gene *MEN1* em adenomas hipofisários de vários subtipos e evidenciaram o aumento de sua expressão nos adenomas não funcionantes e produtores de GH, sugerindo que mudanças na expressão pré-traducional representam apenas eventos secundários da formação ou desenvolvimento tumoral, ou, talvez, sejam resultado da maior estabilidade ou menor degradação da molécula de RNA mensageiro, por um mecanismo ainda desconhecido.

Recentemente, foi relatado, pela primeira vez, a ausência de um gene supressor de tumor na maioria dos tumores hipofisários secretores e não secretores. Este gene,

denominado *GADD45 γ* , é membro de uma família de genes que são induzidos por dano ao DNA e atuam na regulação negativa da proliferação celular (Zhang et al., 2002).

Bahar et al. (2004), buscando confirmar a perda de expressão do gene *GADD45 γ* em adenomas hipofisários, determinaram que 67% dos tumores estudados (22 de 33) não o expressavam em análise por RT-PCR, achado, este, que não foi associado à perda de heterozigose ou mutações dentro da região codificadora do gene, mas à metilação de ilhas CpG, a qual foi significativamente relacionada aos tumores nos quais o transcrito de *GADD45 γ* não foi expresso (82%, 18 de 22). Portanto, o silenciamento de *GADD45 γ* por metilação pode, provavelmente, conferir uma vantagem de crescimento seletiva durante a evolução tumoral.

1.2.1.3 Expressão gênica

De acordo com os relatos supracitados, alterações na expressão gênica estão presentes em alguns dos eventos enfocados, sendo a redução da expressão de *p16*, um inibidor de quinase dependente de ciclina envolvido no controle do ciclo celular, mais um exemplo da modulação de expressão encontrada nos adenomas hipofisários. Woloschak et al. (1996) demonstraram não só a ausência da proteína *p16* em 25 tumores hipofisários estudados por *Western blot*, como também níveis reduzidos ou não detectáveis de RNA mensageiro (RNAm) em 13 dos 14 tumores analisados por RT-PCR. Machiavelli et al. (2008) observaram o mesmo evento ao analisar a expressão de RNA mensageiro do gene *p16* em 46 adenomas de hipófise (21 clinicamente não funcionantes, 12 somatotrofinomas, 6 prolactinomas, 6 corticotrofinomas e 1 tirotrofinoma), evidenciando ausência de detecção em 62% dos adenomas não

funcionantes, 8% dos somatotrofinomas, 17% dos prolactinomas e 17% dos corticotrofinomas.

Por algum tempo, a análise da expressão foi desenvolvida para genes individuais, entretanto, novas perspectivas em relação ao processo neoplásico têm advindo do emprego de técnicas avançadas que permitem a análise da expressão gênica em larga escala. Estas técnicas foram capazes de identificar padrões de expressão gênica inesperados e possibilitaram a definição de diferenças fenotípicas clinicamente relevantes em vários tipos de tumores humanos que foram indistinguíveis por exame histopatológico tradicional. Tal abordagem pode fornecer um sistema molecular de classificação dos tumores humanos que permitirá maior exatidão no diagnóstico, prognóstico e predição de respostas terapêuticas.

Com base nisso, Evans et al. (2001) utilizaram microarranjos de cDNA (*microarray*) para comparar os perfis de expressão de 7075 genes entre hipófise normal e os diferentes subtipos de adenomas hipofisários, isto é, adenomas não funcionantes, adenomas secretores de prolactina, adenomas secretores de hormônio do crescimento e adenomas secretores de hormônio adrenocorticotrófico. Entre os 128 genes que mostraram-se diferencialmente expressos com o dobro ou maior magnitude em relação à hipófise normal, os pesquisadores identificaram três genes candidatos (receptor de folato, ornitina descarboxilase e C-mer) que foram unicamente expressos em cada um dos subtipos tumorais e que já haviam sido implicados na oncogênese de outras neoplasias. A expressão diferencial foi, posteriormente, comprovada por RT-qPCR em uma série de 32 amostras tumorais (10 adenomas hipofisários não funcionantes, 7

adenomas secretores de PRL, 8 adenomas secretores de GH e 7 adenomas secretores de ACTH) e 5 hipófises normais.

De acordo com a análise do grupo, enquanto o gene do receptor para folato (*FR- α*) foi superexpresso em adenomas não funcionantes e subexpresso em prolactinomas e somatotrofinomas, o gene da ornitina descarboxilase foi superexpresso em somatotrofinomas e subexpresso em corticotrofinomas. O proto-oncogene C-mer, por sua vez, foi superexpresso em corticotrofinomas, mas subexpresso em prolactinomas.

Apesar da falta de hipersecreção hormonal clínica em tumores não funcionantes, marcação para hormônios revela evidências de expressão hormonal em até 79% destes tumores, que são referidos como positivos por imuno-histoquímica (NF+). Os tecidos remanescentes são negativos para a expressão hormonal e são referidos como negativos por imuno-histoquímica (NF-). Dessa maneira, para complementar o estudo citado anteriormente, que revelou superexpressão do RNA mensageiro do gene *FR α* em tumores NF-, Evans et al. (2003) utilizaram a técnica de RT-qPCR para avaliar a expressão do RNA mensageiro do mesmo gene em adenomas hipofisários NF+.

Neste estudo, a expressão de RNA mensageiro permaneceu limitada aos tumores não funcionantes, não sendo observada em adenomas secretores de hormônios ou tecido hipofisário normal. A expressão foi variável, com os adenomas NF+ exibindo uma faixa maior de expressão (5-71 vezes maior do que os controles) em relação aos tumores NF- (3-39 vezes maior do que os controles).

A proteína *FR- α* expressou-se em todas as células tumorais de adenomas não funcionantes por análise imuno-histoquímica, não havendo diferença significativa no padrão de marcação entre os adenomas NF- e NF+. No entanto, a comparação dos níveis

de expressão de RNA mensageiro e proteína revelou uma relação distinta entre tais parâmetros nos adenomas NF+ e NF- quando empregada a técnica de Western blotting. Assim, se por um lado a forte correlação encontrada em amostras NF+ indica que o nível de mensagem determina a quantidade de proteína produzida por estes adenomas, por outro, a produção de RNA mensageiro aumentada não resulta em aumento correspondente na expressão da proteína FR α nos adenomas NF-, sugerindo que a tradução, ou algum outro processo pós-traducional necessário para produzir FR α maduro, seja limitado em amostras NF- (Evans et al., 2003).

Moreno et al. (2005) também empregaram a técnica de *microarray* para investigar o perfil de expressão gênica de 11 adenomas hipofisários não funcionantes, comparando-os com 8 glândulas hipofisárias normais. Esta técnica, que foi posteriormente validada por RT-qPCR, identificou não só o aumento na expressão de 115 genes, como também a redução na expressão de 169. Além disso, a análise do perfil de expressão gênica entre os adenomas não funcionantes positivos e negativos para marcação hormonal identificou genes com expressão alterada unicamente em cada subtipo.

Em busca da identificação de genes diferencialmente expressos, Morris et al. (2005) utilizaram a técnica de *microarray* para analisar a expressão gênica em adenomas hipofisários. Entre os genes que demonstraram-se diferencialmente expressos, *LAPTM4B* (*lysosomal-associated protein transmembrane-4- β*), *BAG1* (*BCL2-associated athanogene*) e *p18* foram selecionados para validação por RT-qPCR, estando a escolha vinculada à potencial importância em tumorigênese. O gene *LAPTM4B* foi significativamente superexpresso em adenomas secretores de ACTH e adenomas não

funcionantes, enquanto a superexpressão do gene *BAG1* estendeu-se também aos somatotrofinomas. O gene *p18*, por outro lado, foi subexpresso em adenomas secretores de ACTH.

Jackson et al. (2006) mostraram que *FGF4* (*fibroblast growth factor 4*), mas não *FGF2* (*fibroblast growth factor 2*), estimula a síntese de DNA e proliferação celular em células GH4, uma vez que a análise microarray revelou que *FGF4* induziu expressão de vários oncogenes, receptores de fatores de crescimento e proteínas de controle de ciclo celular, enquanto *FGF2* não apresentou nenhum efeito ou regulou negativamente estes mesmos genes. Estas respostas transcricionais são consistentes com um papel proliferativo e/ou tumorigênico para *FGF4* versus um efeito inibitório de crescimento para *FGF2*.

Análise por *microarray* identificou 726 genes expressos diferencialmente entre prolactinomas e glândulas hipofisárias normais, enquanto a análise proteômica identificou 4 proteínas com expressão elevada e 19 com expressão reduzida. Em conjunto, o perfil de expressão e a análise proteômica identificaram traços moleculares únicos para prolactinomas que podem contribuir para sua patogênese (Evans et al., 2008).

Recentemente, nosso grupo, utilizando-se da metodologia de arranjos de cDNA contendo aproximadamente 20.000 genes, comparou a expressão simultânea de duas situações distintas, a mistura de quatro adenomas hipofisários não funcionantes contra a metástase de um carcinoma hipofisário não funcionante. Vários genes mostraram-se diferencialmente expressos, dentre os quais, o gene da metalotioneína 3 (*MT3*), que foi observado mais expresso no *pool* de quatro adenomas hipofisários não funcionantes em

relação a metástase do carcinoma hipofisário. A expressão desse gene foi investigada em uma série de 52 adenomas hipofisários dos vários subtipos com intuito de identificar um padrão de agressividade ou possíveis marcadores moleculares. Assim, foi possível observar, de forma significativa, a maior expressão do gene da metalotioneína 3 (*MT3*) nos adenomas secretores de ACTH e nos tumores não funcionantes em relação aos adenomas produtores de PRL e GH (Giorgi et al., 2005).

Além do gene da metalotioneína 3, outros 79 genes mostraram-se diferencialmente expressos, com diferenças que variavam entre 2,5 e 5 vezes nas duas situações analisadas. À luz desses achados, aventa-se a possibilidade da participação de outros genes candidatos na formação ou desenvolvimento dos adenomas hipofisários dos diferentes subtipos.

Sendo assim, este estudo visou avaliar a magnitude de expressão de quatro genes, observados diferencialmente expressos entre as duas condições mencionadas, em sessenta tumores hipofisários dos vários subtipos. Os genes foram escolhidos levando-se em consideração o aumento ou a diminuição entre 2,5 e 5,0 vezes na expressão gênica, bem como seu envolvimento em outras neoplasias. São eles: *CRABP1* (*cellular retinoic acid binding protein 1*), *CRABP2* (*cellular retinoic acid binding protein 2*), *GRP* (*gastrin-releasing peptide*) e *RERG* (*RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor*).

Os genes *CRABP1* e *CRABP2* codificam proteínas de baixo peso molecular cujas funções ainda não estão bem estabelecidas. Enquanto algumas evidências apontam *CRABP1* como uma proteína envolvida no catabolismo do ácido retinóico (Boylan e Gudas, 1991; Boylan e Gudas, 1992), outras destacam o gene que a codifica como um supressor tumoral (Huang et al., 2003). A proteína *CRABP2*, por sua vez, aumenta a

ativação transcricional mediada por ácido retinóico regulando os efeitos antiproliferativos desse composto (Jing et al., 1997).

O terceiro gene envolvido neste estudo, denominado *GRP*, codifica um peptídeo que regula numerosas funções do trato gastrointestinal e sistema nervoso central, incluindo liberação de hormônios gastrointestinais, contração de músculo liso e proliferação celular (Bunnett, 1994). Além disso, está envolvido em alguns cânceres humanos como câncer de pulmão, cólon, estômago, pâncreas, mama e próstata (Patel et al., 2006).

Por fim, o gene *REG* parece atuar como um gene supressor tumoral (Finlin et al., 2001), todavia, apresenta expressão gênero-dependente em carcinoma hepatocelular (Wang et al., 2006).

OBJETIVOS

2 Objetivos

Esta investigação teve como objetivo avaliar a magnitude de expressão dos genes *CRABP1*, *CRABP2*, *GRP* e *REG* em adenomas hipofisários funcionantes e clinicamente não funcionantes.

MÉTODOS

3 Métodos

3.1 Casuística

A casuística desse trabalho foi composta por 60 amostras de tumores hipofisários classificados da seguinte maneira: 30 adenomas clinicamente não funcionantes, 29 adenomas funcionantes (13 adenomas secretores de GH, 8 adenomas secretores de ACTH e 8 adenomas secretores de PRL) e uma única metástase de carcinoma não funcionante, além de 5 tecidos hipofisários normais.

As amostras foram obtidas após a ressecção cirúrgica dos tumores dos pacientes internados sob a supervisão da Unidade de Neuroendocrinologia do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Os tecidos hipofisários normais foram obtidos no Serviço de Verificação de Óbito (SVO) do HCFMUSP mediante autópsia de indivíduos com 8 horas pós-morte e sem alterações endócrinas (**Anexo A**).

Este estudo foi submetido e aprovado pela CAPESQ (**Anexo B**). Os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo C**).

3.2 Coleta do material

Os tecidos tumorais e as amostras normais foram obtidos imediatamente após ressecção cirúrgica e autópsia, respectivamente; armazenados em tubos criogênicos de 2mL contendo 1mL de *RNAlater*[®] (*Ambion, Inc., Austin, TX, USA*) e acondicionados em geladeira (4°C), por um período máximo de uma semana, até o processamento.

3.3 Extração e quantificação de RNA

O RNA total foi isolado não só dos tecidos tumorais, mas também dos tecidos hipofisários normais. Para a extração, foi utilizada uma solução de fenol e isotiocianato de guanidina denominada *TRIzol® Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)*, que representa uma melhoria para o método de isolamento de RNA de fase única desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987).

Inicialmente, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e pulverizadas no aparelho *Mikro-Dismembrator U (B. Braun Biotech International, Melsungen, Hesse, Germany)*. Ao tecido pulverizado foi adicionado 1mL de *TRIzol® Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)*. Após homogeneização por pipetagem, a mistura foi transferida para um tubo *ependorf* estéril de 1,5mL e incubada em temperatura ambiente por um período de 5 minutos. Concluída a incubação, adicionou-se 200µL de clorofórmio à solução, a qual foi, em seguida, agitada vigorosamente em *Vortex Genie® 2T (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA)* por 15 segundos; mais uma vez incubada em temperatura ambiente, agora por 3 minutos; e centrifugada nas seguintes condições, 12000xg por 15 minutos a 4°C.

Posteriormente, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo *ependorf* estéril de 1,5mL e o RNA precipitado com 500µL de álcool isopropílico. A mistura foi deixada em repouso durante 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugada nas mesmas condições supracitadas, com exceção do período de tempo, que foi modificado para 10 minutos. O sobrenadante foi removido e ao botão de RNA acrescido 1mL de etanol 75% para lavagem. Depois da homogeneização em *Vortex*

Genie[®] 2T (*Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA*) e centrifugação nas grandezas de 7500xg, 5 minutos e 4°C, o botão de RNA foi solubilizado em água livre de RNAses.

As amostras foram conservadas em freezer -70°C até o momento do uso, contudo, antes do armazenamento, a concentração de RNA total de cada uma delas foi determinada em espectrofotômetro *NanoDrop*[®] ND-1000 (*NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA*) pela absorbância das preparações a 260 nanômetros (nm), utilizando como valor padrão 1DO = 40µg/mL de RNA. Além disso, o grau de pureza e a integridade do RNA também foram avaliados, o primeiro pela relação 260/280nm, que deve ser superior a 1,8 para ácidos nucleicos, e, o segundo, por eletroforese em gel de agarose 1,0% (**Figura 1**).

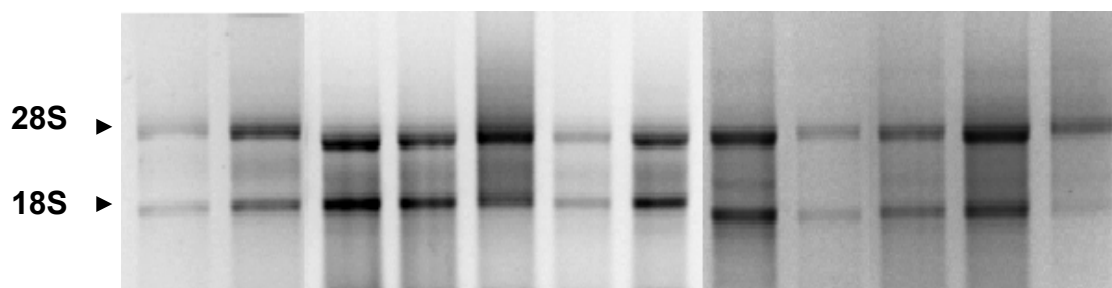


Figura 1. Gel representativo dos RNAs isolados dos tumores hipofisários demonstrando a integridade do material analisado. As setas indicam as subunidades 28S e 18S dos RNAs ribossomais.

3.4 RT-qPCR em tempo real

Em função da alta sensibilidade e por permitir a quantificação seja de transcritos raros, seja de pequenas mudanças na expressão gênica, a RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é a técnica de escolha para analisar a expressão de RNA mensageiro derivado de várias fontes. Esta técnica possibilita a aferição da quantidade de um produto amplificado a cada ciclo da reação em cadeia da polimerase.

As reações foram realizadas no equipamento *Rotor-Gene™ 6000* (Corbett Research, Sydney, NSW, Australia), utilizando-se o estojo comercial *SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR kit* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), conforme recomendado pelo fabricante, mas com algumas modificações, como demonstrado a seguir:

SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix	0,5 µL
2X SYBR® Green Reaction Mix	12,5 µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	1,0 µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	1,0 µL
RNA total (30 ng/µL)	1,0 µL
Água estéril q.s.p.	25,0 µL

Os oligonucleotídeos empregados nas reações foram obtidos com o auxílio do programa Primer 3 (Rozen e Skaletsky, 2000) e encontram-se na **Tabela 1**. Esses amplímeros foram sintetizados em diferentes éxons, para evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico.

Tabela 1 – Amplímeros utilizados para a amplificação dos genes.

Gene	Oligonucleotídeos		Tamanho do fragmento em pares de base (pb)
	Senso	Antisenso	
CRABP1	TGT GAA CGC CAT GCT GAG	CTC ACG GGT CCA GTA GGT TT	268 bases
CRABP2	CGG AAA ACT TCG AGG AAT TG	CAT CCA CAG TCT GCT CCT CA	198 bases
GRP	TTC TGA GAG AGG GAG CCT GA	ACG TTG AGA ACC TGG AGC AG	232 bases
RERG	CTT GCA GAG GAC CGT AGC TC	ATT CCC AGA TGA ACC GTT TG	261 bases
GAPDH	GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC	GCA GGG ATG ATG TTC TGG AG	281 bases
HPRT1	TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA	GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT	96 bases

A reação para cada gene analisado foi cuidadosamente padronizada a fim de evitar amplificação inespecífica, obedecendo as seguintes condições: 50°C por 15 minutos; 95°C por 5 minutos; 45 ciclos consecutivos de 95°C por 20 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; 72°C por 5 minutos. Os genes *GAPDH* e *HPRT1* foram utilizados como controles internos endógenos. Enquanto que para amplificar o gene *GAPDH* utilizou-se o mesmo padrão de ciclagem citado anteriormente, para o gene *HPRT1* foi alterada apenas a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos para 60°C.

Os valores quantitativos foram obtidos pelos valores de C_T (“*threshold cycle*”), ou ciclo limiar, no qual o aumento do sinal associado à fase exponencial de amplificação do

produto de PCR começa a ser detectado. O cálculo matemático utilizado para aferir a expressão dos genes analisados foi uma variação do método de Livak e Schmittgen (2001) definida como $2^{-\Delta C_T}$ (Lattuada et al., 2008) ou o método descrito por Pfaffl (2001), levando-se em consideração a eficiência de amplificação dos genes no estudo.

Nesse contexto, para a quantificação relativa dos produtos de amplificação, foi efetuada a análise da eficiência de amplificação dos genes alvos e dos controles internos. Para isso, foram realizadas curvas com diluições seriadas do RNA do tecido hipofisário normal, partindo-se de 500ng de RNA e fazendo-se uma diluição seriada de 1:5, com até 5 pontos, para cada um dos genes estudados. Cada uma das diluições foi amplificada por RT-qPCR tanto para os genes alvos quanto para os genes endógenos.

Para a utilização do método proposto por Livak e Schmittgen (2001), as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene endógeno devem ser aproximadamente iguais. Um modo sensível para assegurar que os diferentes oligonucleotídeos possuem a mesma eficiência é observar como o ΔC_T (C_T alvo – C_T endógeno) varia com a diluição da amostra. A diferença é plotada contra o logaritmo da concentração inicialmente colocada. Se a inclinação da reta (*slope*) for menor que 0,1, as eficiências de amplificação são comparáveis e o modelo matemático descrito por Livak e Schmittgen (2001) pode ser empregado. Por outro lado, quando as eficiências não são comparáveis, o modelo matemático utilizado é o descrito por Pfaffl (2001), no qual a taxa de expressão relativa (R) é baseada na seguinte equação:

$$R = \frac{(\text{Eficiência}_{\text{alvo}})^{C_T (\text{amostra controle} - \text{amostra teste})}}{(\text{Eficiência}_{\text{endógeno}})^{C_T (\text{amostra controle} - \text{amostra teste})}}$$

$$\text{Eficiência} = -1 + (10^{-1/\text{slope}})$$

Portanto, para avaliar a expressão gênica por RT-qPCR em tempo real, determinou-se, anteriormente, a eficiência de amplificação para cada um dos genes de interesse, a qual foi comparada à eficiência de amplificação dos genes endógenos (*GAPDH* e *HPRT1*) com a intenção de definir o método matemático ideal para análise dos dados de expressão. Como demonstrado nas **Figuras 2, 3 e 4**, a eficiência de amplificação dos genes *CRABP1*, *GRP* e *REG* foram comparáveis àquelas do gene *GAPDH* e do gene *HPRT1*, visto que a inclinação da reta foi menor que 0,1, permitindo, assim, a utilização da variável do método matemático descrito por Livak e Schmittgen (2001), descrita como $2^{-\Delta C_T}$ (Lattuada et al., 2008). Por outro lado, quando comparado aos controles *GAPDH* e *HPRT1*, o gene *CRABP2* não demonstrou eficiência de amplificação semelhante (**Figura 5**), conduzindo à utilização do método matemático descrito por Pfaffl (2001).

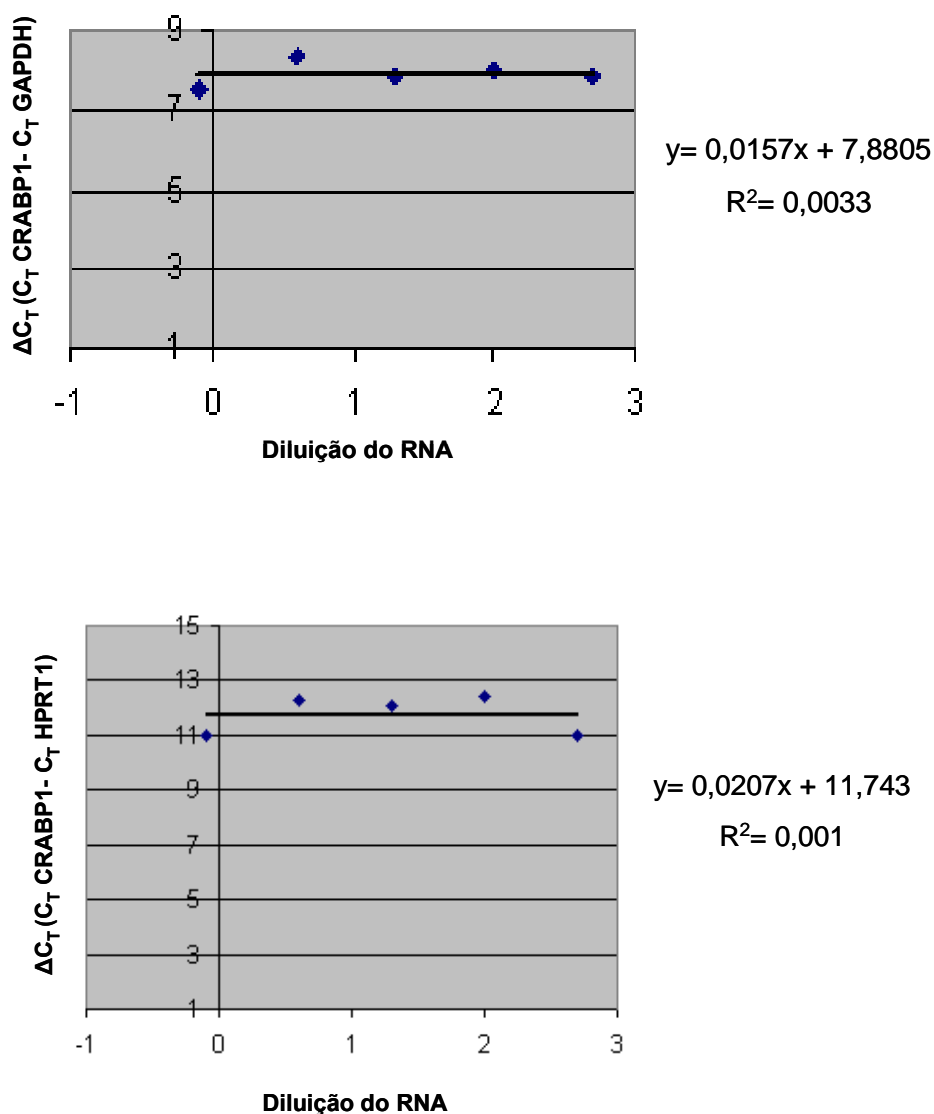


Figura 2. Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *CRABP1*, *GAPDH* e *HPRT1*. O primeiro gráfico demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *CRABP1* e *GAPDH*; o segundo, por sua vez, demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *CRABP1* e *HPRT1*. Em ambos os casos, a inclinação da reta foi inferior a 0,1, indicando eficiências de amplificação semelhantes.

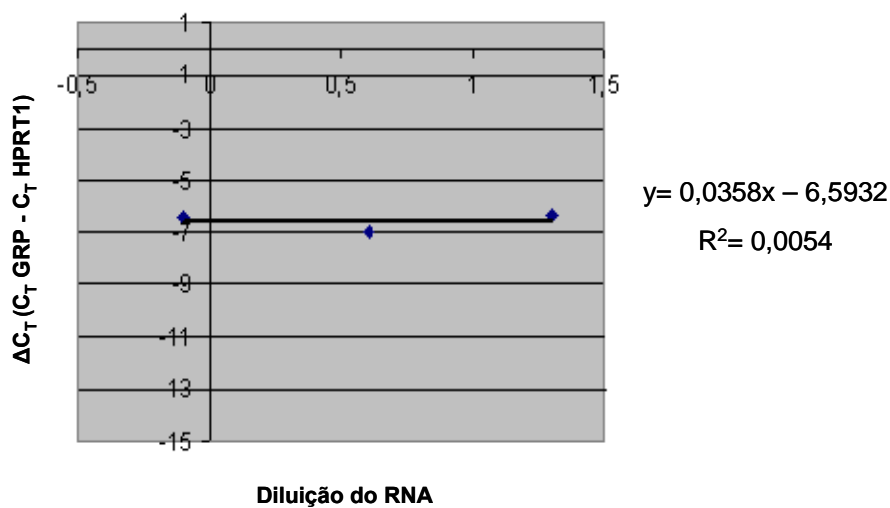
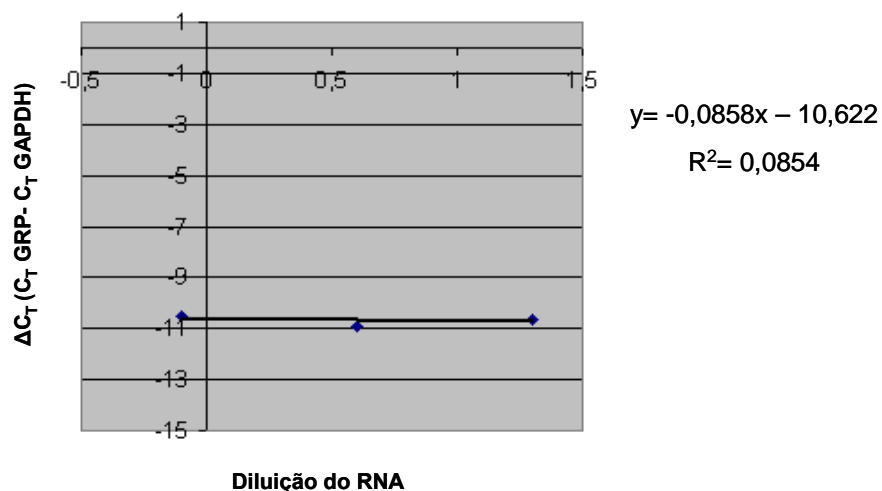


Figura 3. Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *GRP*, *GAPDH* e *HPRT1*. O primeiro gráfico demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *GRP* e *GAPDH*; o segundo, por sua vez, demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *GRP* e *HPRT1*. Em ambos os casos, a inclinação da reta foi inferior a 0,1, indicando eficiências de amplificação semelhantes.

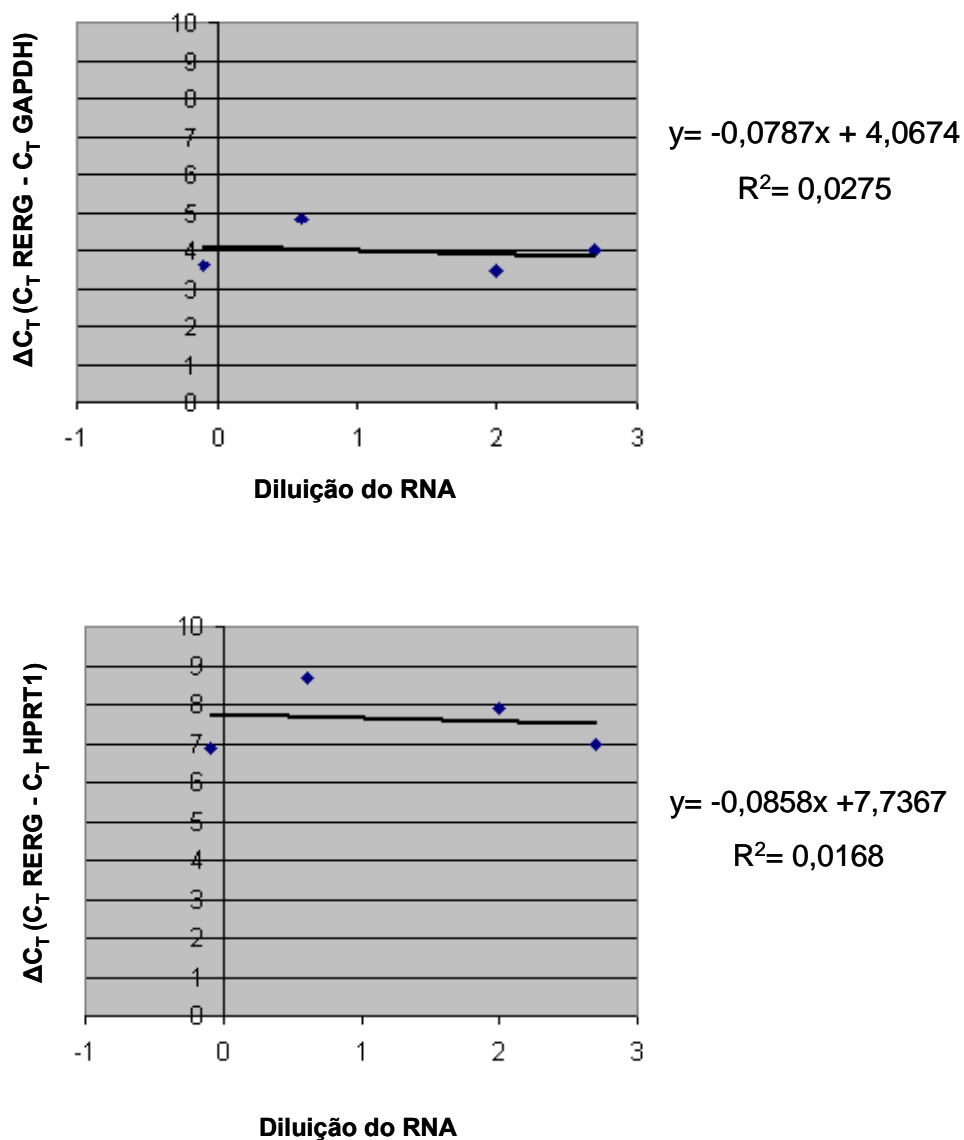


Figura 4. Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *REGG*, *GAPDH* e *HPRT1*. O primeiro gráfico demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *REGG* e *GAPDH*; o segundo, por sua vez, demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *REGG* e *HPRT1*. Em ambos os casos, a inclinação da reta foi inferior a 0,1, indicando eficiências de amplificação semelhantes.

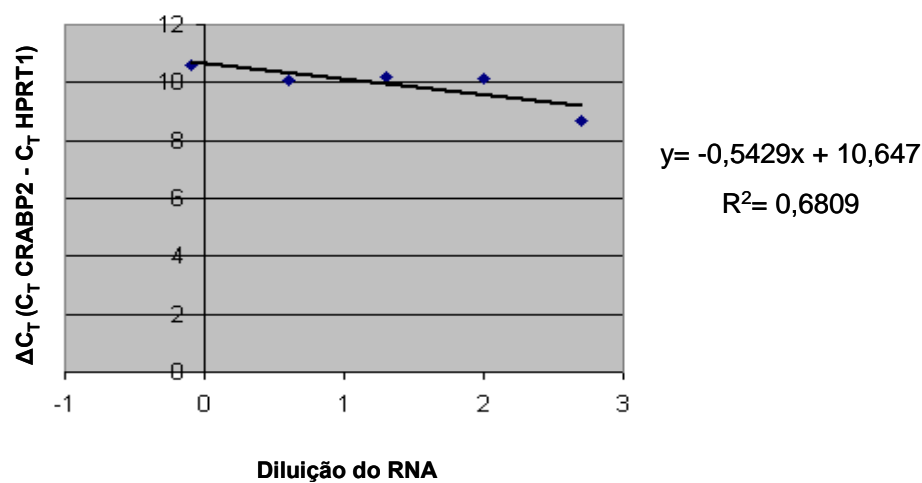
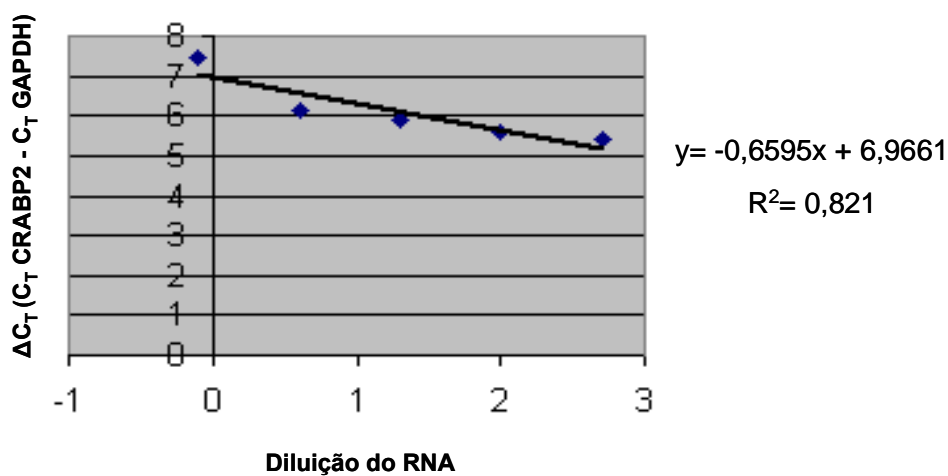


Figura 5. Avaliação da eficiência de amplificação dos genes *CRABP2*, *GAPDH* e *HPRT1*. O primeiro gráfico demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *CRABP2* e *GAPDH*; o segundo, por sua vez, demonstra a correlação entre o logaritmo da concentração da amostra e o ΔC_T dos genes *CRABP2* e *HPRT1*. Em ambos os casos, a inclinação da reta foi superior a 0,1, indicando eficiências de amplificação discrepantes e, portanto, a utilização do método descrito por Pfaffl.

A especificidade da reação de RT-qPCR foi verificada realizando-se a curva de dissociação. A reação é considerada específica para os produtos da PCR quando a curva apresenta apenas um pico em uma determinada temperatura em todas as amostras analisadas para determinado gene (**Figura 6**). A especificidade também foi demonstrada após eletroforese do produto da reação da RT-qPCR em tempo real em gel de agarose 2,0% contendo brometo de etídio na concentração de 0,5 μ g/mL, que demonstrou não apenas a presença de um único produto amplificado, mas também o tamanho do fragmento desejado para cada um dos genes estudados, não sendo observada amplificação inespecífica (**Figura 7**).

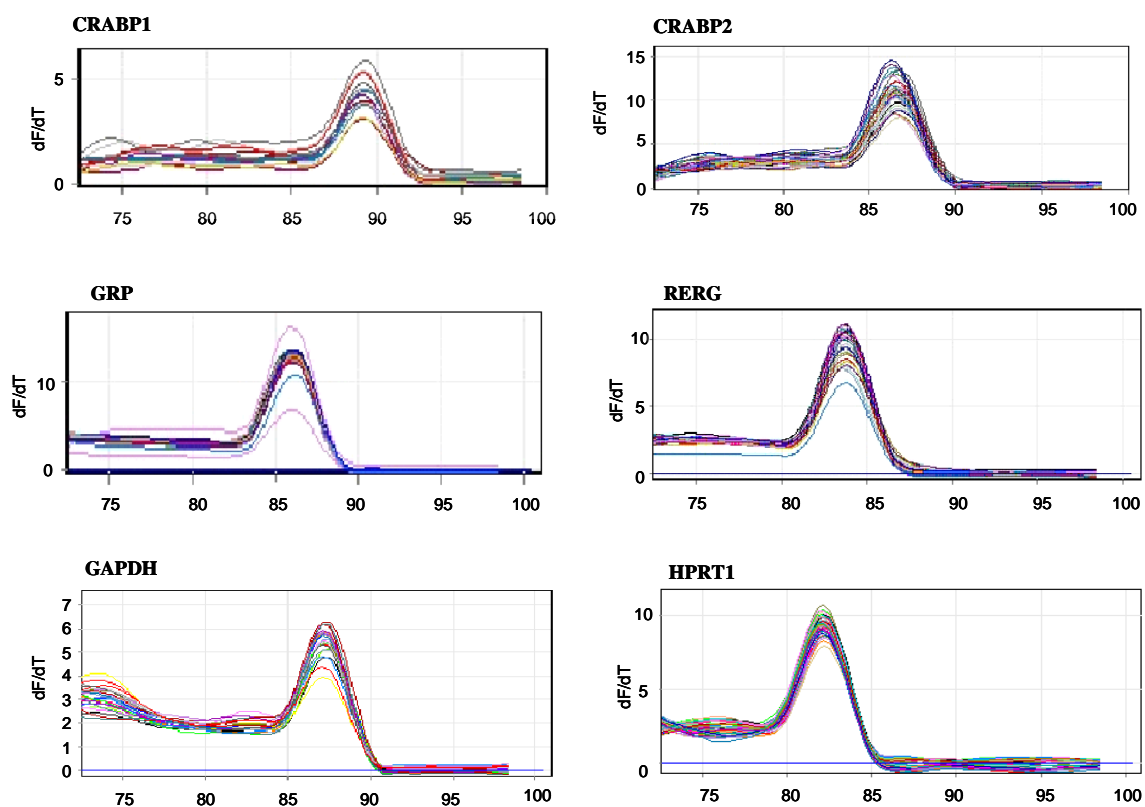


Figura 6. Gráficos demonstrando as curvas de dissociação para os genes *CRABP1*, *CRABP2*, *GRP*, *RERG*, *GAPDH* e *HPRT1*.

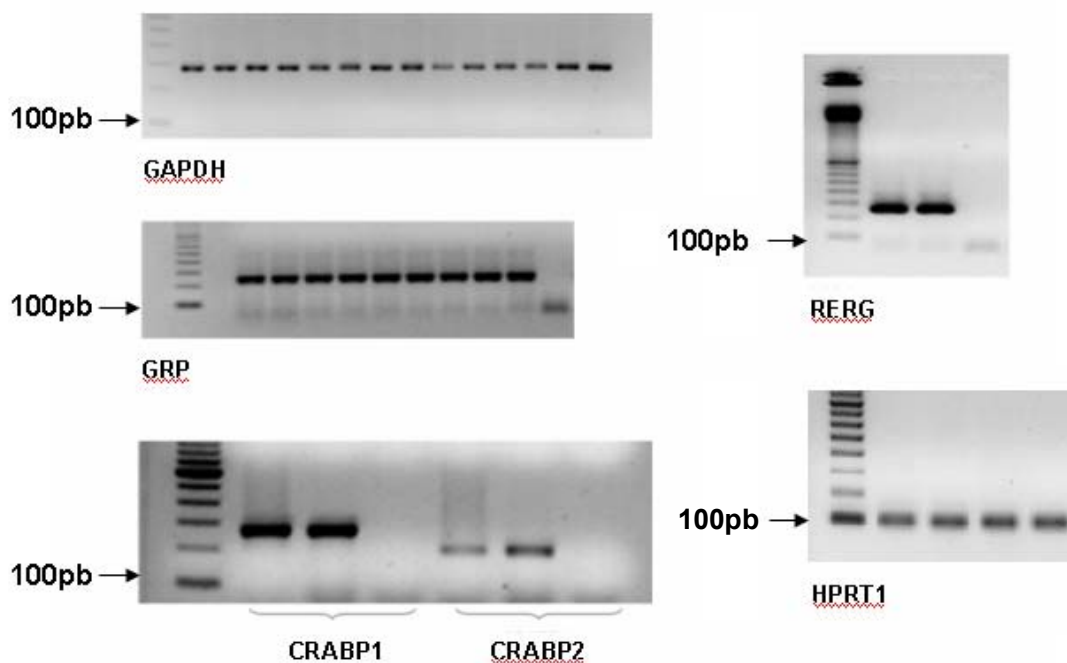


Figura 7. Gel de agarose 2% demonstrando o produto da RT-PCR em tempo real dos genes *CRABP1*, *CRABP2*, *GRP*, *RERG*, *GAPDH* e *HPRT1*.

Todas as reações de RT-qPCR foram feitas em duplicatas para cada amostra.

3.5 Sequenciamento

Para confirmar que os produtos de PCR obtidos com os respectivos oligonucleotídeos eram específicos, realizou-se, também, o sequenciamento de algumas amostras conforme a descrição abaixo.

Antes de efetuar a reação de sequenciamento, 5µL do produto de RT-PCR de cada um dos genes deste estudo foram purificados com 2µL de *ExoSAP-IT*[®] (*USB, Cleveland*,

OH, USA). Para isso, a mistura foi incubada em termociclador por dois períodos de 15 minutos, o primeiro em temperatura de 37 °C, e, o segundo, em temperatura de 80°C.

Os produtos de RT-PCR tratados com *ExoSAP-IT*[®] (*USB, Cleveland, OH, USA*) foram sequenciados em sequenciador automático *3130X/Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) de acordo com os procedimentos recomendados no manual do *BigDye*[®] *Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Desse modo, a reação de sequenciamento foi feita em volume final de 10µl contendo 5µL do produto de RT-PCR purificado, 1µl do BigDye Terminator, 1µL da solução 5,0pmol/µL do oligonucleotídeo iniciador senso, 1,5µl do tampão Tris HCl 1M pH 9.0 MgCl₂ 50mM e 1,5µL de água estéril. A reação foi iniciada em temperatura de 96°C durante 1 minuto e concluída com 35 ciclos de desnaturação a 96° C por 15 segundos, hibridização a 50° C por 15 segundos e extensão a 60° C por 4 minutos.

Em seguida, os produtos da reação descrita acima foram purificados por precipitação. Nesta etapa, 40µL de isopropanol 65 % foram acrescentados ao produto de cada reação de sequenciamento, com posterior incubação em temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos em rotação de 3.000xg, o isopropanol foi removido e 200µL de etanol 60% adicionados. Nova centrifugação foi executada, desta vez por 5 minutos, e o etanol removido. Por fim, as amostras foram secas, dissolvidas em 10µL de formamida e aplicadas no sequenciador automático.

A **Figuras 8, 9 e 10** mostram os cromatogramas de sequenciamento dos genes padronizados.

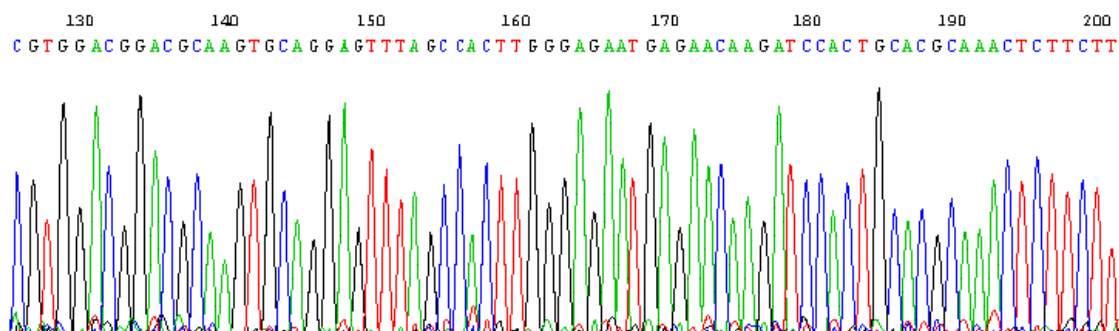
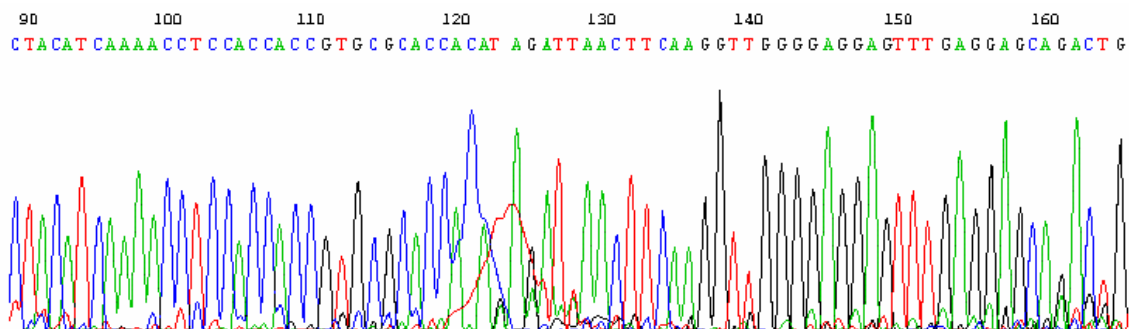
CRABP1*CRABP2*

Figura 8. Cromatograma demonstrando o sequenciamento dos genes *CRABP1* e *CRABP2*.

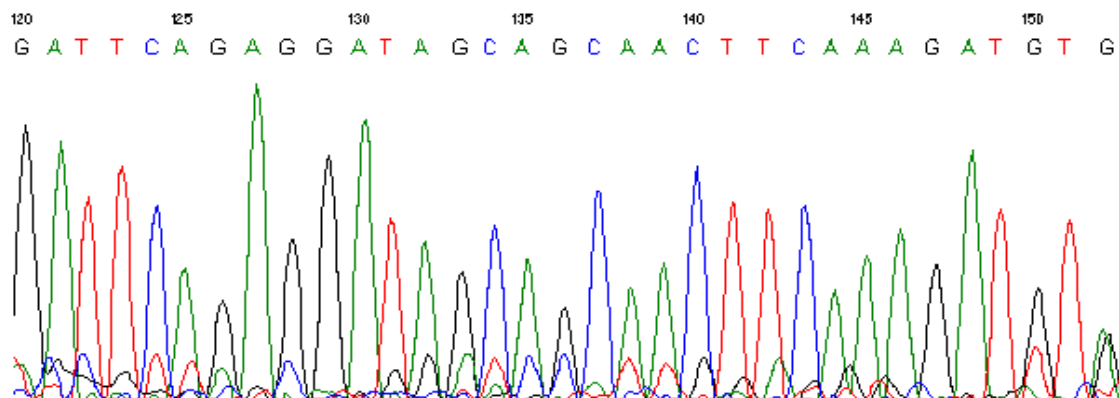
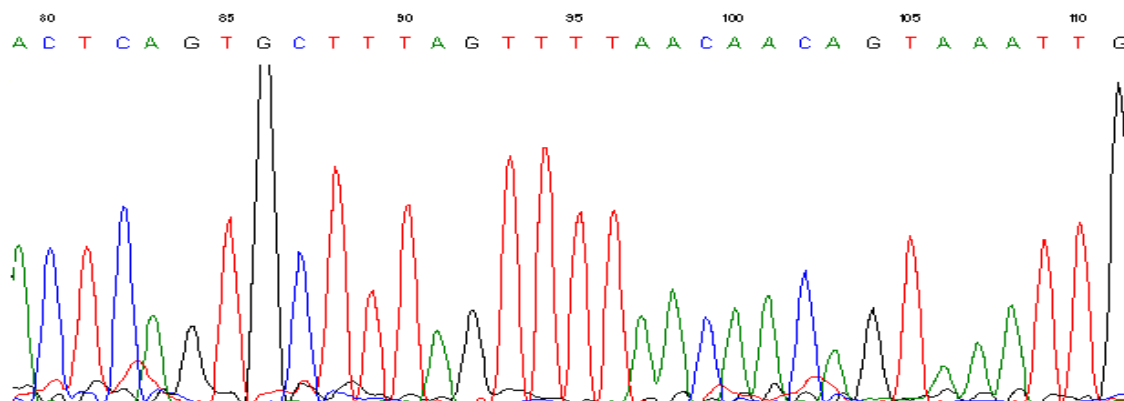
GRP***RERG***

Figura 9. Cromatograma demonstrando o sequenciamento dos genes *GRP* e *RERG*.

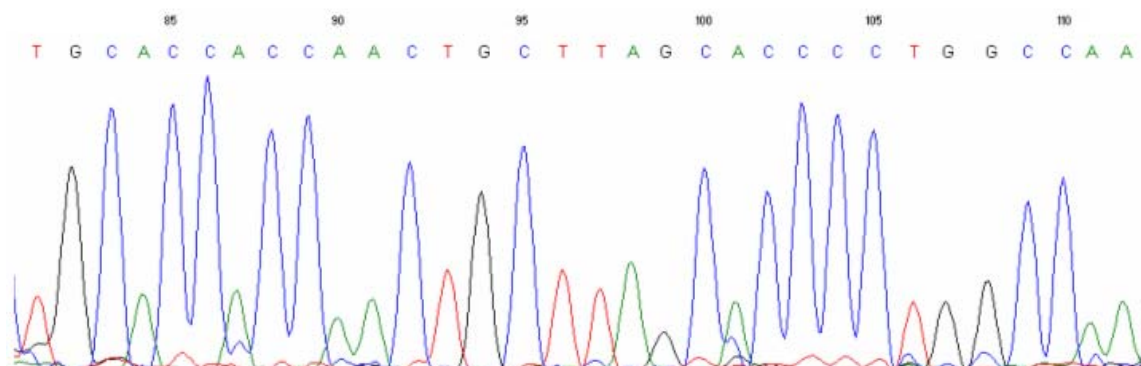
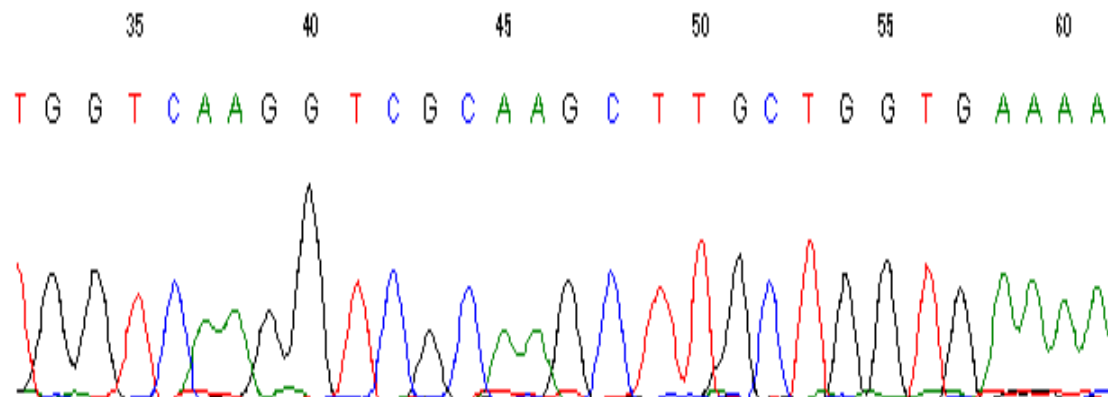
GAPDH***HPRT1***

Figura 10. Cromatograma demonstrando o sequenciamento dos genes *GAPDH* e *HPRT1*.

3.6 Imuno-histoquímica

A pesquisa das proteínas *CRABP1*, *CRABP2*, *GRP* e *RERG* em adenomas de hipófise e tecidos hipofisários normais foi efetuada com a utilização do método biotina-estreptavidina-peroxidase.

Os cortes histológicos de 3 µm de espessura foram realizados em lâminas silanizadas (3-aminopropil-trietoxi-silano, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) e seguiu-se o protocolo descrito abaixo.

3.6.1 Hidratação e bloqueio

Primeiramente, as lâminas foram desparafinadas e hidratadas. Realizou-se, em sequência, o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) 10 volumes (10V) 3% durante sete períodos de três minutos cada. Por último, efetuou-se a lavagem com água corrente e TBS-Tween pH 7,6 (50mM Tris base; 154mM NaCl; 0,02% Tween 20).

3.6.2 Recuperação antigênica

Concluída a primeira etapa, prosseguiu-se com a recuperação antigênica. Para os anticorpos anti-*CRABP2* sc-10065 (*Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA*), anti-*GRP* ab22623 (*Abcam Inc, Cambridge, MA, USA*) e anti-*RERG* 10687-1-AP (*ProteinTech Group Inc, Chicago, IL, USA*), esta recuperação foi executada com ácido cítrico anidro 0,01M pH 6,0 em alta temperatura utilizando-se panela de pressão por 1 minuto. Já para o anticorpo anti-*CRABP1* ab2816 (*Abcam Inc, Cambridge, MA, USA*), a recuperação antigênica foi realizada com o emprego de tripsina por 20 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em TBS-Tween pH 7,6.

3.6.3 Incubação com os anticorpos primários e secundários

Os anticorpos primários anti-CRABP1 em título 1:1000; anti-CRABP2, em título 1:300; anti-GRP, em título 1:1500; e anti-RERG, em título 1:50 foram diluídos em BSA (albumina de soro bovino) e aplicados não só sobre os cortes teciduais amostrais, mas também sobre os controles positivos, entre eles, tecido tireoideano para o anticorpo direcionado contra CRABP1, mamário para o anticorpo anti-CRABP2, pulmonar para o anticorpo anti-GRP, e, por fim, os tecidos mamário e tumoral ovariano para o anticorpo anti-RERG. Em seguida, as lâminas foram incubadas durante 18 horas a 4°C.

Finalizado o período citado acima, as lâminas foram lavadas em TBS-Tween pH 7,6 e incubadas, por 1 hora, em estufa 37°C com o anticorpo secundário presente no estojo VECTASTAIN Elite ABC Kit (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*) para os anticorpos primários anti-CRABP1, anti-CRABP2 e anti-RERG. Para o anticorpo primário anti-GRP, por outro lado, foi utilizado o anticorpo secundário Novolink™ Max Polymer (*RE7260-K, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK*).

3.6.4 Revelação

Após a incubação com o anticorpo secundário, as lâminas foram lavadas em PBS-Tween pH 7,4 (140mM NaCl; 7mM Na₂HPO₄; 3mM NaH₂PO₄) e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3'- tetrahidrocloreto de diaminobenzidina hidratado (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*). As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (*Merck, Darmstadt, Deutschland*). Em

seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas para microscopia com Entellan (*Merck, Darmstadt, Deutschland*).

3.7 Análise estatística

Os testes estatísticos foram bicaudais, com significância estatística fixada em 0,05. As variáveis contínuas foram analisadas usando os testes não paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U. Os valores foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos. Os dados foram compilados em planilhas de cálculos e analisados utilizando-se o programa JMP versão 5.1.1 (*SAS Institute Inc, Cary, NC, USA*).

RESULTADOS

4 Resultados

As características funcionais e morfológicas das amostras tumorais empregadas neste estudo encontram-se na tabela abaixo (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Resumo dos dados anatomopatológicos e demográficos dos pacientes portadores dos diferentes subtipos de tumores hipofisários.

Tumores hipofisários	n	Sexo M/F	Idade anos (mediana)	Tamanho tumoral (micro/macroadenoma)
Não funcionantes	30	17/13	50	0/30
Produtores de GH	13	5/8	43	0/13
Produtores de ACTH	8	1/7	30	8/0
Produtores de PRL	8	2/6	26	0/8
Metástase do carcinoma hipofisário	1	1/0	-----	-----
Total	60	26/34	36,5	8/51

4.1 Análise da expressão do transcrito nos diferentes subtipos de tumores hipofisários

Neste estudo avaliou-se, por RT-qPCR em tempo real, a expressão dos genes *CRABP1*, *CRABP2*, *GRP* e *RERG* nos diferentes grupos de tumores hipofisários. Foram utilizados dois genes endógenos como normalizadores (*GAPDH* e *HPRT1*). A expressão de cada gene alvo foi considerada relevante apenas quando a relação com ambos os genes endógenos utilizados como normalizadores mostraram significância estatística.

4.1.1 Expressão do RNAm do gene *CRABP1*

A **Figura 11 (A e B)** mostra os níveis de expressão do RNAm do gene *CRABP1* em 60 amostras de tumores de hipófise e em cinco amostras de tecidos hipofisários normais. Os adenomas não funcionantes mostraram maior expressão em relação ao grupo dos adenomas funcionantes (GH, ACTH e PRL) ($p < 0,0001$ e $p = 0,0024$) normalizados pelos genes *GAPDH* e *HPRT1*, respectivamente. Em relação ao tecido hipofisário normal, tanto os tumores clinicamente não funcionantes quanto o grupo de tumores funcionantes não apresentaram diferença estatística. Quando o grupo funcionante foi individualizado, apenas os prolactinomas tiveram sua expressão reduzida em relação ao tecido hipofisário normal ($p = 0,05$ e $p = 0,0233$) normalizados pelos genes *GAPDH* e *HPRT1*, respectivamente **Figura 12 (A e B)**.

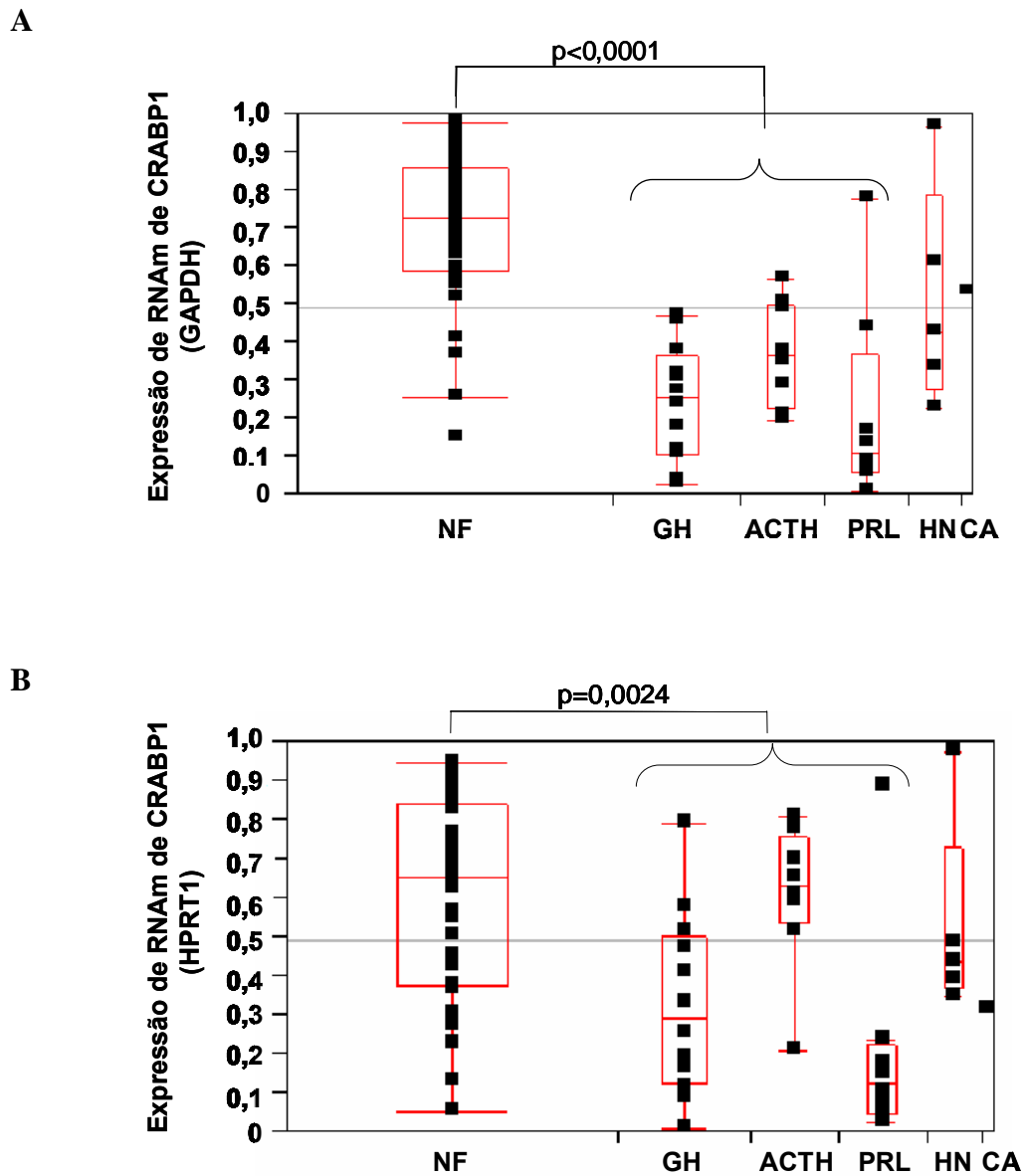
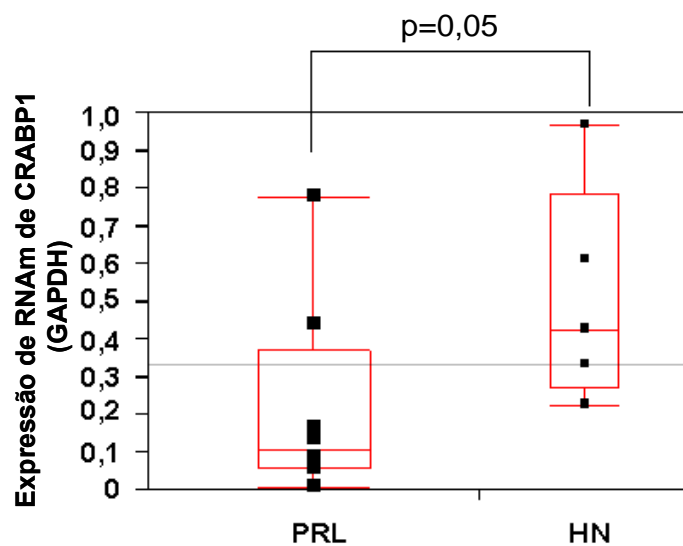


Figura 11. Expressão de RNAm do gene *CRABP1* nos diferentes grupos tumorais hipofisários, na metástase do carcinoma e no conjunto de tecidos hipofisários normais. **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH*; **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1*. **NF** - tumores não funcionantes; **GH** - tumores secretores de GH; **ACTH** - tumores secretores de ACTH; **PRL** - tumores secretores de prolactina, **HN** - tecido hipofisário normal, **CA** - metástase do carcinoma hipofisário não funcionante.

A



B

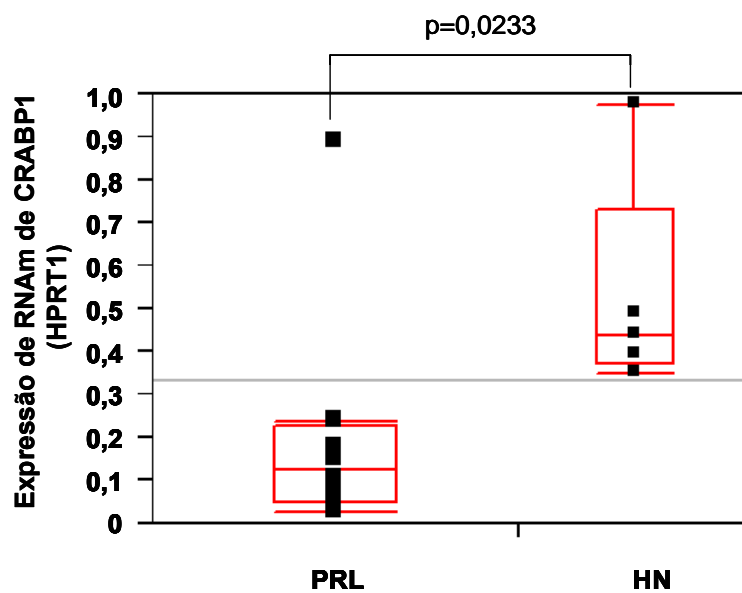


Figura 12. Expressão diferencial de RNAm do gene *CRABP1* entre o subgrupo tumoral secretor de prolactina (PRL) e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,05$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,0233$).

4.1.2 Expressão do RNAm do gene *CRABP2*

A **Figura 13 (A e B)** mostra os níveis de expressão do RNAm do gene *CRABP2* em 60 amostras de tumores de hipófise e em cinco amostras de tecidos hipofisários normais. Os adenomas não funcionantes mostraram maior expressão em relação ao grupo de adenomas funcionantes (GH, ACTH e PRL) ($p < 0,0001$) normalizados tanto pelo gene *GAPDH* quanto pelo gene *HPRT1*, entretanto, quando comparados ao conjunto de tecidos normais, não apresentaram diferença estatística. Os tumores considerados funcionantes (GH, ACTH e PRL), quando agrupados, tiveram sua expressão reduzida em relação ao tecido hipofisário normal ($p = 0,0039$ e $p = 0,0005$) normalizados pelos genes *GAPDH* e *HPRT1*, respectivamente (**Figura 14 A e B**). A individualização do grupo funcionante demonstrou que apenas os tumores produtores de GH ($p = 0,0052$ e $p = 0,0019$) e prolactina ($p = 0,0068$ e $p = 0,0043$) mostraram diferença estatística em relação à hipófise normal quando normalizados pelos genes endógenos *GAPDH* e *HPRT1*, respectivamente (**Figura 15 e 16**).

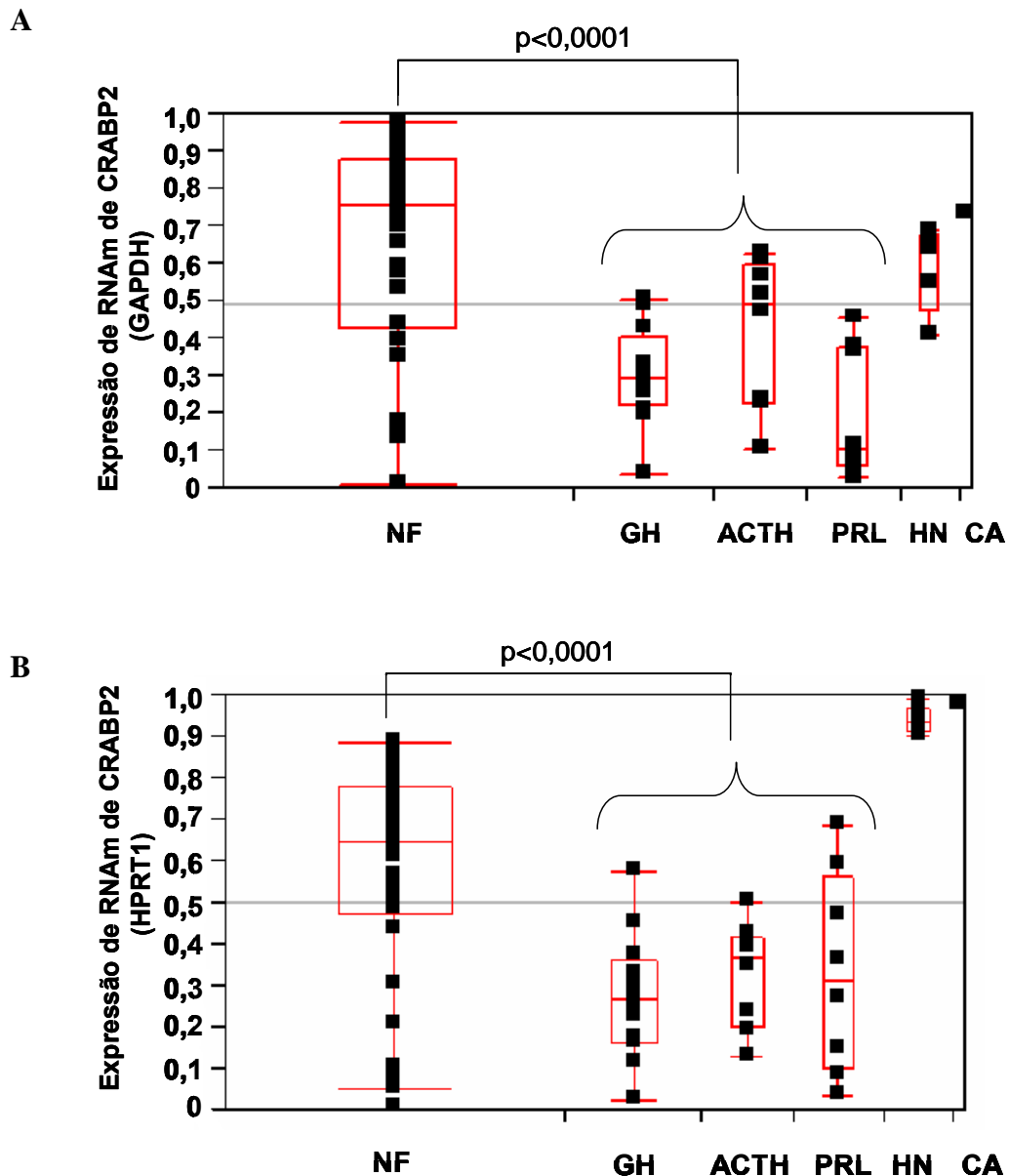
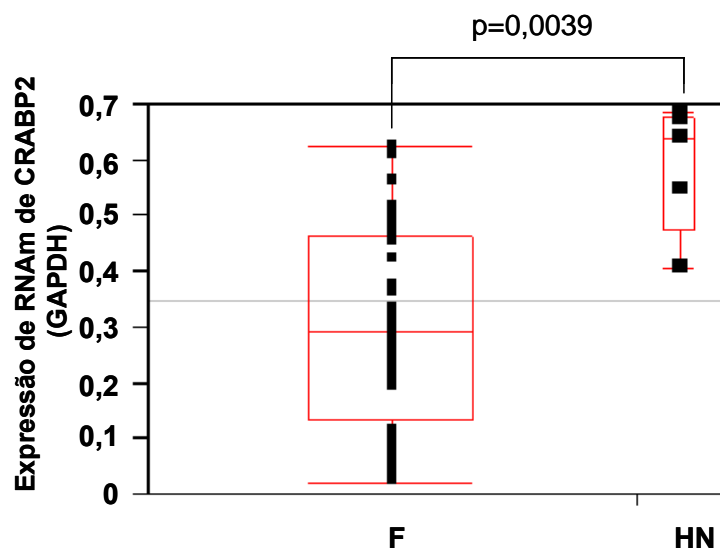


Figura 13. Expressão de RNAm do gene *CRABP2* nos diferentes grupos tumorais hipofisários, na metástase do carcinoma e no conjunto de tecidos hipofisários normais. **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH*; **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1*. **NF** - tumores não funcionantes; **GH** - tumores secretores de GH; **ACTH** - tumores secretores de ACTH; **PRL** - tumores secretores de prolactina, **HN**- tecido hipofisário normal, **CA** - metástase do carcinoma hipofisário não funcionante.

A



B

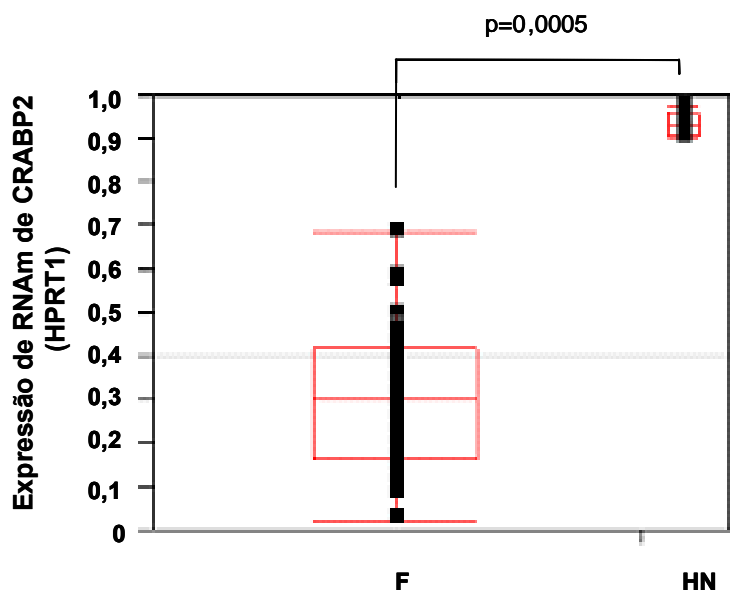
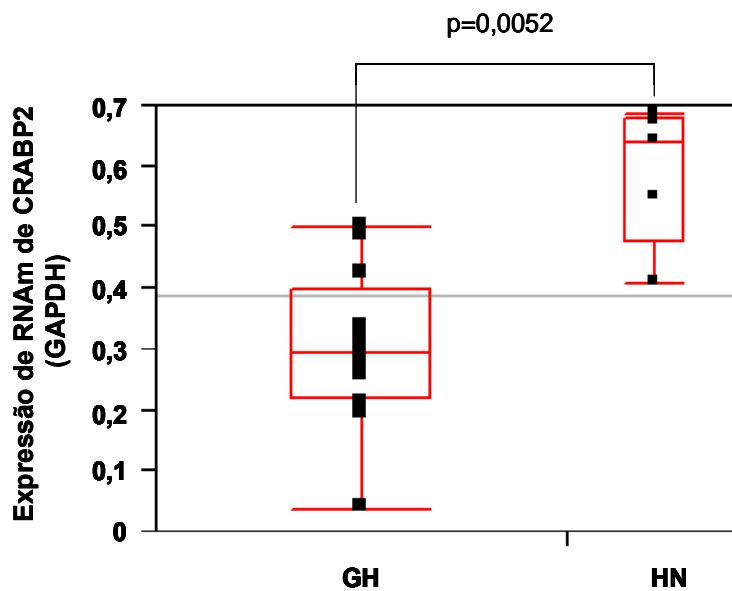


Figura 14. Expressão diferencial de RNAm do gene *CRABP2* entre o grupo de adenomas funcionantes (F) e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,0039$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,0005$).

A



B

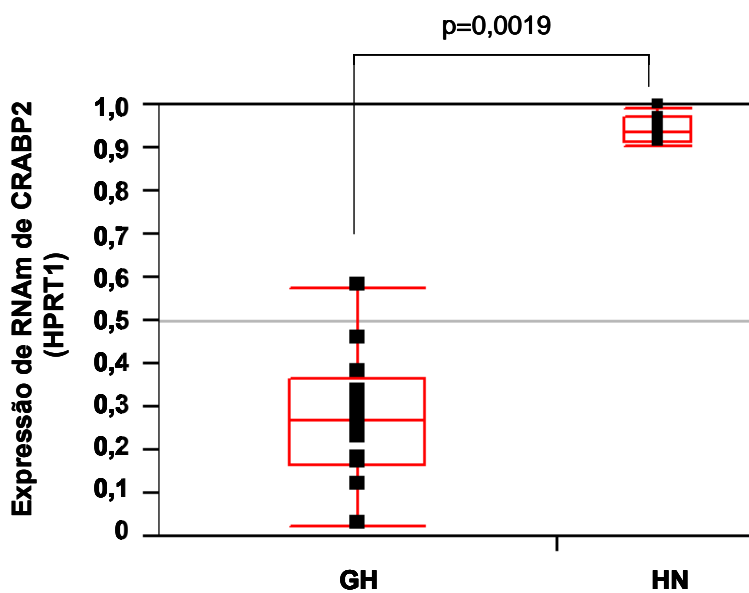
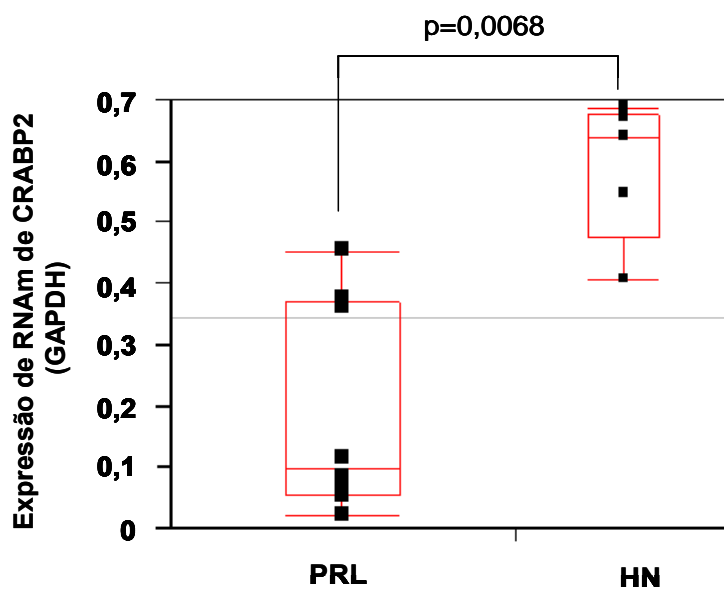


Figura 15. Expressão diferencial de RNAm do gene *CRABP2* entre o subgrupo tumoral secretor do hormônio do crescimento (GH) e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,0052$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,0019$).

A



B

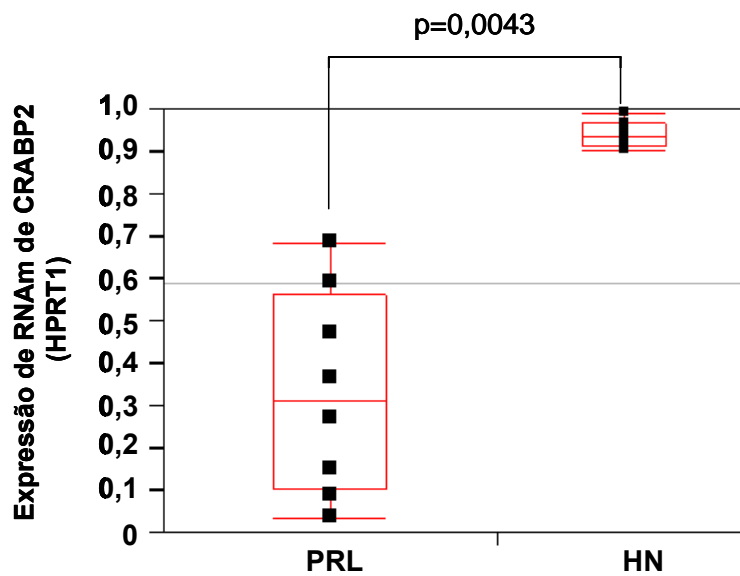


Figura 16. Expressão diferencial de RNAm do gene *CRABP2* entre o subgrupo tumoral secretor de prolactina (PRL) e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,0068$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,0043$).

4.1.3 Expressão do mRNA do gene *GRP*

A **Figura 17 (A e B)** mostra os níveis de expressão do RNAm do gene *GRP* em 60 tumores hipofisários e em cinco tecidos hipofisários normais. Os adenomas não funcionantes mostraram menor expressão em relação ao grupo dos adenomas funcionantes (GH, ACTH e PRL) ($p < 0,0001$), normalizados pelos genes *GAPDH* e *HPRT1*. Em relação ao tecido hipofisário normal, enquanto o grupo de tumores funcionantes não demonstrou diferença estatística, nem mesmo quando individualizado; os tumores não funcionantes mostraram menor expressão ($p = 0,0012$ e $p = 0,0009$), normalizados pelos genes *GAPDH* e *HPRT1*, respectivamente (**Figura 18 A e B**).

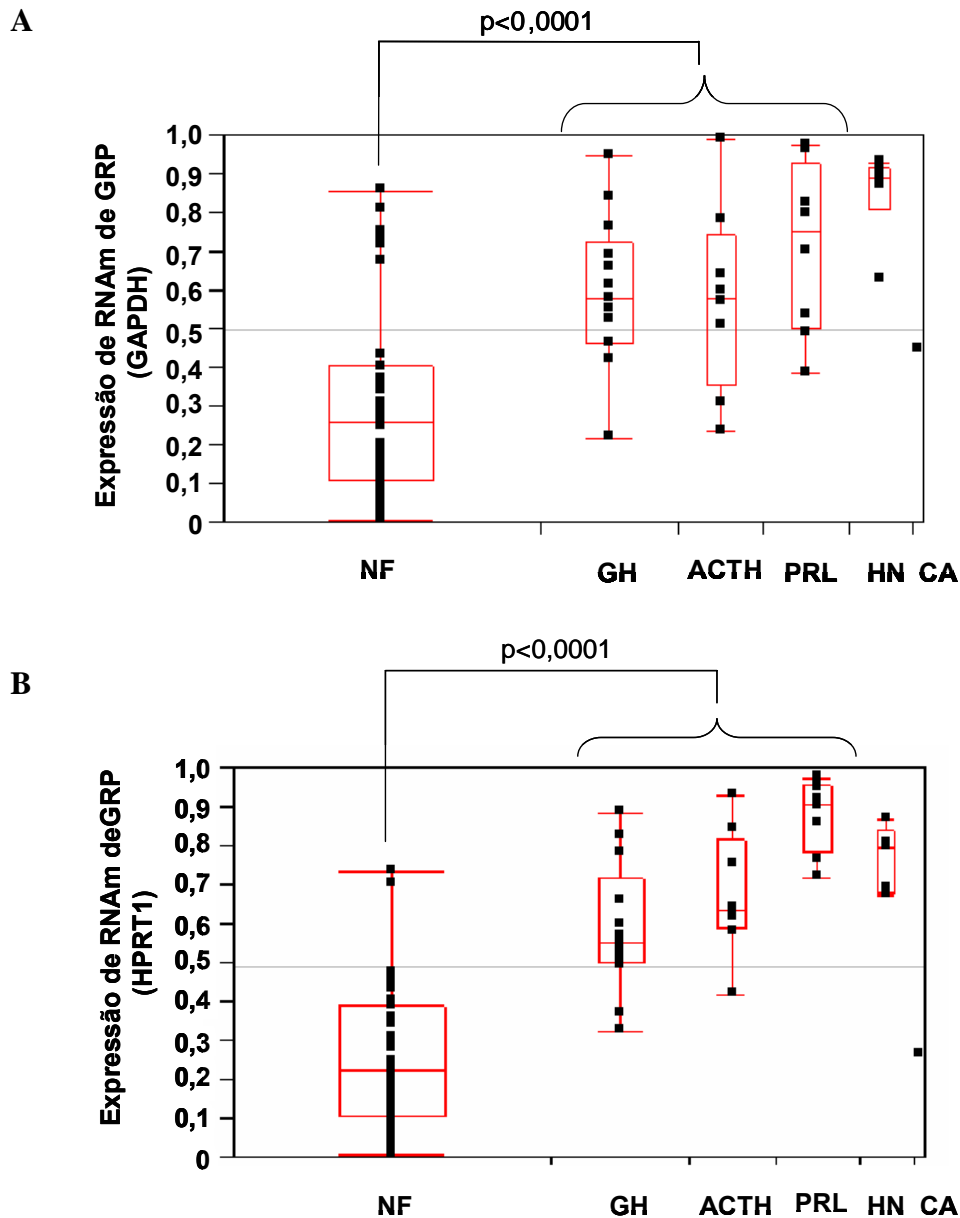
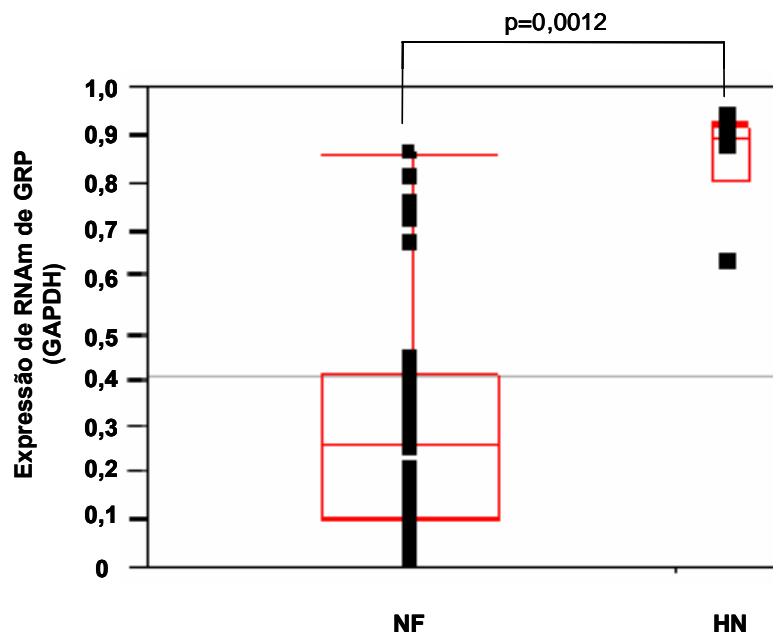


Figura 17. Expressão de RNAm do gene *GRP* nos diferentes grupos tumorais hipofisários, na metástase do carcinoma e no conjunto de tecidos hipofisários normais. **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH*; **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1*. **NF** - tumores não funcionantes; **GH** - tumores secretores de GH; **ACTH** - tumores secretores de ACTH; **PRL** - tumores secretores de prolactina, **HN** - tecido hipofisário normal, **CA** – metástase do carcinoma hipofisário não funcionante.

A



B

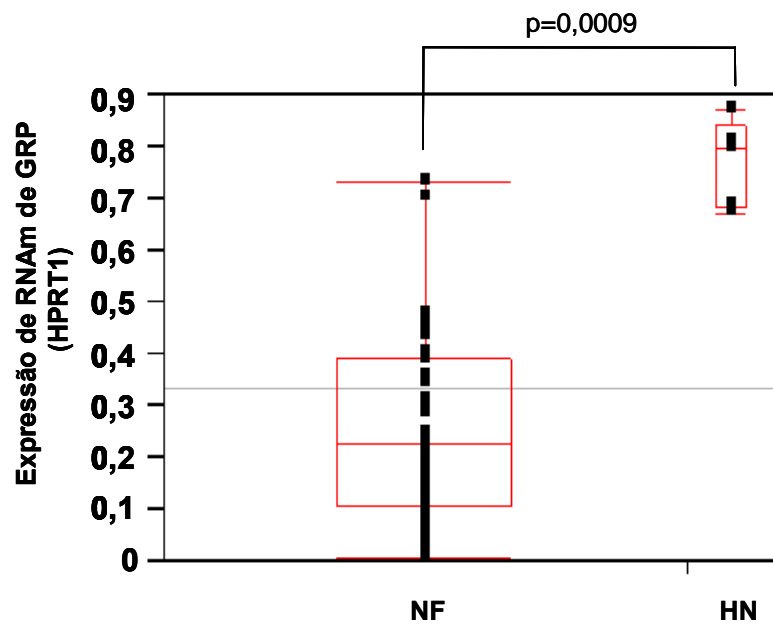


Figura 18. Expressão diferencial de RNAm do gene *GRP* entre o grupo de adenomas clinicamente não funcionantes (NF) e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,0012$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,0009$).

4.1.4 Expressão do RNAm do gene *RERG*

A **Figura 19 (A e B)** mostra os níveis de expressão do RNAm do gene *RERG* em 60 tumores hipofisários e em cinco tecidos hipofisários normais. Os adenomas não funcionantes mostraram maior expressão em relação ao grupo dos adenomas funcionantes (GH, ACTH e PRL) ($p = 0,0001$ e $p < 0,0001$) normalizados pelos genes *GAPDH* e *HPRT1*, respectivamente. Em relação ao tecido hipofisário normal, os tumores não funcionantes mostraram maior expressão ($p = 0,0072$ e $p = 0,05$) normalizados pelos genes *GAPDH* e *HPRT1*, respectivamente (**Figura 20 A e B**). Em contrapartida, o grupo funcionante não demonstrou qualquer diferença em relação ao conjunto normal, nem mesmo quando individualizado.

O grupo de adenomas não funcionantes foi ainda subdividido de acordo com o sexo dos pacientes, uma vez que a expressão de *RERG* foi considerada gênero-dependente em carcinoma hepatocelular (Wang et al., 2006). Desse modo, enquanto os adenomas não funcionantes de pacientes do sexo feminino não demonstraram qualquer diferença em relação ao grupo de tecidos normais (**Figura 21 A e B**), os adenomas não funcionantes de pacientes do sexo masculino demonstraram maior expressão ($p = 0,0005$ e $p = 0,0041$) normalizados pelos genes *GAPDH* e *HPRT1*, respectivamente (**Figura 22 A e B**).

Essa subdivisão também foi efetuada para o grupo de adenomas funcionantes, todavia, nenhuma diferença foi demonstrada em relação ao conjunto de hipófises normais.

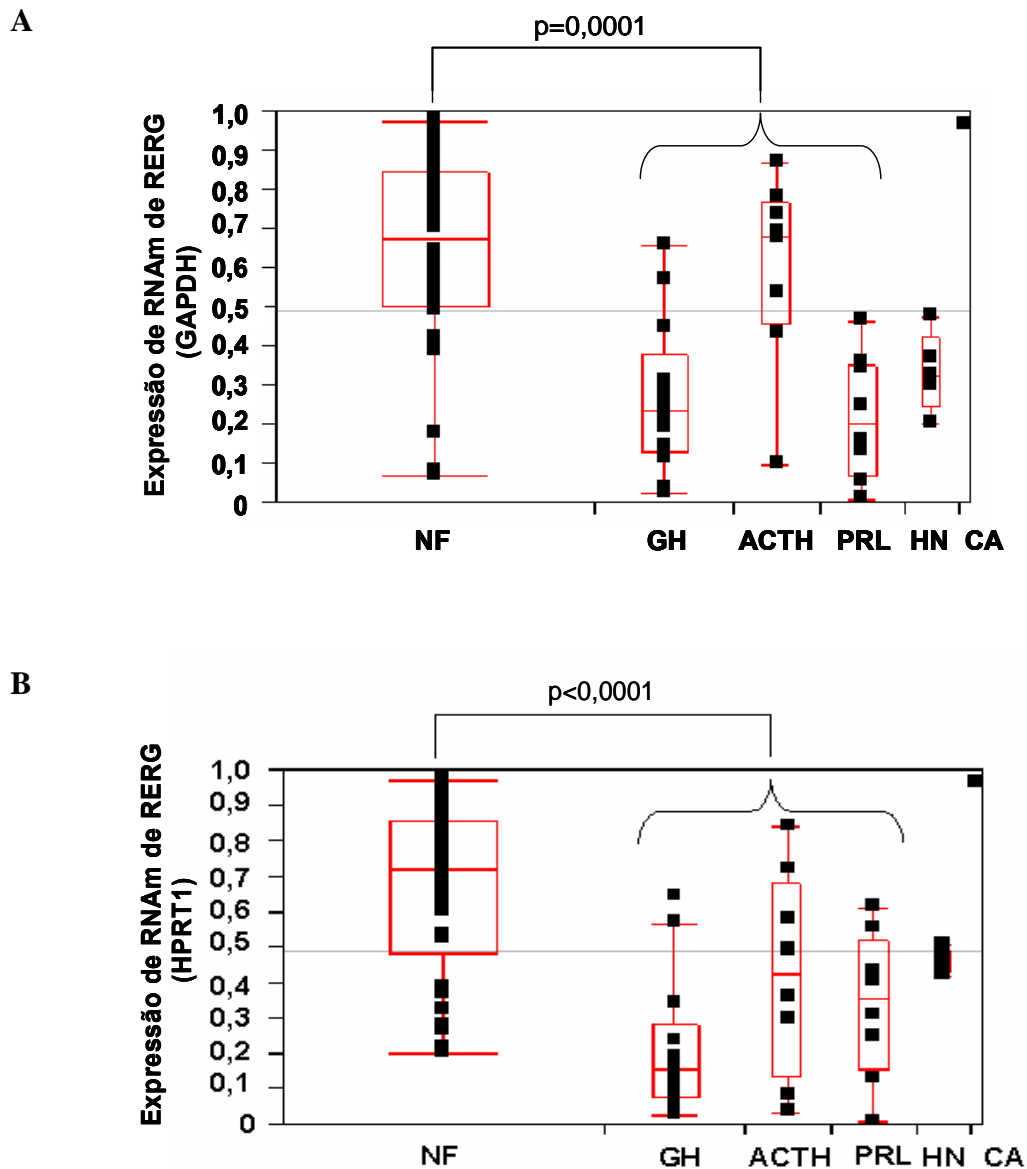


Figura 19. Expressão de RNAm do gene *REG* nos diferentes grupos tumorais hipofisários, na metástase do carcinoma e no conjunto de tecidos hipofisários normais. **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH*; **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1*. **NF** - tumores não funcionantes; **GH** - tumores secretores de GH; **ACTH** - tumores secretores de ACTH; **PRL** - tumores secretores de prolactina, **HN**-tecido hipofisário normal, **CA** - metástase do carcinoma hipofisário não funcionante.

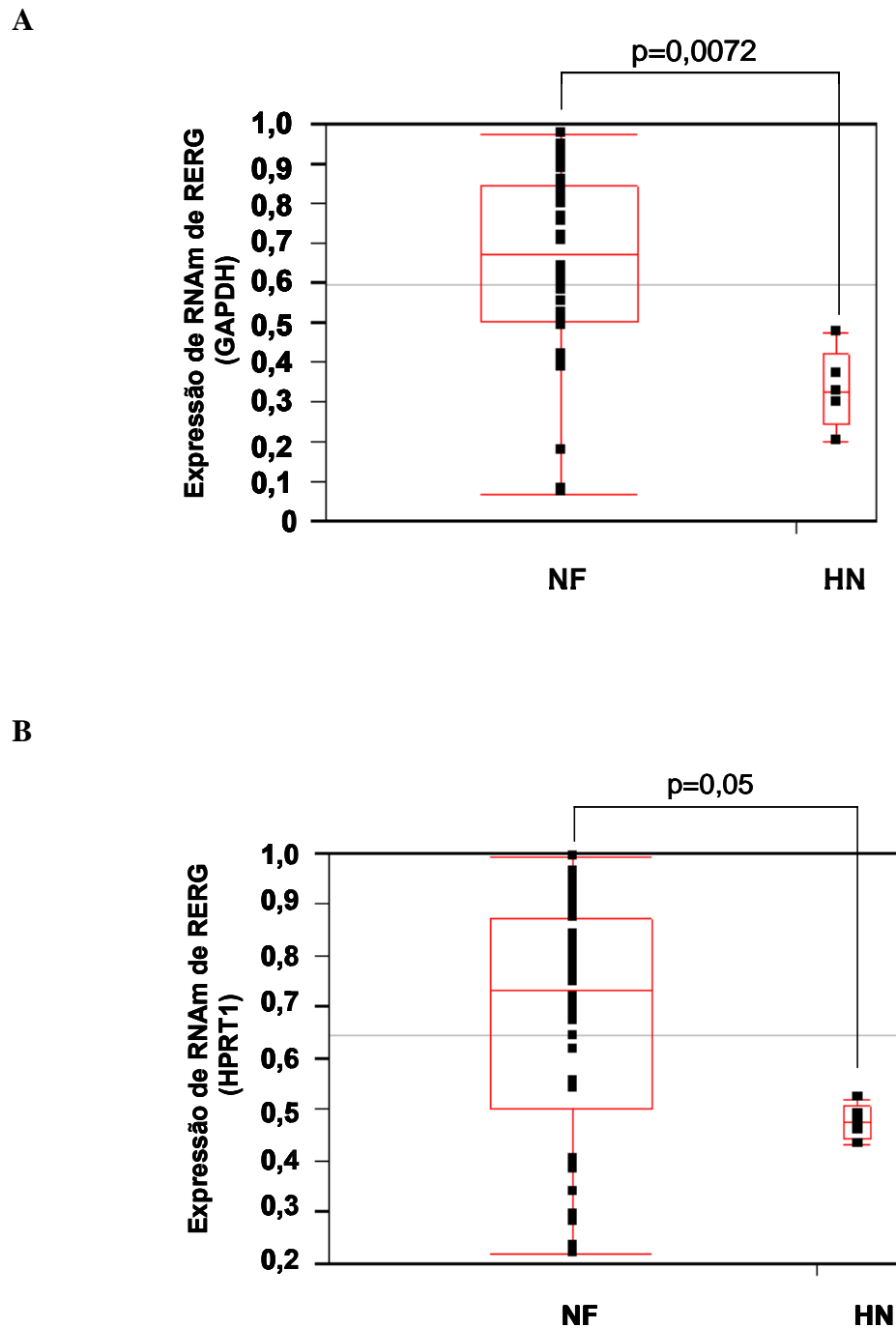
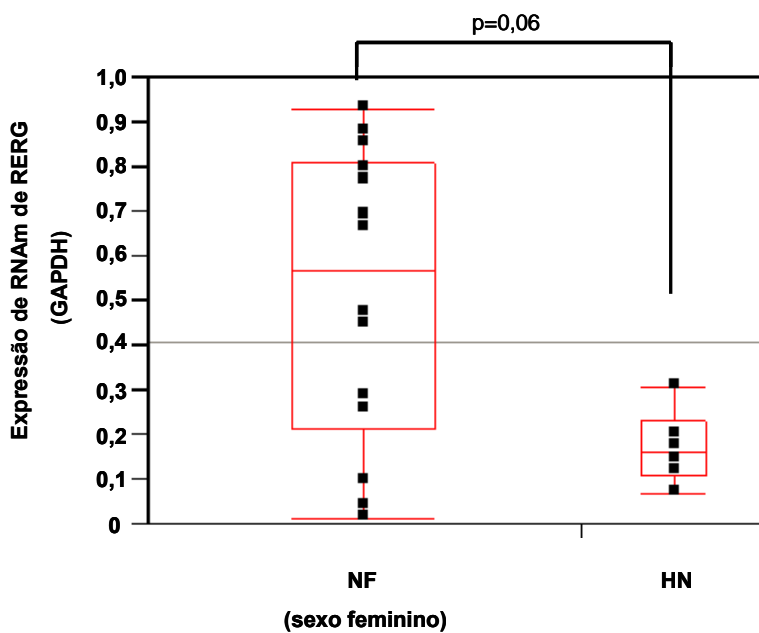


Figura 20. Expressão diferencial de RNAm do gene *REG* entre o grupo de adenomas clinicamente não funcionantes (NF) e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,0072$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,05$).

A



B

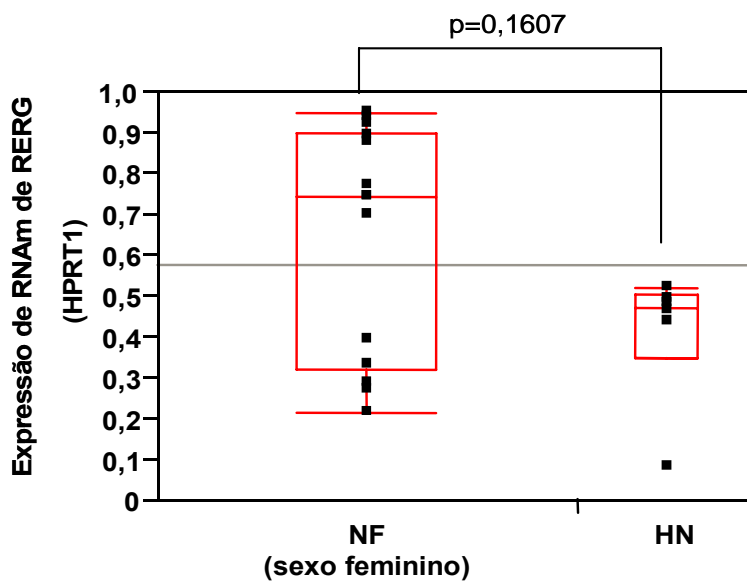


Figura 21. Expressão de RNAm do gene *REG* no grupo adenomas clinicamente não funcionantes (NF) de pacientes do sexo feminino e no conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,06$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,1607$).

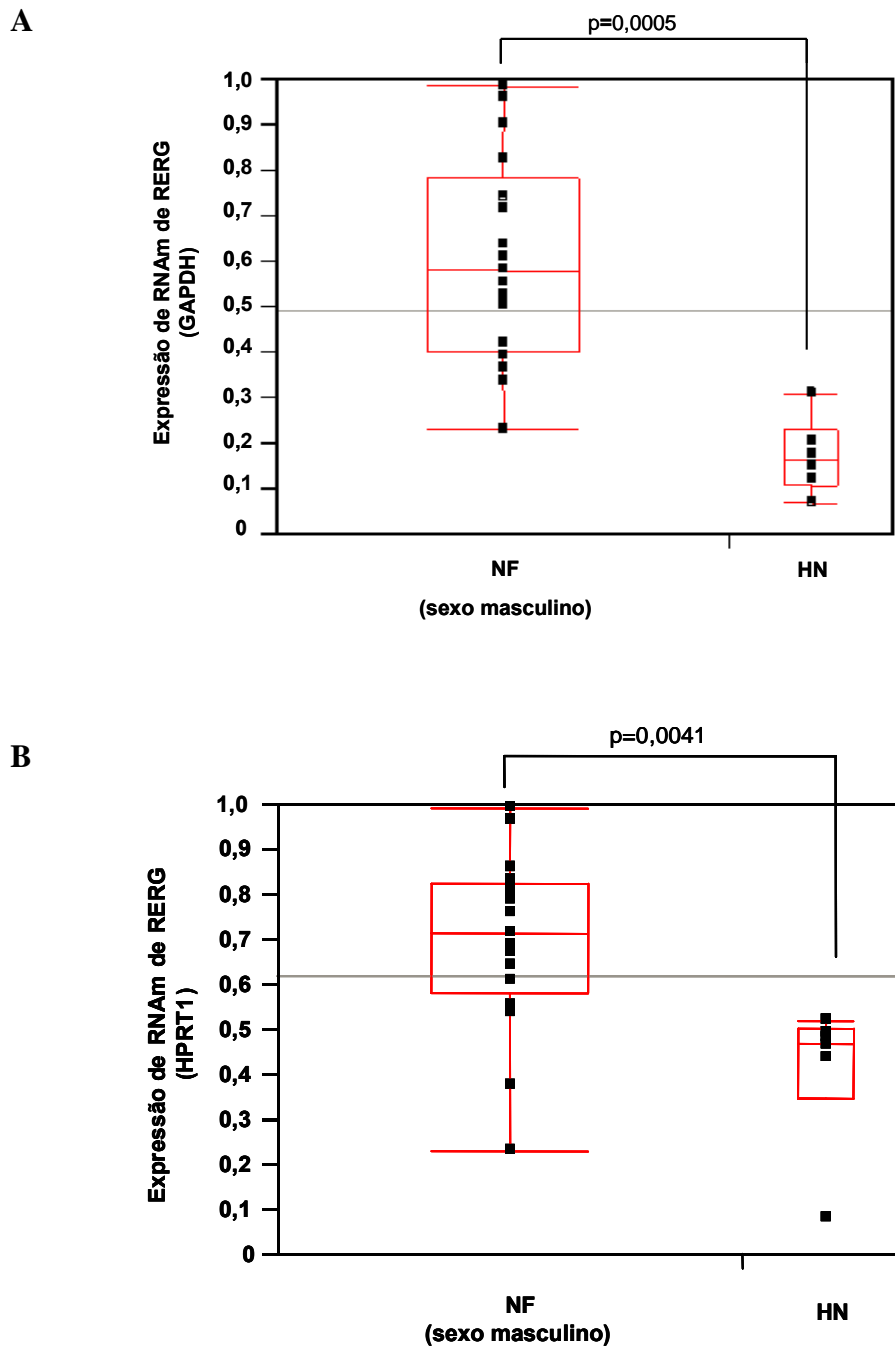


Figura 22. Expressão diferencial de RNAm do gene *REGG* entre o grupo de adenomas clinicamente não funcionantes (NF) de pacientes do sexo masculino e o conjunto de tecidos hipofisários normais (HN). **A**, indica valores de expressão normalizados por *GAPDH* ($p=0,0005$); **B**, indica valores de expressão normalizados por *HPRT1* ($p=0,0041$).

4.2 Análise da expressão protéica nos diferentes subtipos de tumores hipofisários

A técnica de imuno-histoquímica, diferentemente da RT-qPCR em tempo real, não caracterizou diferença de expressão entre os subtipos tumorais para todas as proteínas estudadas.

DISCUSSÃO

5 Discussão

No presente estudo investigou-se a expressão de alguns genes previamente selecionados a partir de um trabalho já desenvolvido por nosso grupo. Neste, comparou-se a expressão simultânea de aproximadamente vinte mil genes entre duas condições distintas, a metástase de um carcinoma hipofisário não funcionante e a mistura de quatro adenomas hipofisários não funcionantes (Giorgi et al., 2005). Vários genes demonstraram-se diferencialmente expressos, dentre os quais, foram escolhidos quatro com expressão diferencial entre 2,5 e 5,0 vezes para serem estudados em sessenta tumores hipofisários dos diferentes subtipos, funcionantes e clinicamente não funcionantes.

5.1 Expressão diferencial do RNA mensageiro entre os diferentes subtipos de tumores hipofisários

5.1.1 *CRABPs*

O ácido retinóico (*RA*), um metabólito ativo da vitamina A, regula múltiplos processos biológicos em uma variedade de tecidos, tanto embrionários quanto adultos. É um potente modulador da proliferação celular, diferenciação e apoptose, efeitos, estes, mediados por duas classes de proteínas, os receptores de ácido retinóico (*RARs*) e as proteínas de ligação ao ácido retinóico celular (*CRABPs*) (Ong et al., 1994; Chambon, 1996; Ross et al., 2000; Brtko e Thalhamer, 2003).

Os receptores de ácido retinóico são fatores de transcrição induzidos por ligação pertencentes a uma grande família de receptores hormonais nucleares e ativados especificamente por ácido retinóico. Esses receptores associam-se ao receptor X retinóide (*RXR*) formando heterodímeros, os quais, por sua vez, ligam-se a regiões específicas na sequência de DNA (elementos responsivos ao ácido retinóico – *RARE*) aumentando as taxas transcricionais de seus genes-alvo em presença de ácido retinóico (De Thé, et al., 1990; Mangelsdorf et al.; 1995; Chambon, 1996; Donato e Noy, 2005).

A outra classe de proteínas intracelulares que liga-se ao ácido retinóico compreende as proteínas de ligação ao ácido retinóico celular 1 e 2 (*CRABP1* e *CRABP2*). As duas isoformas de *CRABP* são altamente homólogas em humanos (74% de identidade) e entre espécies. A elevada identidade de sequência da mesma isoforma entre diferentes espécies em comparação com diferentes isoformas na mesma espécie indica que tais proteínas possam ter funções distintas, o que explica a conservação de seus genes durante o curso da evolução (Budhu et al., 2001; Budhu e Noy, 2002). Embora seja ressaltado que solubilizar e proteger o ácido retinóico no espaço aquoso do citosol, bem como transferir o ligante para o núcleo, sejam funções das *CRABPs*, várias evidências sugerem que possam ter papéis mais específicos na modulação da sinalização por ácido retinóico. Experimentos demonstram que enquanto *CRABP2* aumenta a atividade transcricional do ácido retinóico, transportando-o do citoplasma ao núcleo e facilitando a formação do complexo *RA-RAR* (Jing et al., 1997); *CRABP1* aumenta a atividade das enzimas que catalisam sua degradação e, por isso, deprime a eficácia do componente na célula (Boylan e Gudas, 1991; Boylan e Gudas, 1992).

5.1.1.1 *CRABPI*

O gene *CRABPI*, localizado no cromossomo 15q24, codifica uma proteína de ligação ao ácido retinóico celular cujas funções ainda não estão completamente esclarecidas.

A proteína *CRABPI* é principalmente responsável pela regulação do catabolismo intracelular dos retinóides, desta forma, diminuindo sua ação, tornando as células que a superexpressam resistentes ao tratamento com retinóides. Boylan and Gudas (1991; 1992) mostraram que elevados níveis de expressão do gene *CRABPI* em células F9 de teratocarcinoma murino aumentavam a produção de metabólitos do ácido retinóico, diminuindo a sensibilidade dessas células à indução da diferenciação. Foi sugerido que a proteína *CRABPI* modificava a resposta celular ao ácido retinóico, aumentando a atividade de enzimas que catalisavam sua degradação. Do mesmo modo, Won et al. (2004) demonstraram que a expressão do gene *CRABPI* em células AM-HN-7 de carcinoma de cabeça e pescoço resultou em menor sensibilidade ao ácido retinóico quando comparada ao controle *CRABPI*-negativo.

O padrão de expressão do gene *CRABPI* ainda não foi descrito em tumores hipofisários, sendo, este, o primeiro estudo a descrevê-lo. Assim, de acordo com os resultados mencionados, observou-se que os adenomas clinicamente não funcionantes constituíram o grupo de tumores que mais expressava o transcrito do gene *CRABPI* quando comparado ao grupo de tumores denominados funcionantes (GH, ACTH e PRL), embora não tenha apresentado expressão diferencial em relação ao tecido hipofisário normal.

Nessas condições, os dados encontrados neste estudo afrontam não só as informações relatadas por Wu X. et al. (2002), nas quais a superexpressão de *CRABPI* em leiomioma de útero humano caracteriza-se com diferença de expressão em relação ao miométrio normal; mas também os estudos de Hawthorn et al. (2004) e Pfoertner et al. (2005), que revelam, respectivamente, uma significativa perda de expressão do gene *CRABPI* em carcinoma papilífero de tireóide e carcinoma celular renal em contraste à elevada expressão encontrada no tecido normal.

Recentemente foi mostrado que o gene *CRABPI* parece funcionar como um gene supressor de tumor e que alterações epigenéticas como a metilação da sua região promotora poderiam levar à inativação, como relatado por Huang et al. (2003), que identificaram dois novos genes hipermetilados e inativados em carcinoma papilífero de tireóide, entre eles, o gene *CRABPI*. A metilação associada ao silenciamento do gene *CRABPI* não foi descrita apenas em carcinoma papilífero de tireóide, mas também em carcinoma esofágico de células escamosas, com destaque para a restauração da expressão do gene *CRABPI* em células gene-silenciadas de câncer esofágico após tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina e a consequente redução da proliferação celular (Tanaka et al., 2007); carcinoma ovariano (Wu Q. et al., 2007); e câncer colorretal (Toyota et al., 1999; Lind et al., 2006; Ogino et al., 2006; Wong et al., 2007). Neste estudo, o único subtipo tumoral que mostrou menor expressão do transcrito de *CRABPI* em relação ao tecido hipofisário normal foi aquele constituído pelos tumores produtores de prolactina, dessa maneira, sugere-se a participação de eventos de metilação neste grupo de tumores.

Ao comparar os adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes com os adenomas funcionantes, verificou-se uma evidente distinção entre os dois grupos com relação à expressão do RNAm do gene *CRABP1*, no entanto, embora esta diferença exista, não é possível mencionar o termo superexpressão, pois a comparação entre os tumores não funcionantes e o tecido hipofisário normal não demonstrou diferença significativa, ou mesmo, subexpressão, pois a relação entre os tumores funcionantes e o tecido hipofisário normal também não demonstrou qualquer distinção. Nesse contexto, considerando o papel da proteína *CRABP1* como uma proteína que degrada ácido retinóico e o ácido retinóico como um possível agente terapêutico a ser utilizado em tumores hipofisários, pode-se sugerir que os prolactinomas são os mais suscetíveis ao tratamento, pois foram os que menos expressaram o transcrito do gene *CRABP1* e, portanto, os que teriam uma degradação menor do composto. Ademais não é possível afirmar que o gene *CRABP1* funcione como um gene supressor de tumor, pelo menos não em tumores hipofisários, já que sua expressão não se mostrou diferente do tecido hipofisário normal, exceto nos tumores produtores de prolactina.

5.1.1.2 *CRABP2*

Diferentemente de *CRABP1*, que é restrita ao citosol, a proteína codificada pelo gene *CRABP2* pode localizar-se no núcleo e aumentar a ativação transcricional mediada por ácido retinóico, seja por uma interação estável entre a proteína e o complexo heterodímero *RAR-RXR* – DNA, sugerindo que *CRABP2* aumente a ligação do heterodímero tanto ao ácido retinóico quanto ao elemento responsivo do DNA; seja pela canalização do ácido retinóico de *CRABP2* para *RAR* por meio de um complexo

intermediário de curta duração. Independentemente do mecanismo de ação, os efeitos transcricionais de *CRABP2* são capazes de mediar a inibição da proliferação induzida por ácido retinóico (Dong et al., 1999; Donato e Noy, 2005)

Em cultura de células, a expressão da proteína *CRABP2* aumenta notavelmente a atividade transcricional mediada pelo receptor de ácido retinóico e induzida por seu ligante. Por isso, Manor et al. (2003) exploraram o efeito de *CRABP2* em células SC115 de carcinoma mamário, demonstrando que a expressão de *CRABP2* nestas células aumentou consideravelmente a atividade transcricional do receptor de ácido retinóico e sensibilizou as células à inibição da proliferação induzida por ácido retinóico. Ainda em relação ao papel conhecido de *CRABP2* em aumentar a atividade transcricional de *RAR*, Donato e Noy (2005) ressaltaram o envolvimento dessa proteína no aumento da expressão de caspase 9 em células MCF-7 de carcinoma de mama e, conseqüentemente, na amplificação da habilidade do ácido retinóico em desencadear apoptose. Da mesma forma, Plantier et al. (2008) foram os primeiros a relatar o envolvimento do gene *CRABP2* na expressão da elastina em fibroblastos de pacientes com enfisema pulmonar, dado confirmado a partir da supressão da expressão de *CRABP2* em fibroblastos de pulmão com siRNA e a conseqüente extinção da indução da expressão de elastina por ácido retinóico.

Com relação à expressão do RNAm do gene *CRABP2*, foi possível observar que, no presente estudo, foi inferior nos tumores hipofisários considerados funcionantes (GH, ACTH e PRL) quando estes foram comparados tanto ao tecido hipofisário normal quanto aos tumores não funcionantes. Além disso, quando o grupo de tumores funcionantes foi individualizado, apenas os tumores produtores de hormônio do

crescimento e prolactina demonstraram expressão reduzida quando comparados ao grupo de glândulas normais.

Se por um lado, a menor expressão do transcrito de *CRABP2* nos tumores hipofisários funcionantes é corroborada pela expressão também reduzida em amostras de carcinoma celular renal (Goelden et al., 2005) e câncer de próstata (Okuducu et al., 2005; Thompson et al., 2008), sugerindo que a redução de expressão do gene poderia promover o desenvolvimento e/ou progressão tumoral por meio de controle insuficiente da diferenciação, proliferação ou apoptose celular via atividade dos retinóides; por outro, é oposta àquela observada em leiomiomas uterinos (Zaitseva et al., 2007) e tumores de Wilms (Takahashi et al., 2002), nos quais a indicação do ácido retinóico como droga potencial poderia ser eficaz em combinação com a quimioterapia convencional.

A comparação do conjunto de proteínas entre um macroadenoma de hipófise e o tecido hipofisário normal revelou várias proteínas diferencialmente reguladas, entre elas, *CRABP2*, cuja expressão correlacionou-se com os níveis de RNAm, e, ao contrário do que foi observado no presente estudo, demonstrou-se superior no tecido tumoral. No entanto, os autores não identificaram o subtipo de adenoma utilizado (Desiderio e Zhan, 2003).

É difícil avaliar funções celulares estudando genes individualmente, sem ter o conhecimento completo da sinalização celular que envolve o tratamento com ácido retinóico, bem como todas as proteínas envolvidas. Entretanto, foi possível mostrar, de forma clara, uma diferença estatisticamente significativa entre os tumores hipofisários que mais expressavam o transcrito do gene *CRABP2* e os que menos o expressavam,

embora o primeiro grupo não tenha caracterizado expressão diferencial em relação ao tecido hipofisário normal.

A proteína *CRABP2* é a principal reguladora da atividade anti-carcinogênica do ácido retinóico por atuar no transporte do composto ao núcleo, portanto, pode-se sugerir que os tumores funcionantes, especificamente os produtores de GH e PRL, que apresentaram menor expressão do RNAm desse gene em relação aos tumores não funcionantes e também em relação ao tecido hipofisário normal, são os menos suscetíveis ao tratamento com ácido retinóico, visto que uma quantidade reduzida do agente terapêutico atingiria os receptores nucleares.

5.1.2 GRP

A bombesina foi isolada e caracterizada a partir da pele do anfíbio *Bombina bombina* (Erspamer et al., 1970). Uma década mais tarde, utilizando o anti-soro desenvolvido contra bombesina, pesquisadores identificaram o homólogo mamífero deste peptídeo, que induz a secreção de gastrina pelas células G no antro gástrico, função, esta, que lhe garantiu a denominação de peptídeo liberador de gastrina (*GRP*) (McDonald et al., 1979). Pouco tempo depois, um novo peptídeo bombesina-símile foi identificado em medula espinal de suínos e nomeado neuromedina B (*NMB*) (Minamino et al., 1983). Todos os três peptídeos são relacionados na sequência e partilham uma metionina amidada na carboxila terminal (Patel et al., 2006).

Os receptores de *GRP*, entre eles, *GRPR*, *NMBR* e *BRS3*, são acoplados à proteína G, possuem sete domínios transmembrana e ativam fosfolipase C para aumentar as

concentrações intracelulares de inositol fosfato, diacilglicerol e cálcio (Rozenfurt, 1998).

GRP, o peptídeo bombesina-símile melhor caracterizado em mamíferos, encontra-se largamente distribuído em cérebro, trato gastrointestinal, trato reprodutivo e pulmão (Spindel, 1986). Entre outras funções, desempenha um importante papel na regulação da contração do músculo liso, liberação de hormônios do trato gastrointestinal e secreção de enzimas pancreáticas, além disso, atua como um neurotransmissor no sistema nervoso central (Bunnett, 1994) e como um mitógeno no tecido pulmonar, estimulando tanto o crescimento do epitélio bronquial normal quanto o crescimento dos cânceres pulmonares de pequenas células e não-pequenas células (Viallet e Minna, 1989). O bloqueio de *GRP* com anticorpos ou antagonistas sintéticos inibe o crescimento desses tumores, logo, *GRP* parece ter um papel importante nos eventos da carcinogênese pulmonar (Kelley et al., 1997; Kiaris et al., 1999).

A atuação de *GRP* como mitógeno ainda estende-se ao câncer de pâncreas, próstata, mama, cólon e estômago (Patel et al., 2006), assim como aos neuroblastomas, nos quais a expressão sincrônica do *GRP* e seu receptor (*GRPR*) sugeriu a participação de ambas as proteínas no crescimento tumoral (Kim et al., 2002). Dados recentes mostram que *GRP* não é somente um mitógeno, mas também um fator angiogênico para células endoteliais (Martínez et al., 2005) e, além disso, um morfógeno, já que o silenciamento de *GRPR* em células BE(2)-C de neuroblastoma induziu mudanças na morfologia celular com redução do tamanho da célula, decréscimo de proliferação e inibição da síntese de DNA (Qiao et al., 2008).

No presente estudo, observou-se, de forma significativa, que a expressão do RNAm do gene *GRP* estava diminuída nos tumores não funcionantes em comparação aos tumores funcionantes (GH, ACTH, e PRL), bem como em relação ao tecido hipofisário normal. A literatura mostra que o peptídeo denominado *GRP* atua como um fator de crescimento autócrino quando, juntamente com seu receptor (*GRPR*), encontra-se superexpresso. Além de ter ação como mitógeno, estudos mostram uma importante ação de *GRP* na morfologia celular e angiogênese. A observação da maior expressão do transcrito de *GRP* nos tumores funcionantes em relação aos tumores não funcionantes poderia ser explicada pelo fato dos tumores funcionantes, assim como a própria hipófise normal, possuírem células mais especializadas e comprometidas com a secreção hormonal, visto que o peptídeo liberador de gastrina está associado também à liberação hormonal como, por exemplo, no trato gastrointestinal e na secreção de enzimas pancreáticas. Por isso, é possível sugerir que *GRP* não esteja associado à tumorigênese, mas, sim, à secreção hormonal. Embora não foi do escopo deste estudo investigar a expressão do receptor de *GRP* (*GRPR*), fica cada vez mais premente a investigação da expressão desse gene nos tumores hipofisários. Informações atuais mostram a alta expressão da proteína em uma grande variedade de tumores, salientando não só uma relevância potencial na sinalização celular mediada por este receptor, como também um interessante alvo para futuras intervenções terapêuticas (Cornelio et al., 2007).

5.1.3 *RERG*

A utilização de análise *microarray* conduziu Finlin et al. (2001) à identificação de um novo membro da superfamília *Ras* em tumores de mama humanos. Por ser homólogo

aos integrantes da família *Ras* e regulado de maneira estrógeno-dependente, este gene foi nomeado *REG*. Tal gene possui propriedades bioquímicas características de *Ras*, incluindo uma habilidade intrínseca em ligar e hidrolisar GTP, contudo, a superexpressão de *REG* resulta em redução da taxa de proliferação celular, na inibição significativa do crescimento dependente e independente de ancoragem *in vitro* e no bloqueio de formação tumoral em camundongos *nude*. Além disso, *REG* perde qualquer sequência sinalizadora de prenilação COOH-terminal e exibe uma localização subcelular mais citosólica do que em membrana plasmática (Key et al., 2006; Hanker et al., 2008).

De acordo com os dados mencionados pelo grupo citado acima, o gene *REG* demonstrou expressão reduzida em tumores de mama primários com pobre prognóstico clínico, todavia, por outro lado, apresentou expressão elevada em tumores de mama positivos para receptores de estrógeno, os quais são considerados tumores de crescimento lento e com diagnóstico favorável. Dessa maneira, a localização de *REG* dentro de um grupo de expressão gênica que inclui o receptor de estrógeno, combinada à elevada expressão em linhagens celulares de mama positivas para o receptor e à presença de dois sítios potenciais de ligação para receptor de estrógeno dentro da região promotora, levaram Finlin et al. (2001) a sugerir *REG* como um gene responsivo ao estrógeno. Este fato foi comprovado a partir da indução de expressão do RNAm do gene *REG* em células MCF-7 estimuladas por β -estradiol, como também por meio da repressão com tamoxifeno. Por fim, Finlin et al. (2001) concluíram que a perda de expressão de *REG* poderia contribuir para a tumorigênese de mama.

Cabe ainda ressaltar que, em alguns tecidos tumorais, a expressão de *REG* demonstrou-se reduzida ou ausente quando comparada ao tecido normal, como, por exemplo, em tumores renais, de ovário e cólon. No entanto, as funções de *REG* são amplamente desconhecidas em outros tipos de tumores, como demonstrado por um estudo desenvolvido por Wang et al. (2006), no qual a expressão do gene foi reduzida em amostras de carcinoma hepatocelular de pacientes do sexo feminino, mas mostrou-se elevada nas amostras tumorais dos pacientes do sexo masculino.

A análise da expressão do RNAm do gene *REG* em tumores hipofisários demonstrou, de forma significativa, a maior expressão do transcrito em tumores não funcionantes em relação tanto aos tumores funcionantes (GH, ACTH, PRL) quanto ao tecido hipofisário normal. Por ser um gene regulado por estrogênio, esperava-se que a expressão de *REG* estivesse aumentada em tumores secretores de prolactina, nos quais a presença de receptores estrogênicos é superior quando comparada aos demais subtipos de tumores hipofisários, como demonstra um recente estudo que caracterizou a expressão dos receptores estrogênicos em tumores de hipófise. Os autores observaram que apenas 19% dos tumores tinham expressão de receptor de estrogênio, desses, 60% eram produtores de prolactina (Burdman et al., 2008). No presente estudo, porém, a maior expressão concentrou-se, especificamente, nos tumores não funcionantes de pacientes do sexo masculino, logo, sugeriu-se que neste subgrupo tumoral o gene *REG* não estaria atuando como um gene supressor de tumor, como destacado por Wang et al. (2006) na hepatocarcinogênese de pacientes do sexo masculino. Embora os mecanismos detalhados permaneçam a ser investigados, este estudo oferece nova luz ao conhecimento da função do gene *REG* e seus resultados são os primeiros a demonstrar

a expressão deste gene em tumores hipofisários, não como um gene supressor de crescimento, mas, talvez, atuando como um oncogene.

5.2 Dissociação entre a expressão do transcrito e a expressão protéica

Na presente investigação, a observação da expressão diferencial do RNA mensageiro dos genes pesquisados entre os diferentes subtipos tumorais hipofisários e a dissociação entre a expressão do transcrito e a expressão protéica sugeriram a participação não só de mecanismos regulatórios transcricionais, mas também de mecanismos pós-transcricionais na regulação da expressão gênica, de modo que enquanto os primeiros podem ser responsáveis pela diferença na modulação do transcrito, os últimos, por sua vez, podem ainda ser responsabilizados pela similaridade da expressão protéica entre os tecidos avaliados.

Greenbaum et al. (2003) declararam que as quantificações de RNA mensageiro e proteínas não representam um exercício em redundância, ao contrário, são complementares e ambas necessárias para um completo entendimento de como a célula trabalha. No entanto, mesmo com o significativo desenvolvimento nas tecnologias utilizadas para a quantificação de proteínas, estas ainda permanecem atrasadas perante as técnicas utilizadas para determinar os valores de expressão de RNA mensageiro, os quais têm mostrado sua utilidade numa larga gama de aplicações, incluindo o diagnóstico e a classificação de cânceres, contudo, estes resultados são quase certamente apenas correlativos, antes de causativos, pois é mais provável que as verdadeiras forças causativas na célula sejam representadas pela concentração de proteínas e suas interações.

Dessa maneira, em função da habilidade limitada para a quantificação de proteínas, pesquisadores buscam encontrar correlações entre a expressão do transcrito e os dados de expressão das proteínas na esperança de determinar a expressão protéica a partir dos experimentos de quantificação de RNA mensageiro, mais copiosos, sensíveis e tecnicamente mais fáceis. No entanto, até então, as correlações estabelecidas entre as duas moléculas são mínimas.

Ainda segundo Greenbaum et al. (2003), há, presumivelmente, ao menos três razões para a pobre correlação entre os níveis de RNA mensageiro e os níveis de proteínas, e estas podem não ser mutuamente exclusivas. Primeiramente, há muitos mecanismos pós-transcricionais complicados e variados envolvidos na transformação do RNA mensageiro em proteína que não são suficientemente bem definidos para serem capazes de determinar concentrações de proteínas a partir de RNA mensageiro; segundo, proteínas podem diferir substancialmente em sua meia-vida in vivo; e/ou terceiro, há um significativo montante de erros tanto nos experimentos que envolvem o RNA mensageiro quanto naqueles que incluem a proteína que limitam a habilidade em gerar uma figura clara.

Nessas condições, o uso de padrões de expressão de RNA mensageiro é insuficiente para o entendimento da expressão de produtos protéicos, logo, mecanismos pós-transcricionais adicionais, incluindo tradução protéica, modificações pós-traducionais e degradação, podem influenciar a concentração de uma proteína presente em uma dada célula ou tecido.

Outros estudos relatam a ausência de correlação entre transcrito e proteína (Schindler et al., 1990; Trembley et al., 1996; Chen et al., 2002; Gu et al., 2006; Morgan et al., 2006), sendo este mais um a apresentar o fenômeno.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

Os tumores clinicamente não funcionantes apresentaram um perfil de expressão gênica distinto dos demais tumores hipofisários considerados funcionantes ou secretores (GH, ACTH e PRL) pelo menos em relação aos quatro genes estudados, sugerindo que sejam modulados de maneira distinta durante o processo tumorigênico das neoplasias hipofisárias.

Enquanto o transcrito dos genes *CRABP1*, *CRABP2* e *GRP* mostraram expressão reduzida em grupos tumorais específicos quando comparados ao tecido hipofisário normal, o transcrito do gene *REG* demonstrou expressão elevada.

A expressão protéica dos genes analisados não demonstrou diferença em relação aos diferentes subtipos de tumores hipofisários estudados.

ANEXOS

Anexo A – Serviço de verificação de óbito.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
 D A ⁴¹ Universidade de São Paulo
 FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 CAIXA POSTAL 8091
 SÃO PAULO – BRASIL
FACULDADE DE MEDICINA

Ao Ilmo.
 Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci

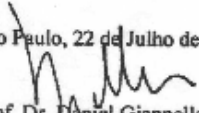
Venho por meio desta solicitar permissão para obtenção de fragmentos de tecidos humanos proveniente de autópsia para uso comparativo no laboratório de investigação médica (LIM-25). Necessito quantidade pequena de material já que vamos analisar o RNAm desses tecidos, proveniente de 3 (três) indivíduos. O material será coletado em pequenos tubos ($\approx 1 \times 3$ cm) e imediatamente colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80° C. Será feita extração de RNAm e verificação da sua integridade.

Pela fragilidade e facilidade com que o RNAm dos tecidos são degradados em todo esse processo de coleta, é possível que algum material obtido não tenha a integridade necessária, sendo importante uma nova coleta.

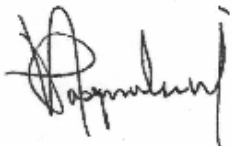
Tecidos necessários: 1) Hipófise, 2) Fígado, 3) Rim, 4) Pâncreas e 5) Timo.

Desde já, agradeço.

São Paulo, 22 de Julho de 2002.


 Prof. Dr. Daniel Giannella-Neto
 Chefe da Unidade de Diabetes da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia
 Laboratório de Investigação Médica – LIM-25
 Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

*Antecipada a retirada de fragmentos
 de 3 (três) autópsias.*

 23/7/2002

© OXMA

Anexo B – Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP.



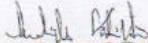
APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24.08.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 643/06, intitulado: "Análise da expressão dos genes RGS2, CRABP1, CRABP2, GRP e BRS3 em adenomas hipofisários dos diferentes subtipos e sua correlação com as variáveis clínicas e laboratoriais", apresentado pelo Departamento de Clínica Médica, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Ricardo Rodrigues Giorgi**

CAPPesq, 24 de Agosto de 2006.


PROF. DR. EUCLIDES AYRÉS DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo C – Termo de consentimento livre e esclarecido.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO – BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do paciente:

.....

Documento de identidade Nº:

Sexo: M F **Data de nascimento:**/...../.....

Endereço:

Nº: **Apto:** **Complemento:**

Bairro: **Cidade:**

CEP: **Telefone:** DDD (.....)

2. Responsável legal:

.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

Documento de identidade Nº:

Sexo: M F **Data de nascimento:**/...../.....

Endereço:

Nº: **Apto:** **Complemento:**

Bairro: **Cidade:**

CEP: **Telefone:** DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do protocolo de pesquisa: Análise da expressão dos genes *CRABP1*, *CRABP2*, *GRP* e *RERG* em adenomas hipofisários funcionantes e clinicamente não funcionantes.

2. Pesquisador: Ricardo Rodrigues Giorgi

Cargo/Função: Biologista

Inscrição Conselho Regional: CRBM Nº 5601

UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica – Endocrinologia

3. Avaliação do risco da pesquisa:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO

X

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo).

4. Duração da pesquisa: 24 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa. Trata-se de um estudo observacional no qual será aferida a expressão de alguns genes com possíveis implicações na formação ou progressão dos tumores hipofisários.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais. Para avaliarmos a expressão gênica será utilizado o RNA mensageiro das amostras de tumores hipofisários obtidos durante o ato cirúrgico. Também serão utilizados kits comercialmente disponíveis para análise da magnitude de expressão dos RNAs e proteínas dos diferentes tumores.

3. Desconfortos e riscos esperados. As amostras de tecido tumoral coletadas para dosagem dos RNAs mensageiros farão parte da peça cirúrgica já prevista, sem lesão que possa significar risco de qualquer natureza para o paciente, exceto os inerentes do próprio ato cirúrgico.

4. Benefícios que poderão ser obtidos. Não há previsão de ressarcimentos financeiros e nem de benefícios imediatos para os sujeitos da pesquisa. No entanto, os resultados obtidos poderão ser úteis para um melhor entendimento das alterações fisiopatológicas que ocorrem no desenvolvimento ou progressão dos tumores hipofisários, o que poderá ter implicações prognósticas e terapêuticas futuras.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo. No momento não há compreensão dos aspectos moleculares que poderão proporcionar bases para terapêuticas futuras.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer dúvidas que possam surgir.
2. Você tem liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência médica que você recebe no Hospital das Clínicas.
3. Os resultados obtidos nesta pesquisa são confidenciais, sendo mantidos em sigilo.
4. Caso aconteçam danos a sua saúde decorrentes desta pesquisa, você receberá assistência no Hospital das Clínicas da FMUSP durante todo o período abrangente nesse estudo, que terá duração de dois anos a contar da data de aprovação pela comissão de ética.

V - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS

Caso você tenha alguma dúvida ou apresente algum problema, entre em contato com:

Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi

Av. Dr. Arnaldo, 455, 4º andar, sala 4305

Telefones: 3061-7253 Ramal 14

VI - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo,.....de.....de.....

**Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal**

**Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)**

BIBLIOGRAFIA

7 Referências bibliográficas

Asa SL, Cheng Z, Ramyar L, Singer W, Kovacs K, Smyth HS, Muller P. Human pituitary null cell adenomas and oncocytomas in vitro: effects of adenohipophysiotropic hormones and gonadal steroids on hormone secretion and tumor cell morphology. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 74(5):1128-1134.

Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(11):836-849.

Asa SL, Kovacs K. Clinically non-functioning human pituitary adenomas. *Can J Neurol Sci.* 1992; 19 (2):228-235.

Asa SL, Somers K, Ezzat S. The MEN-1 gene is rarely down-regulated in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(9):3210-3212.

Bahar A, Bicknell JE, Simpson DJ, Clayton RN, Farrell WE. Loss of expression of the growth inhibitory gene GADD45gamma, in human pituitary adenomas, is associated with CpG island methylation. *Oncogene.* 2004; 23(4):936-944.

Bates AS, Farrell WE, Bicknell EJ, McNicol AM, Talbot AJ, Broome JC, Perrett CW, Thakker RV, Clayton RN. Allelic deletion in pituitary adenomas reflects aggressive biological activity and has potential value as a prognostic marker. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(3):818-824.

Boylan JF, Gudas LJ. Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *J Cell Biol.* 1991; 112(5):965-979.

Boylan JF, Gudas LJ. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem.* 1992; 267(30):21486-21491.

Bronstein MD, Melmed S. Tumorigênese hipofisária. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005; 49(5):615-625.

Brtko J, Thalhamer J. Renaissance of the biologically active vitamin A derivatives: established and novel directed therapies for cancer and chemoprevention. *Curr Pharm Des.* 2003; 9(25):2067-2077.

Budhu A, Gillilan R, Noy N. Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II. *J Mol Biol.* 2001; 305(4):939-949.

Budhu AS, Noy N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(8):2632-2641.

Bunnett N. Gastrin releasing peptide. In: Walsh JH, Dockray GJ. *Gut Peptides: Biochemistry and Physiology*. New York: Raven Press; 1994. p.423–445.

Burdman JA, Pauni M, Heredia Sereno GM, Bordón AE. Estrogen receptors in human pituitary tumors. *Horm Metab Res.* 2008; 40(8):524-527.

Cai WY, Alexander JM, Hedley-Whyte ET, Scheithauer BW, Jameson JL, Zervas NT, Klibanski A. ras mutations in human prolactinomas and pituitary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78(1):89-93.

Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 1996; 10(9):940-954.

Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR, Debelenko LV, Zhuang Z, Lubensky IA, Liotta LA, Crabtree JS, Wang Y, Roe BA, Weisemann J, Boguski MS, Agarwal SK, Kester MB, Kim YS, Heppner C, Dong Q, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science.* 1997; 276(5311):404-7.

Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(4):304-313.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156-159.

Cornelio DB, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol*. 2007;18(9):1457-1466.

Danila DC, Zhang X, Zhou Y, Dickersin GR, Fletcher JA, Hedley-Whyte ET, Selig MK, Johnson SR, Klibanski A. A human pituitary tumor-derived folliculostellate cell line. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85(3):1180-1187.

De Thé H, Vivanco-Ruiz MM, Tiollais P, Stunnenberg H, Dejean A. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature*. 1990; 343(6254):177-180.

Desiderio DM, Zhan X. The human pituitary proteome: the characterization of differentially expressed proteins in an adenoma compared to a control. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2003; 49(5):689-712.

Devnath S, Inoue K. An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J Neuroendocrinol.* 2008; 20(6):687-691.

Donato LJ, Noy N. Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Res.* 2005; 65(18):8193-8199.

Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem.* 1999; 274(34):23695-8.

Erspamer V, Erpamer GF, Inselvini M. Some pharmacological actions of alytesin and bombesin. *J Pharm Pharmacol.* 1970; 22(11):875-876.

Evans CO, Moreno CS, Zhan X, McCabe MT, Vertino PM, Desiderio DM, Oyesiku NM. Molecular pathogenesis of human prolactinomas identified by gene expression profiling, RT-qPCR, and proteomic analyses. *Pituitary.* 2008; 11(3):231-45.

Evans CO, Reddy P, Brat DJ, O'Neill EB, Craige B, Stevens VL, Oyesiku NM. Differential expression of folate receptor in pituitary adenomas. *Cancer Res.* 2003; 63(14):4218-4224.

Evans CO, Young AN, Brown MR, Brat DJ, Parks JS, Neish AS, Oyesiku NM. Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(7):3097-3107.

Faglia G. Epidemiology and pathogenesis of pituitary adenomas. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1993; 129(Suppl 1):1-5.

Finlin BS, Gau CL, Murphy GA, Shao H, Kimel T, Seitz RS, Chiu YF, Botstein D, Brown PO, Der CJ, Tamanoi F, Andres DA, Perou CM. RERG is a novel ras-related, estrogen-regulated and growth-inhibitory gene in breast cancer. *J Biol Chem.* 2001; 276(45):42259-42267.

Giorgi RR, Correa-Giannella ML, Casarini AP, Machado MC, Bronstein MD, Cescato VA, Giannella-Neto D. Metallothionein isoform 3 gene is differentially expressed in corticotropin-producing pituitary adenomas. *Neuroendocrinology.* 2005; 82(3-4):208-214.

Goelden U, Pfoertner S, Hansen W, Toepfer T, von Knobloch R, Hofmann R, Buer J, Schrader AJ. Expression and functional influence of cellular retinoic acid-binding protein II in renal cell carcinoma. *Urol Int.* 2005; 75(3):269-276.

Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol.* 2003; 4(9):117.

Gu X, Lundqvist EN, Coates PJ, Thurfjell N, Wettersand E, Nylander K. Dysregulation of TAp63 mRNA and protein levels in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(1):137-141.

Guru SC, Goldsmith PK, Burns AL, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS, Chandrasekharappa SC. Menin, the product of the MEN1 gene, is a nuclear protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(4):1630-1634.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica.* 10a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002. Cap.75, p.791-801. Os hormônios hipofisários e seu controle pelo hipotálamo.

Hanker AB, Morita S, Repasky GA, Ross DT, Seitz RS, Der CJ. Tools to study the function of the Ras-related, estrogen-regulated growth inhibitor in breast cancer. *Methods Enzymol.* 2008; 439:53-72.

Hawthorn L, Stein L, Varma R, Wiseman S, Loree T, Tan D. TIMP1 and SERPIN-A overexpression and TFF3 and CRABP1 underexpression as biomarkers for papillary thyroid carcinoma. *Head Neck.* 2004; 26(12):1069-1083.

Heaney AP, Singson R, McCabe CJ, Nelson V, Nakashima M, Melmed S. Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours. *Lancet*. 2000; 355(9205):716-719.

Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990; 71(6):1427-1433.

Huang Y, de la Chapelle A, Pellegata NS. Hypermethylation, but not LOH, is associated with the low expression of MT1G and CRABP1 in papillary thyroid carcinoma. *Int J Cancer*. 2003; 104(6):735-744.

Jackson TA, Koterwas DM, Bradford AP. Differential regulation of cell growth and gene expression by FGF-2 and FGF-4 in pituitary lactotroph GH4 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2006; 247(1-2):183-191.

Jing Y, Waxman S, Mira-y-Lopez R. The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signaling in breast cancer cells. *Cancer Res*. 1997; 57(9):1668-1672.

Karga HJ, Alexander JM, Hedley-Whyte ET, Klibanski A, Jameson JL. Ras mutations in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992; 74(4):914-919.

Katznelson L, Alexander JM, Klibanski A. Clinical review 45: Clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76(5):1089-1094.

Kelley MJ, Linnoila RI, Avis IL, Georgiadis MS, Cuttitta F, Mulshine JL, Johnson BE. Antitumor activity of a monoclonal antibody directed against gastrin-releasing peptide in patients with small cell lung cancer. *Chest.* 1997; 112(1):256-261.

Key MD, Andres DA, Der CJ, Repasky GA. Characterization of RERG: an estrogen-regulated tumor suppressor gene. *Methods Enzymol.* 2006; 407:513-527.

Kiaris H, Schally AV, Nagy A, Sun B, Armatis P, Szepeshazi K. Targeted cytotoxic analogue of bombesin/gastrin-releasing peptide inhibits the growth of H-69 human small-cell lung carcinoma in nude mice. *Br J Cancer.* 1999; 81(6):966-971.

Kim S, Hu W, Kelly DR, Hellmich MR, Evers BM, Chung DH. Gastrin-releasing peptide is a growth factor for human neuroblastomas. *Ann Surg.* 2002; 235(5):621-630.

Knudson AG . Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-823.

Kovacs K, Horvath E. Pathology of pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1987; 16(3):529-551.

Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature*. 1989; 340(6236):692-696.

Lattuada D, Viganó P, Mangioni S, Sassone J, Di Francesco S, Vignali M, Di Blasio AM. Accumulation of retinoid X receptor-alpha in uterine leiomyomas is associated with a delayed ligand-dependent proteasome-mediated degradation and an alteration of its transcriptional activity. *Mol Endocrinol*. 2007; 21(3):602-612.

Lemmens I, Van de Ven WJM, Kas K, Zhang CX, Giraud S, Wautot V, Buisson N, De Witte K, Salandre J, Lenoir G, Pugeat M, Calender A, Parente F, Quincey D, Gaudray P, De Wit MJ, Lips CJM, Höppener JWM, Khodaei S, Grant AL, Weber G, Kytölä S, Teh BT, Farnebo F, Phelan C, Hayward N, Larsson C, Pannett AAJ, Forbes SA, Basset JHD, Thakker RV. Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. *Hum Mol Genet*. 1997; 6(7):1177-1183.

Lind GE, Kleivi K, Meling GI, Teixeira MR, Thisis-Evensen E, Rognum TO, Lothe RA. ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis. *Cell Oncol*. 2006; 28(5-6):259-72.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001; 25(4):402-408.

Lopes MB, Scheithauer BW, Schiff D. Pituitary carcinoma: diagnosis and treatment. *Encocrine*. 2005; 28(1):115-121.

Machiavelli G, Cotignola J, Danilowicz K, Carbonara C, Paes de Lima A, Basso A, Bruno OD, Szijan I. Expression of p16(INK4A) gene in human pituitary tumours. *Pituitary*. 2008;11(1):71-75.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995; 83(6):835-839.

Manor D, Shmidt EN, Budhu A, Flesken-Nikitin A, Zgola M, Page R, Nikitin AY, Noy N. Mammary carcinoma suppression by cellular retinoic acid binding protein-II. *Cancer Res*. 2003; 63(15):4426-4433.

Martínez A, Zudaire E, Julián M, Moody TW, Cuttitta F. Gastrin-releasing peptide (GRP) induces angiogenesis and the specific GRP blocker 77427 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Oncogene*. 2005; 24(25):4106-13.

McCabe CJ, Gittoes NJ, Sheppard MC, Franklyn JA. Increased MEN1 mRNA expression in sporadic pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999; 50(6):727-733.

McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, Heaney AP, Tannahill LA, Hussain S, Mitchell R, Olliff J, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittoes NJ. Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003; 58(2):141-150.

McDonald TJ, Jörnvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979; 90(1):227-233.

Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*. 2003; 112 (11):1603-1618.

Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;114(2):541-548.

Moreno CS, Evans CO, Zhan X, Okor M, Desiderio DM, Oyesiku NM. Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer Res*. 2005; 65(22):10214-10222.

Morgan EE, Chandler MP, Young ME, McElfresh TA, Kung TA, Rennison JH, Tserng KY, Hoit BD, Stanley WC. Dissociation between gene and protein expression of metabolic enzymes in a rodent model of heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2006; 8(7):687-93.

Morris DG, Musat M, Czirják S, Hanzély Z, Lillington DM, Korbonits M, Grossman AB. Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis. *Eur J Endocrinol.* 2005; 153(1):143-151.

Ogino S, Cantor M, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner GJ, Weisenberger DJ, Campan M, Laird PW, Loda M, Fuchs CS. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut.* 2006; 55(7):1000-1006.

Okuducu AF, Janzen V, Ko Y, Hahne JC, Lu H, Ma ZL, Albers P, Sahin A, Wellmann A, Scheinert P, Wernert N. Cellular retinoic acid-binding protein 2 is down-regulated in prostate cancer. *Int J Oncol.* 2005; 27(5):1273-1282.

Ong DE, Newcomer M, Chytil F. Cellular retinoid binding proteins. In: Goodman DS. *The retinoids, biology chemistry, and medicine.* 2nd ed. New York: Raven Press; 1994. p.283-318.

Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1766(1):23-41.

Pei L, Melmed S, Scheithauer B, Kovacs K, Prager D. H-ras mutations in human pituitary carcinoma metastases. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78(4):842-846.

Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol*. 1997; 11(4):433-441

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(9):e45.

Pfoertner S, Goelden U, Hansen W, Toepfer T, Geffers R, Ukena SN, von Knobloch R, Hofmann R, Buer J, Schrader AJ. Cellular retinoic acid binding protein I: expression and functional influence in renal cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2005; 26(6):313-323.

Plantier L, Rochette-Egly C, Goven D, Boutten A, Bonay M, Lesèche G, Fournier M, Crestani B, Boczkowski J. Dysregulation of elastin expression by fibroblasts in pulmonary emphysema: role of cellular retinoic acid binding protein 2. *Thorax*. 2008; 63(11):1012-1017.

Qiao J, Kang J, Ishola TA, Rychahou PG, Evers BM, Chung DH. Gastrin-releasing peptide receptor silencing suppresses the tumorigenesis and metastatic potential of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(35):12891-12896.

Ragel BT, Couldwell WT. Pituitary carcinoma: a review of the literature. *Neurosurg Focus*. 2004; 16(4):article 7, 1-9.

Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev*. 2000; 80(3):1021-1054.

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press; 2000. p.365–386. Available program from: http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi.

Rozengurt E. Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *J Cell Physiol*. 1998; 177(4):507-17.

Satta MA, Korbonits M, Jacobs RA, Bolden-Dwinfour DA, Kaltsas GA, Vangeli V, Adams E, Fahlbusch R, Grossman AB. Expression of menin gene mRNA in pituitary tumours. *Eur J Endocrinol*. 1999;140(4):358-361.

Scheithauer BW, Kovacs KT, Laws ER Jr, Randall RV. Pathology of invasive pituitary tumors with special reference to functional classification. *J Neurosurg.* 1986; 65(6): 733-744.

Schindler R, Clark BD, Dinarello CA. Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem.* 1990; 265(18):10232-10237.

Spada A, Arosio M, Bochicchio D, Bazzoni N, Vallar L, Bassetti M, Faglia G. Clinical, biochemical, and morphological correlates in patients bearing growth hormone-secreting pituitary tumors with or without constitutively active adenylyl cyclase. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990; 71(6):1421-11426.

Spindel ER. Mammalian bombesin-like peptides. *Trends Neurosci.* 1986; 9: 130-133.

Takahashi M, Yang XJ, Lavery TT, Furge KA, Williams BO, Tretiakova M, Montag A, Vogelzang NJ, Re GG, Garvin AJ, Söderhäll S, Kagawa S, Hazel-Martin D, Nordenskjöld A, Teh BT. Gene expression profiling of favorable histology Wilms tumors and its correlation with clinical features. *Cancer Res.* 2002; 62(22):6598-6605.

Tanaka K, Imoto I, Inoue J, Kozaki K, Tsuda H, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Iwai T, Kawano T, Inazawa J. Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma. *Oncogene*. 2007; 26(44):6456-6468.

Thompson M, Lapointe J, Choi YL, Ong DE, Higgins JP, Brooks JD, Pollack JR. Identification of candidate prostate cancer genes through comparative expression-profiling of seminal vesicle. *Prostate*. 2008; 68(11):1248-1256.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(15):8681-8686.

Trembley JH, Ebbert JO, Kren BT, Steer CJ. Differential regulation of cyclin B1 RNA and protein expression during hepatocyte growth in vivo. *Cell Growth Differ*. 1996; 7(7):903-916.

Valença MM, Elias LLK, Elias PCL, Picanço-Diniz DLW, Castro M, Martins C, Antunes-Rodrigues J. Anatomia e fisiologia do hipotálamo e da glândula pituitária. In: Cukiert A, Liberman B. *Neuroendocrinologia clínica e cirúrgica*. São Paulo: Lemos Editorial; 2002. p.21-79.

Valença MM, Martins C, Antunes-Rodrigues J. Anatomia e embriologia do hipotálamo e da hipófise. In: Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, Elias LLK, Castro M. *Neuroendocrinologia básica e aplicada*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2005. p.41-51.

Viallet J, Minna JD. Gastrin-releasing peptide (GRP, mammalian bombesin) in the pathogenesis of lung cancer. *Prog Growth Factor Res*. 1989; 1(2):89-97.

Wang AG, Fang W, Han YH, Cho SM, Choi JY, Lee KH, Kim WH, Kim JM, Park MG, Yu DY, Kim NS, Lee DS. Expression of the RERG gene is gender-dependent in hepatocellular carcinoma and regulated by histone deacetyltransferases. *J Korean Med Sci*. 2006; 21(5):891-896.

Williamson EA, Daniels M, Foster S, Kelly WF, Kendall-Taylor P, Harris PE. Gs alpha and Gi2 alpha mutations in clinically non-functioning pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1994; 41(6):815-820.

Williamson EA, Ince PG, Harrison D, Kendall-Taylor P, Harris PE. G-protein mutations in human pituitary adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas. *Eur J Clin Invest*. 1995; 25(2):128-131.

Woloschak M, Yu A, Xiao J, Post KD. Frequent loss of the P16INK4a gene product in human pituitary tumors. *Cancer Res.* 1996; 56(11):2493-2496.

Won JY, Nam EC, Yoo SJ, Kwon HJ, Um SJ, Han HS, Kim SH, Byun Y, Kim SY. The effect of cellular retinoic acid binding protein-I expression on the CYP26-mediated catabolism of all-trans retinoic acid and cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma. *Metabolism.* 2004; 53(8):1007-1012.

Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut.* 2007; 56(1):140-148.

Wu Q, Lothe RA, Ahlquist T, Silins I, Tropé CG, Micci F, Nesland JM, Suo Z, Lind GE. DNA methylation profiling of ovarian carcinomas and their in vitro models identifies HOXA9, HOXB5, SCGB3A1, and CRABP1 as novel targets. *Mol Cancer.* 2007; 6:45.

Wu X, Blanck A, Norstedt G, Sahlin L, Flores-Morales A. Identification of genes with higher expression in human uterine leiomyomas than in the corresponding myometrium. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8(3):246-254.

Yeung CM, Chan CB, Leung PS, Cheng CHK. Cells of the anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(9):1441-1449.

Zaitseva M, Vollenhoven BJ, Rogers PA. Retinoic acid pathway genes show significantly altered expression in uterine fibroids when compared with normal myometrium. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(8):577-585.

Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD, Melmed S. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol.* 1999a; 13(1):156-166.

Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999b; 84(2):761-767.

Zhang X, Sun H, Danila DC, Johnson SR, Zhou Y, Swearingen B, Klibanski A. Loss of expression of GADD45 gamma, a growth inhibitory gene, in human pituitary adenomas: implications for tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(3):1262-1267.