

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Frederico Giacomoni Pesce

**Perfil de reguladores moleculares da
tumorigênese hipofisária: pesquisa
de biomarcadores para os adenomas
hipofisários.**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2015**

Frederico Giacomoni Pesce

Perfil de reguladores moleculares da tumorigênese hipofisária: pesquisa de biomarcadores para os adenomas hipofisários.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Beatriz da Fonte Kohek
Co-orientadora: MSc. Lisiane Cervieri Mezzomo

**Porto Alegre
2015**

Catálogo na Publicação

Giacomoni Pesce, Frederico

Perfil de reguladores moleculares da tumorigênese hipofisária: pesquisa de biomarcadores para os adenomas hipofisários. / Frederico Giacomoni Pesce. -- 2015.

59 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2015.

Orientador(a): Maria Beatriz da Fonte Kohek ;
coorientador(a): Lisiane Cervieri Mezzomo.

1. Adenomas hipofisários. 2. Ciclo celular. 3. Sinalização celular. 4. RPRM. 5. Notch3. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

À Prof.^a. Maria Beatriz Kohek pela sua máxima dedicação a este trabalho, por compreender as dificuldades encontradas e por participar de forma fundamental para superá-las. Sou grato, também, à Lisiane Mezzomo por transferir a mim o seu conhecimento e pelo grande auxílio nas atividades práticas e que foram determinantes para a execução deste projeto.

Agradeço ao grupo de Neuroendocrinologia do Hospital São José da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre por me possibilitar os meios para realizar este trabalho; ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre pela oportunidade de obter este título; e à equipe do Laboratório de Biologia Molecular desta instituição por fornecer as ferramentas necessárias e auxiliar na metodologia deste trabalho. Ainda, agradeço à Prof.^a. Marilu Fiegenbaum pela revisão deste trabalho e pelas suas valiosas contribuições.

Finalmente, agradeço à minha família pelo estímulo para superar os desafios que ocorreram ao longo deste período e pela paciência durante os momentos em que estive ausente.

Sumário

Agradecimentos	II
Lista de Abrevituras	IV
Resumo	VI
1. Introdução	8
1.1. Adenomas Hipofisários	8
1.2. Ciclo Celular	19
1.2.1 Proteína Reprimida	22
1.3. Sinalização Celular	25
1.3.1. Família de receptores Notch	26
1.3.1.1. Receptor Notch3	28
1.4. Referências Bibliográficas	31
2. Objetivos	37
2.1. Objetivo geral	37
2.2. Objetivos específicos	37
3. Artigo científico	38
4. Considerações Finais	60
5. Anexos	62
5.1. Anexo I – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).	62
5.2. Anexo II – Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFCSPA).	64
5.2. Anexo III – Normas da revista para submissão de artigo científico.	66

Lista de abreviaturas utilizadas

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

AF: Adenoma hipofisário funcionante

ANF: Adenoma hipofisário não-funcionante

AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico

CADASIL: Síndrome degenerativa arteriopatía cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia

CDK: Cinase dependente de ciclina

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar

CKI: Inibidor de cinase dependente de ciclina

CNC: Complexo de Carney

DNA : Ácido desoxirribonucléico

FSH: Hormônio foliculo- estimulante

G₀: Gap0

G1: Gap1

G2: Gap2

GH: Hormônio do crescimento

GTP: Proteína ligadora de trifosfato de guanosina

HE: Hematoxilina/eosina

IHQ: Imuno-histoquímica

JAG1: Jagged1

LH: Hormônio luteinizante

M: Mitose

MEN1: Neoplasia endócrina tipo I

miRNA: Micro ácido ribonucléico

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PGK1: gene fosfoglicerato quinase 1

pRB: Proteína retinoblastoma

PRL: Prolactina

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RB1: Gene retinoblastoma 1

RM: Ressonância magnética

RNA: Ácido ribonucleico

RNAm: Ácido ribonucléico mensageiro

RPRM: Gene reprimido

S: Síntese

SNC: Sistema nervoso central

TC: Tomografia computadorizada

TSG: Gene supressor de tumor

TSH: Hormônio tireotrófico

UV: Ultravioleta

Resumo da Dissertação

Introdução: os adenomas hipofisários são neoplasias benignas de comum ocorrência e produzem sintomas devido à secreção hormonal anômala ou decorrentes da compressão de estruturas próximas à hipófise. Estudos dos fatores de regulação do ciclo celular e de sinalização celular têm demonstrado variadas alterações em marcadores moleculares nesta patologia. Reprimo é uma proteína responsável por impedir a progressão do ciclo celular que tem expressão suprimida em tumores variados. Com ação oposta, o receptor de membrana Notch3 e o seu ligante Jagged1 estão relacionados à proliferação e maturação celular e o aumento da expressão destes marcadores está relacionado à tumorigênese. Já foi evidenciada a redução da expressão do gene Reprimo (RPRM), assim como aumento da expressão dos genes Notch3 e Jagged1 em adenomas de hipófise, fornecendo indícios da participação destes fatores no desenvolvimento tumoral.

Objetivos: analisar o perfil de expressão relativa dos genes RPRM, NOTCH3 e JAG1 em amostras de adenomas hipofisários e correlacionar com as diferentes linhagens dos tumores hipofisário humanos.

Material e Métodos: quarenta e nove pacientes com diagnóstico de adenoma hipofisário funcionante produtor de GH, PRL, ACTH, TSH e de adenoma não funcionante foram confirmados pela análise histológica e selecionados para o estudo. A expressão relativa dos genes de interesse foi realizada pelo método de PCR-quantitativo a partir de cDNA das amostras do tecido hipofisário.

Resultados: o gene JGA1 não apresentou expressão diferencial entre as amostras estudadas. O gene RPRM apresentou hipoexpressão somente nos ANF em relação aos somatotropinomas. O gene NOTCH3 apresentou hiperexpressão nos ANF em relação aos somatotropinomas e prolactinomas.

Conclusões: A expressão diferencial dos genes RPRM e NOTCH3 identificadas em adenomas não funcionantes, somatotropinomas e prolactinomas, sugere o seu envolvimento na patogênese molecular tumoral hipofisária. Estudos prospectivos serão necessários para estabelecer o real papel destes genes como biomarcadores da proliferação e crescimento tumoral hipofisário.

Palavras-chave: adenomas hipofisários, ciclo celular, sinalização celular, tumorigênese, RPRM, Notch3.

1. Introdução

1.1. Adenomas Hipofisários

Os adenomas hipofisários são um grupo diverso de tumores que tem origem na hipófise. Sua etiologia permanece provocando grande interesse entre os pesquisadores devido a variabilidade na apresentação clínica e de sintomas, a imprevisibilidade do crescimento tumoral, bem como o manejo muitas vezes complexo destes pacientes (Asa e Ezzat, 2009; Davis e cols., 2001; Ezzat e cols., 2004).

Existe uma considerável incerteza com relação a real prevalência dos tumores hipofisários, com uma falta de conexão entre os resultados obtidos de série de autópsias ou radiológicas e os dados clínicos. De fato, por se tratarem de tumores de pequeno tamanho e por apresentarem-se sem sintomas ou com sintomas pouco específicos é um grande desafio medir precisamente a prevalência destes tumores na população em geral. As avaliações baseadas em populações não selecionadas submetidas à autópsia ou ressonância magnética (RM) sugerem que tumores da hipófise ocorrem com muita frequência. A análise histológica de espécimes obtidos em autópsias ou através de dados radiológicos (TC e RM) de pacientes em tratamento para condições relacionadas ou não à hipófise são a fonte usada para as estimativas da prevalência dos adenomas hipofisários na população. Uma meta-análise sugeriu uma prevalência média para tumores de hipófise de 14,4 e 22,5% em séries de autópsia e radiológica, respectivamente (Ezzat e cols., 2004). Em contraste, os poucos estudos

epidemiológicos realizados no passado indicaram que os tumores hipofisários ocorreram com baixa frequência, em uma taxa de 190-280 casos / milhão em geral (Davis e cols., 2001). Entre esses dois extremos a informação prática mais relevante, é que a prevalência dos tumores hipofisários está relacionada àqueles clinicamente aparentes ou aos tumores que obrigam à utilização dos recursos da saúde durante o seu diagnóstico, tratamento e acompanhamento. Recentemente, Daly e colaboradores sugeriram que adenomas hipofisários ocorrem com relativa frequência na população em geral, com uma taxa global de um caso em cada 1064 indivíduos da população (Daly e cols., 2006). Esses resultados indicam que os adenomas hipofisários clinicamente aparentes tem uma frequência maior do que se pensava anteriormente, o que aumenta a necessidade de compreender os mecanismos fisiopatológicos que dão origem a esses tumores.

Os tumores hipofisários possuem crescimento lento e sua prevalência aumenta de acordo com a idade, sendo mais comuns a partir da 3ª década de vida, além de ocorrerem em proporção equilibrada em ambos os sexos (Beckers e Daly, 2007). Embora considerados neoplasias benignas por não apresentarem potencial metastático, os adenomas de hipófise possuem grande capacidade de infiltração em estruturas locais, acarretando significativa morbidade em pacientes afetados, sendo este crescimento invasivo observado em cerca de um terço dos casos. Em porcentagens inferiores a 1%, porém, ocorre o desenvolvimento de carcinoma hipofisário, que é capaz de originar metástases a locais distantes do sistema nervoso central (SNC), ou outros tecidos, tais como, linfonodos e fígado (Asa e Ezzat, 2009).

A classificação dos tumores de hipófise sofreram diversas modificações desde a sua concepção. Historicamente, estes tumores foram classificados de acordo com o tamanho e divididos em microadenomas (dimensão < 1 cm) e macroadenomas (dimensão > 1 cm). No entanto, esta classificação foi melhorada por um sistema mais específico baseado na técnica imuno-histoquímica (IHQ) e microscopia eletrônica. Assim os adenomas hipofisários podem ser classificados como funcionantes ou não-funcionantes, dependendo da sua atividade hormonal *in vivo*. No início da análise microscópica, esses tumores foram agrupados de acordo com as características do citoplasma celular à luz da microscopia óptica frente à coloração por hematoxilina/eosina (HE) e divididos em acidófilos, basófilos e cromófbos. Este sistema de classificação limitado não considera a secreção hormonal ou a derivação celular de forma eficiente. Os adenomas acidófilos, classicamente, estão relacionados com a secreção de quantidades excessivas de hormônio do crescimento (GH), implicando na manifestação de acromegalia e gigantismo. Quanto aos basófilos, se associam à secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e, conseqüentemente, à doença de Cushing. Os tumores cromófbos, por sua vez, geralmente compreendem aqueles hormonalmente inativos. Hoje, no entanto, sabe-se que os adenomas acidófilos e basófilos podem secretar outros hormônios e que os cromófbos também podem ser hormonalmente ativos (Asa e Ezzat, 2009; Beckers e Daly, 2007; Kovacs e cols., 1996; Kovacs e cols., 2001).

O desenvolvimento da técnica de IHQ baseada na detecção de antígenos nos tecidos revolucionou a classificação dos adenomas hipofisários. Este método caracteriza os adenomas baseando o seu conteúdo hormonal com a informação

adicional fornecida pela imunorreatividade por fatores de transcrição e queratinas (Asa e Ezzat, 1998). A denominação atual baseia-se na qualidade do hormônio secretado, sendo então os adenomas considerados ativos ou inativos a partir do perfil endocrinológico apresentado. Os ativos, ou clinicamente funcionantes, são aqueles que apresentam concentrações hormonais séricas que excedem o valor normal e que apresentam manifestações clínicas. Os adenomas inativos, ou clinicamente não-funcionantes, contêm componentes secretores e celulares necessários para a produção hormonal, no entanto, não estão associados com evidências bioquímicas ou clínicas de excesso hormonal. Especula-se que as células produzam quantidades indetectáveis de hormônios ou hormônios anômalos não reconhecidos pelos anticorpos nos ensaios imunes utilizados em sua detecção ou que estas células tenham perdido a habilidade de produzir qualquer hormônio por algum defeito genético adquirido (Jaffrain-Rea e cols., 2009). Atualmente, esta classificação funcional tem sido ampliada e modificada incorporando os recentes avanços na pesquisa molecular e IHQ da hipófise (Kovacs e cols., 2001). As manifestações clínicas relacionadas aos adenomas de hipófise podem ser neurológicas, produzidas pelo crescimento de massa local que comprime estruturas íntimas do SNC, ou pelo estabelecimento de sintomas clínicos dependentes dos hormônios secretados, que variam de acordo com origem celular do tumor (Bahar e cols., 2004; Beckers e Daly, 2007; Melmed, 2011).

Adenomas somatotróficos, ou somatotropinomas, representam 10 a 15% dos adenomas hipofisários e são compostos, principalmente, por células produtoras de GH. O excesso de deste hormônio em adultos é conhecido como

acromegalia, sendo que o gigantismo resulta do excesso de GH que ocorre antes do fechamento das epífises com as diáfises (Asa e Ezzat, 2009; Biller e cols., 2010). A acromegalia tem apresentação variável, e a grande maioria dos casos é diagnosticada incidentalmente devido aos sintomas. Entretanto, as formas mais comuns de apresentação do excesso de GH compreendem no alargamento das mãos, pés, mandíbula e face, além de sudorese, pele gordurosa e síndrome do túnel do carpo. É comum, ainda, que pacientes afetados por somatotropinomas apresentem efeitos metabólicos como *diabetes mellitus*, hipertensão e formação de cálculos renais, sendo estas manifestações os indícios iniciais para o diagnóstico. Neste caso os pacientes podem apresentar sintomas atribuídos não somente à atividade hormonal, mas, também, diretamente ocasionados pela expansão da glândula hipófise, como cefaléia, distúrbios visuais ou hipopituitarismo (Clayton, 1997; Melmed, 2003).

Os prolactinomas, ou adenomas lactotróficos, são tumores que crescem a partir das células hipofisárias secretoras do hormônio prolactina (PRL) e são os adenomas de ocorrência mais comum. Apesar de representarem aproximadamente 50% dos adenomas encontrados incidentalmente em autópsias, a proporção da incidência desse tipo em séries cirúrgicas é mais baixa, provavelmente porque esses tumores são frequentemente tratados com terapia medicamentosa. Os prolactinomas são mais frequentes em mulheres, aparecendo principalmente em jovens que apresentam distúrbios hormonais. Em contraste, homens tendem a apresentar a doença mais tardiamente, com tumores maiores ou mais frequentemente com sintomas de efeito de compressão de massa e hipopituitarismo (Asa e Ezzat, 1998). Mulheres com prolactinomas usualmente

apresentam amenorréia e galactorréia, além de infertilidade e perda da libido, enquanto que nos homens os sintomas incluem infertilidade e impotência (Biller e cols., 2010; Kovacs e cols., 1996; Melmed, 2003).

Adenomas corticotróficos ou corticotropinomas compreendem 10 a 15% dos adenomas hipofisários e conduzem à hipersecreção de ACTH, causando a doença de Cushing (Kovacs e cols., 1996) e superestimulação dos esteróides suprarrenais devido ao estímulo crônico de ACTH, alterando o *feedback* negativo do eixo hipotalâmico-hipofisário-suprarrenal (Asa e Ezzat, 2009; Biller e cols., 2010; Mancini e cols., 2010). O hipercortisolismo resultante é responsável pelas características clínicas, que incluem: obesidade, estrias, elevação da pressão arterial, atrofia muscular, hirsutismo, acne, osteoporose, irregularidades menstruais e distúrbios psiquiátricos (Arnaldi e cols., 2003; Biller e cols., 2010; Findling e Raff, 2006; Mancini e cols., 2010). Em virtude das complicações cardiovasculares, o hipercortisolismo crônico está associado à maior taxa de mortalidade (Arnaldi e cols., 2003).

Os adenomas tireotróficos, ou tireotropinomas, ocorrem raramente, representando menos de 1% das neoplasias hipofisárias (Asa e Ezzat, 2009). Os pacientes apresentam excesso de hormônio tireotrófico (TSH) e características de hipertireoidismo. Da mesma forma, os adenomas gonadotróficos, também chamados gonadotropinomas são tumores pouco encontrados que secretam hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) intactos, sendo responsáveis pelo hipogonadismo e disfunção sexual (Kovacs e cols., 1996; Melmed, 2011).

Os adenomas clinicamente não-funcionantes ou não-secretóres tem sua definição baseada na clínica, que indica a ausência de sintomas ou de sinais secundários à hipersecreção hormonal tumoral, apesar de muitos deles sintetizarem gonadotrofinas ou suas subunidades (Greenman e Stern, 2009). Normalmente apresentam positividade imuno-histoquímica para um ou mais hormônios ou subunidades hormonais (Korbonits e Carlsen, 2009). Acredita-se que esses tumores produzam compostos biologicamente inativos, os quais não possuem atividade endócrina, sendo chamados de adenomas não reativos, ou *null cells* (Scheithauer e cols., 1986). Outra hipótese envolve a síntese ou liberação insuficiente de hormônios pelo tumor, ocorrendo concentrações hormonais não detectáveis no sangue (Kovacs e cols., 1996; Scheithauer e cols., 1986). Os tumores não secretóres representam 25% dos casos de adenomas hipofisários e usualmente são macroadenomas devido ao diagnóstico tardio, uma vez que os sintomas são geralmente decorrentes do crescimento tumoral (Scheithauer e cols., 1986). Desta forma, os pacientes tipicamente apresentam sinais de compressão de massa local, o que acarreta em cefaléia, insuficiência hipofisária e distúrbios visuais devido à proximidade da hipófise em relação ao quiasma óptico (Fernández-Balsells e cols., 2011; Losa e cols., 2001; Rishi e cols., 2010).

A fisiopatologia dos adenomas hipofisários tem recebido diversas contribuições a partir dos estudos realizados baseados na genética molecular destes tumores revelando um esforço concentrado desta área de pesquisa. Durante as duas últimas décadas, o avanço do conhecimento sobre os fatores envolvidos na ontogênese, fisiologia e genética da hipófise forneceram novas e

significativas informações sobre a regulação de vias ou mecanismos que podem levar à tumorigênese hipofisária. Além disso, as novas metodologias que permitem a exploração simultânea de centenas de genes e proteínas tornou-se uma ferramenta essencial para desvendar estes mecanismos. No entanto, são necessárias ainda a validação dos dados até agora obtidos com tais métodos de rastreio em grandes séries de tumores hipofisários, integrados com estudos funcionais.

Foram descritas mutações em uma série de genes, alguns relativamente frequentes e outros mais raros, caracterizados em uma configuração experimental. O principal deles é o gene *GNAS*, responsável pela codificação da subunidade α da proteína heterotrimérica *Gs*. As mutações ativadoras do gene, denominadas *gsp*, determinam a ativação constitutiva da subunidade α da proteína *Gs*, aumentando a atividade da adenilatociclase e, conseqüentemente promovendo a produção aumentada de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (Jaffrain-Rea e cols., 2009). Outras anormalidades genéticas associadas à tumorigênese hipofisária ou A características de proliferação anormal encontradas foram: mutações de non-sense (*PRKAR1*, *CDKN1B (p27Kip1)*) (Kirschner e cols., 2000); mutações inativadoras (*MEN1*) (Asa e cols., 1998); mutações pontuais (*PKC*); mutações com perda da heterozigosidade (*AIP*) (Boikos e Stratakis, 2007; Evans e cols., 2002), além do aumento da expressão gênica (*ciclina D1*, *PTTG*) (Franklin e cols., 1998); diminuição da expressão gênica (*BMP-4*); iniciação alternativa da transcrição (*Pdt-FGFR4*); e metilação do promotor (*GADD45G*, *MEG3a*, *p16*, *ZAC*, *Retinoblastoma*) (Franklin e cols., 1998; Melmed, 2003; Mezzomo e cols., 2012).

Embora raros, os adenomas familiares representam cerca de 5% dos casos de adenomas hipofisários (Daly e cols., 2005). Nesta classe estão incluídos os tumores que possuem predisposição genética para ocorrer, sendo que 50% desses casos configuram-se como Neoplasia Endócrina Tipo I (MEN1), também chamada Síndrome de Wermer, e Complexo de Carney (CNC), que constituem as principais patologias relacionadas ao desenvolvimento deste tipo de adenoma (Asa e cols., 1998; Jaffrain-Rea e cols., 2009; Tichomirowa e cols., 2009). A origem destes tumores é hereditária e as principais mutações que a determinam já são conhecidas. A MEN1, por exemplo, é resultante de uma mutação que ocorre no gene *MEN1*, geralmente também denominado *menin* (Asa e cols., 1998). A patologia conhecida como CNC, por sua vez, também possui relação com uma mutação já identificada, que ocorre no gene *PRKAR1A* (Kirschner e cols., 2000; Kaltsas e cols., 2002).

Estabeleceu-se que a tumorigênese dos adenomas esporádicos de hipófise ocorre de acordo com o modelo teórico da monoclonalidade, em que eventos genéticos ocorrem em uma célula isolada e a transformam, representando o início do desenvolvimento tumoral (Asa e Ezzat, 1998; Grossman, 2009; Tichomirowa e cols., 2009). Em nível tecidual, entretanto, os eventos podem ser mais complexos, pois a hipófise pode conter muitos tumores ou áreas hiperplásicas, cada uma com sua própria origem clonal, o que sugere que haja meios de comunicação celular também relacionados ao processo tumorigênico (Tichomirowa e cols., 2009). Os fatores iniciadores e promotores do tumor conferem aumento do potencial proliferativo do precursor celular para a formação do adenoma e o seu posterior crescimento. Esses fatores incluem anormalidades genéticas e epigenéticas,

desregulação dos fatores de crescimento parácrinos e alterações no microambiente hipofisário (Melmed, 2011). Desta forma, se reconhece que o desenvolvimento de adenomas hipofisários seja dependente de uma variedade de alterações nos fatores de regulação do ciclo celular, os quais contribuem para a proliferação (Tichomirowa e cols., 2009; Vandeva e cols., 2010). As causas primárias para esses eventos, contudo, permanecem desconhecidas (Melmed, 2011; Mezzomo e cols., 2012). Assim, os tumores hipofisários podem se desenvolver a partir de qualquer célula adeno-hipofisária.

Houve grande progresso na caracterização dos adenomas de hipófise e suas manifestações clínicas. Entretanto, os mecanismos moleculares da patogênese do tumor ainda permanecem desconhecidos. Os estudos na área têm se limitado à elucidação da etiologia das síndromes genéticas que predis põe ao surgimento de neoplasias hipofisárias: síndrome de McCune-Albright, CNC, MEN1, e mais recentemente na acromegalia e prolactinoma familiares, onde já se estabeleceu relação entre a ocorrência destes tumores e os genes, *MEN1*, *PRKAR1A*, *AIP* e *CDKN1B (p27Kip1)* (Asa e Ezzat, 1998; Boikos e Stratakis, 2007; Evans e cols., 2002; Franklin e cols., 1998; Kaltsas e cols., 2002). Estudos recentes têm mostrado que mutações somáticas e alterações em genes supressores tumorais ou oncogenes conhecidos em outras neoplasias, como *ras*, *p53*, *PKC*, *c-erbB2*, estão raramente envolvidos no desenvolvimento de tumores na adenohipófise (Asa e Ezzat, 1998; Daly e cols., 2009; Grossman, 2009; Melmed, 2003). Além disso, as alterações nos genes *MEN1* e *PKAR1A* não parecem ser importantes no desenvolvimento da maioria dos tumores hipofisários esporádicos (Asa e Ezzat, 1998; Kaltsas e cols., 2002). A única mutação

intimamente identificada até hoje em adenomas esporádicos está num subgrupo de tumores produtores de GH (10 a 40%), e ocorre no gene *gsp*. Esta mutação é caracterizada pela ativação constitutiva do AMPc por mutação pontual na cadeia alfa da proteína ligadora de trifosfato de guanosina (GTP), também conhecida como proteína Gs (Akintoye e cols., 2002). Esta mutação ativadora resulta na produção de grandes quantidades de AMPc, que leva à hipersecreção de GH e, conseqüentemente à proliferação celular. Por serem raras, estas mutações em oncogenes e genes supressores tumorais não representam o fator causal para o desenvolvimento dos tumores (Boikos e Stratakis, 2007; Hossain e cols., 2009). Portanto, considerando o caráter monoclonal destes adenomas e a baixa frequência de mutações, se acredita que os principais fatores determinantes para a tumorigênese hipofisária são a ativação ou inativação de genes com funções regulatórias do ciclo celular, bem como anormalidades em mecanismos de sinalização (Vandeva e cols., 2010).

Vários fatores de crescimento bem como seus receptores têm participação na regulação do crescimento celular hipofisário e fornecem mecanismos alternativos de transformação celular através de mutação ou de outras alterações genéticas (Melmed, 2003). A progressão tumoral a partir de uma simples célula requer estímulos para o seu crescimento. Na hipófise, hormônios hipofisiotróficos e outros fatores de crescimento são candidatos óbvios para o papel de promotores. As evidências de seu potencial tumorigênico em humanos e em diversos modelos animais indicam que eles estimulam a hiperplasia e, após exposição prolongada, ocorre o desenvolvimento do tumor. Isso pode ser interpretado como o resultado de alterações genéticas durante a mitose, cujas

manifestações poderiam ser precipitadas pelo estímulo do crescimento (Asa e Ezzat, 2009; Melmed, 2011).

1.2. Ciclo Celular

O ciclo celular é o processo através do qual as células duplicam seu material genético e se dividem. A fase durante a qual ocorre duplicação do DNA e preparo para a mitose é chamada de intérfase e está subdividida em fases G₀, G₁, S e G₂. Para que o processo de divisão inicie é necessário que uma seqüência de eventos ocorra de forma ordenada. Inicialmente, os fatores de crescimento, que podem ter ampla ou estreita especificidade, fazem ligação a seus receptores ativando as vias de sinalização intracelular que vão culminar na progressão da célula no ciclo. Durante a progressão do ciclo celular a célula possui pontos de checagem pelos quais o processo é monitorado e a execução dos eventos é verificada. Nestes pontos, a detecção de alterações interrompe a progressão do ciclo até que ocorra o reparo ou a apoptose. Nesse sentido, as proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, quando mutadas, são responsáveis direta ou indiretamente pelo desenvolvimento de neoplasias, pois podem desencadear o aumento da proliferação celular. O controle desta progressão é feito positivamente através das ciclinas e cinases dependentes de ciclina (CDKs) e de forma negativa através dos inibidores das CDKs (CKIs), que são proteínas de baixo peso molecular, além do complexo ubiquitina e das fosfatases. Existem, basicamente, duas famílias de CKI: INK e CIP/KIP (Bai e cols., 2007; Matoso e cols., 2008).

Uma das formas de controle sobre o ciclo celular é diretamente realizada por ciclinas acopladas a CDKs (Fedele e Fusco, 2010; Muşat e cols., 2010). Em células de mamíferos, duas vias são responsáveis por esta regulação, que é exercida pelas famílias CDK2, em associação com a ciclina E, CDK4 e CDK6, combinadas às ciclinas D (D1, D2 e D3) (Sherr, 1994). Na intérfase, a transição da fase G_1 para a fase S do ciclo celular é um ponto crítico, geralmente alterado nos tumores (Muşat e cols., 2004). O gene *Retinoblastoma1* (*RB1*) codifica a proteína *gatekeeper* Retinoblastoma (pRb) que possui função regulatória do ciclo celular. Essa proteína é ativada através de fosforilação por CDK para que ocorra a transição para a fase S, além de induzir o início da síntese de DNA pela liberação do fator de regulação gênica E2F. *RB1* também é responsável por manter a célula na fase G_0 e desempenha papel na apoptose celular. No início de G_1 ocorre a síntese de ciclina D que forma dois complexos por ligação à CDK4 e CDK6. Mais tarde ocorre a síntese de ciclina E que, por sua vez, se liga à CDK2, formando um terceiro complexo. Estes três complexos atuam na fosforilação da proteína pRb que se encontra na forma ativa ligada ao E2F. A pRb fosforilada torna-se inativa, liberando o E2F e este ativa a transcrição de genes cujos produtos são necessários para que a célula progrida para a fase S do ciclo celular (figura 1) (Li e cols., 2005; Sherr, 1994; Sherr, 2004).

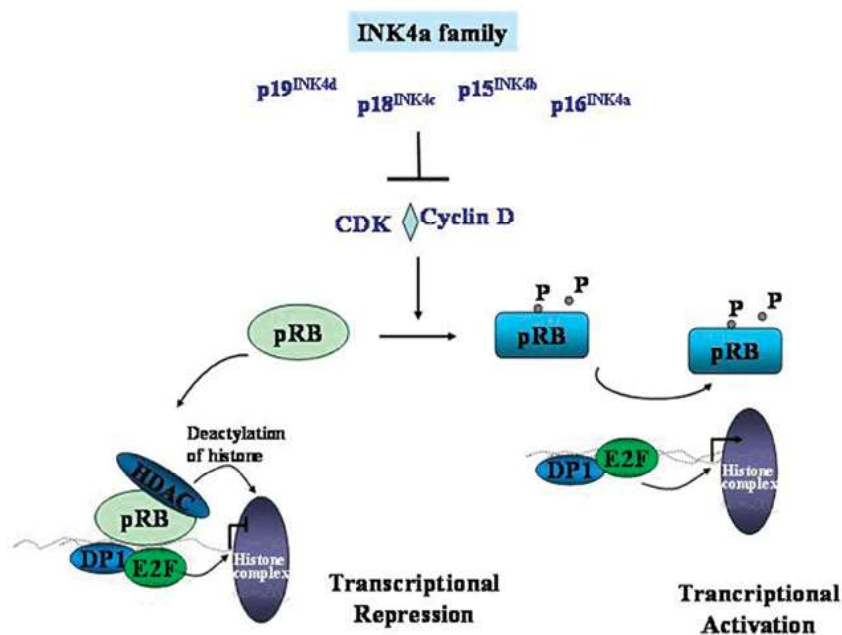


Figura 1. Ativação da transcrição a partir do complexo de histonas pela liberação do fator E2F através da fosforilação da pRb. O estado não-fosforilado da pRb inibe a liberação do E2F, implicando na repressão transcrricional. Adaptado de Li *et al.*, 2005.

A complexidade do ciclo celular exige, conseqüentemente, mecanismos elaborados de controle. A inibição do ciclo é exercida por diversas proteínas, além daquelas que pertencem às famílias INK. Uma vez que este processo não está completamente esclarecido, diversos estudos tem buscado a identificação das vias regulatórias e de seus componentes. A transição do estágio G₂ para a fase M do ciclo celular é regulada pela família CDK2 e já foi identificada a participação da proteína p53 neste processo (Li e cols., 2005; Sherr, 1994; Sherr, 2004; Taylor e Stark, 2001). Posteriormente, uma nova proteína foi identificada por Ohki e colaboradores com ação inibitória sobre esta transição. Esta proteína foi

denominada Reprimo (Ohki e cols., 2000).

1.2.1. Proteína Reprimo

Reprimo (*RPRM*, GeneBank 612171) é uma proteína assim chamada por que, literalmente, na sua origem latina, a palavra “reprimo” indica “supressão” (Ohki e cols., 2000; Xu e cols., 2012). Ohki e cols. (2000) identificaram a proteína com uso de culturas celulares de fibroblastos embrionários de camundongos como uma proteína glicosilada citoplasmática e mapearam o gene codificante localizado no cromossomo 2q23. Neste mesmo trabalho, a superexpressão de Reprimo induziu a parada do ciclo celular a partir do estágio G2 para a fase M em células HeLa infectadas com adenovírus recombinante contendo sequências precursoras do gene *RPRM*, quando comparadas com a linhagem selvagem. Através da análise da localização intracelular da ciclina B1, cuja translocação ao núcleo é característica da progressão celular à fase M, observou-se que as culturas celulares com maior expressão da proteína Reprimo permaneceram na fase G2. Isto foi demonstrado pelo acúmulo citoplasmático de ciclina B1 nestas culturas, enquanto que as linhagens controle demonstraram padrões intracelulares típicos de progressão à fase M, tais como condensação cromossômica e translocação nuclear da ciclina B1 (Ohki e cols., 2000). Sabe-se hoje, que a proteína Reprimo possui relação com a proteína p53 na regulação do ciclo celular (Taylor e Stark, 2001). É amplo o conhecimento que a proteína p53 ocasiona a parada do ciclo celular no estágio G2, não permitindo a progressão para a fase M. Esta parada do ciclo ocorre como um fator de proteção à célula em

condições de estresse, evitando uma possível produção de linhagens celulares mutantes, devido à falta de componentes necessários à célula para a divisão. Uma das formas pelas quais este bloqueio acontece, é pela repressão da topoisomerase II, por ação da p53, fundamental para cinética nuclear e organização cromossômica durante a divisão celular. Outra via de ação da p53 se dá inibindo a transição do gene *CDC2*, o que acarreta no bloqueio do ciclo celular neste estágio. De modo oposto, a expressão de *RPRM* é induzida pela p53 na mesma etapa, sugerindo uma forte relação entre a ação da proteína Reprimo neste ponto de checagem (Ohki e cols., 2000; Taylor e Stark, 2001). Bernal e cols. (2008) analisaram a atividade da proteína Reprimo em amostras tumorais de câncer gástrico e no sangue colhido dos pacientes oncológicos, demonstrando que a região promotora do gene *RPRM* esteve hipermetilada em 97,7% tumores gástricos e em 95,3% das amostras sanguíneas (Bernal e cols., 2008). Hamilton e cols. (2006) demonstraram que a região promotora de *RPRM* esteve hipermetilada em amostras de câncer esofágico de pacientes que não respondiam à quimioterapia, em comparação àqueles que responderam ao tratamento (Hamilton e cols., 2006). Posteriormente, a perda da expressão de *RPRM* também foi demonstrada em amostras de adenocarcinoma gástrico (Luo e cols., 2011). Os estímulos nocivos à célula que ativam as vias de supressão tumoral através da parada do ciclo celular, incluindo aquela que tem participação de *RPRM*, estão esquematizados na figura 2.

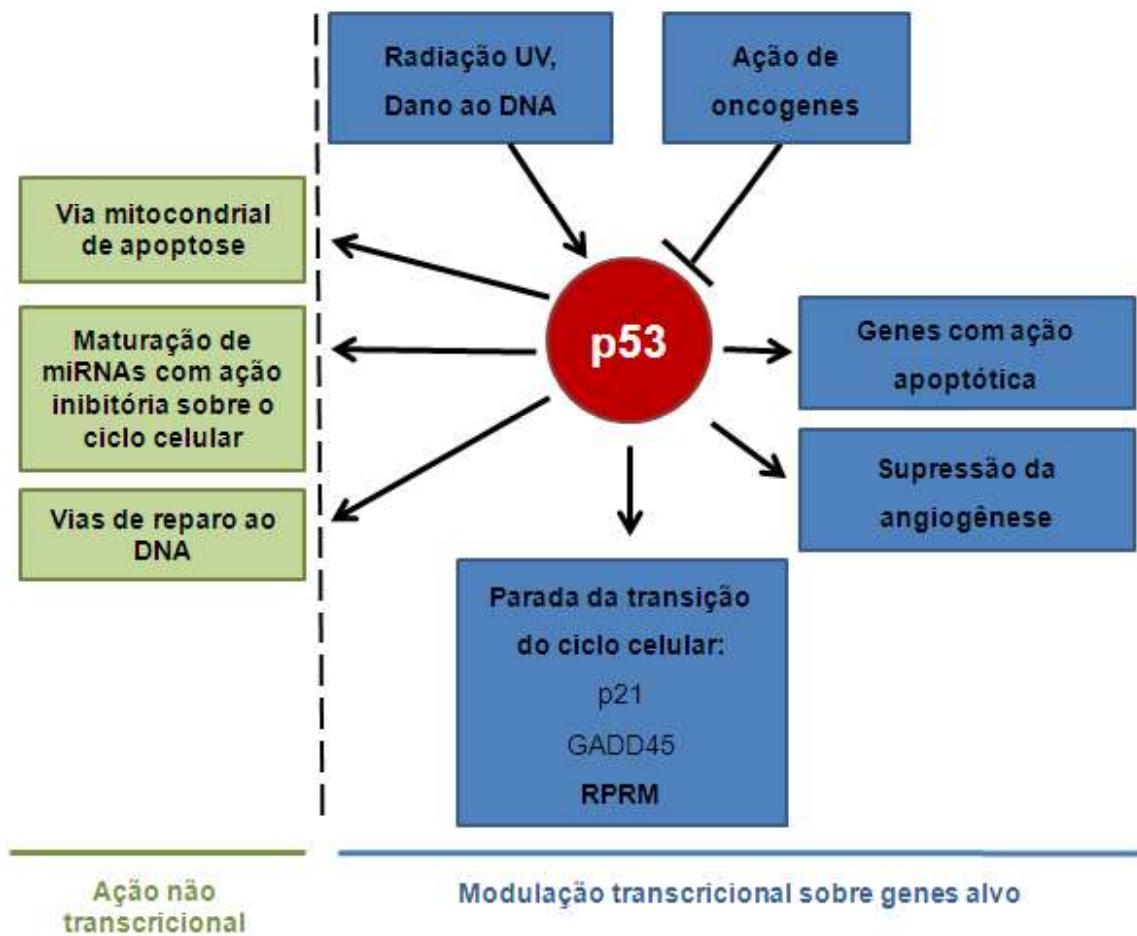


Figura 2. Relação da p53 com reguladores do ciclo celular e fatores que influenciam neste processo.

Estes resultados indicam que o gene *RPRM* possui grande potencial de ser utilizado como um biomarcador determinando o prognóstico das patologias estudadas, incluindo a resposta individual dos pacientes ao tratamento em alguns casos (Bernal e cols., 2008; Hamilton e cols., 2006).

1.3. Sinalização Celular

A fisiologia dos organismos multicelulares depende intimamente do sincronismo entre as funções das células que os compõe. Desta forma, a comunicação entre as células é essencial para o desenvolvimento e metabolismo dos tecidos humanos. Os mecanismos de controle do ciclo celular e equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose estão frequentemente desregulados em tumores. Tais alterações podem ser acionadas por sinalização extracelular e/ou por variações nas respostas intracelulares a estes sinais, incluindo a ativação de vias proliferativas, ou a inativação de processos de senescência e apoptose. O contato direto entre estruturas presentes na superfície de células vizinhas é uma forma de comunicação celular evolutivamente conservada, que representa o mecanismo básico de inúmeros processos, através, por exemplo, da interação entre proteínas de membrana de uma célula, e o domínio extracelular de um receptor de membrana de outra célula adjacente. Assim, o contato entre as estruturas superficiais destas células ativa vias intracelulares (Hori e cols., 2013).

As células hipofisárias dependem de sinalização proveniente da matriz celular, que ocorre geralmente através da secreção de neuropeptídeos coordenados pelo eixo hipotalâmico-hipofisário. Uma grande variedade de fatores de crescimento e moléculas extracelulares está envolvida em uma complexa rede de vias parácrinas e autócrinas, que são estritamente reguladas no desenvolvimento e maturação da hipófise. Além da comunicação celular entre sítios mais distantes, a sinalização célula-a-célula regula a secreção hormonal, diferenciação, crescimento, sobrevivência e plasticidade das células da hipófise,

bem como a angiogênese. Alterações neste mecanismo podem, conseqüentemente, participar da tumorigênese hipofisária (Deneff, 2008).

1.3.1. Família de receptores Notch

Notch é uma família de receptores protéicos transmembrana com ação regulatória sobre o ciclo celular, sendo responsável pela manutenção do potencial proliferativo em células tronco e no controle do processo apoptótico (Bianchi e cols., 2006; Lai, 2004; Lu e cols., 2013). Estes receptores foram primeiramente relacionados à neurogênese embrionária. No desenvolvimento de embriões do gênero *Drosophila* a baixa expressão gênica dos receptores Notch resultou no acúmulo de neuroblastos indiferenciados, em comparação com os precursores epidermais, utilizados como controle. Posteriormente, se evidenciou a participação destes genes na maturação dos demais folhetos embrionários (Artavanis-Tsakonas e cols., 1999). Hoje, sabe-se que os genes codificantes dos receptores Notch são evolutivamente conservados, com participação na maturação da maioria dos órgãos em vertebrados (Monet-Leprêtre e cols., 2009). O receptor Notch é ligante dependente e a sua modulação ocorre pelo contato direto entre as células adjacentes. Quando ativado, este receptor transloca o domínio intracelular (Notch^{intra}) ao núcleo devido à ação de clivagens proteolíticas de α e γ -secretases, induzindo fatores de transcrição gênica, tais como o fator CSL, que é o primeiro a ser ativado e participa da etapa inicial de ativação dos transcritos alvos de Notch (Lai, 2004; Lu e cols., 2013). Existem, em mamíferos, quatro tipos de Receptores Notch (Notch 1, 2, 3, e 4); dois ligantes Jagged

(Jagged 1 e 2) e três delta-ligantes (DLL1, DLL2 e DLL3) (Lai, 2004). O mecanismo básico de transdução de sinal através do contato entre células é demonstrado na figura 3:

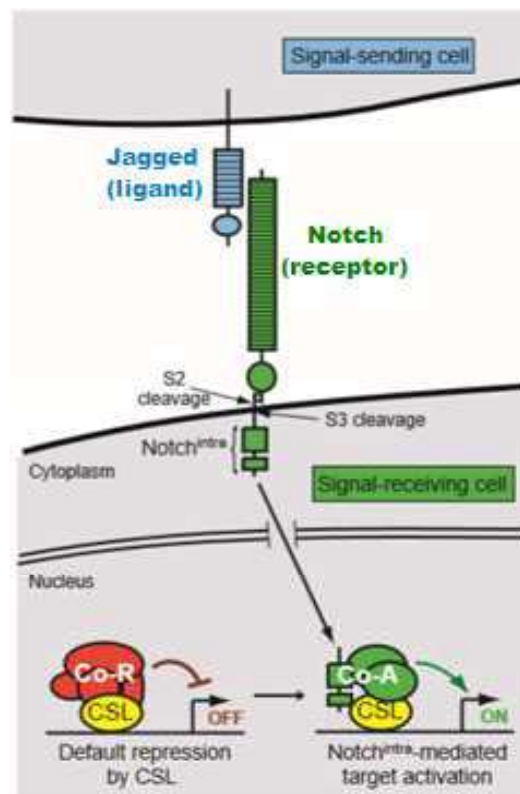


Figura 3: Mecanismo de trasdução de sinal - o ligante jagged (azul), presente na célula que envia o sinal interage com o receptor Notch (verde) localizado na membrana celular por ligação com sua porção extracelular. A seguir, uma cascata de clivagens (S2 e S3) provoca a liberação da porção intracelular (Notch^{intra}) que atua como fator de transcrição. Assim, Notch^{intra} ativa o fator de transcrição CSL, que dá início ao processo de transcrição dos genes alvos de Notch via co-ativadores (Co-A, em verde). Quando CSL não está ativado por

Notch^{intra} esta via de transcrição permanece inibida via co-repressores (Co-R, em vermelho). Adaptado de Lai *et al.*, 2004.

1.3.1.1. Receptor Notch3

A ativação da via de sinalização regulada pelos receptores Notch, de modo geral, está relacionada a linhagens celulares em fase inicial de desenvolvimento, o que faz destes receptores bons marcadores do desenvolvimento celular (Fre e cols., 2011). Foi demonstrado em diferentes tecidos que a via de sinalização Notch regula positivamente o número de células-tronco, caracterizando ação fundamental no potencial proliferativo e de diferenciação das linhagens celulares e, conseqüentemente, na manutenção tecidual (Liu e cols., 2010). A via de sinalização Notch está, por exemplo, em evidência no sistema gastrointestinal de moscas adultas do gênero *Drosophila*. Nestas moscas, existem células-tronco intestinais que podem proliferar e se diferenciar em enteroblastos, mantendo, assim, o tecido em constante renovação. Os enteroblastos, podem se diferenciar em enterócitos absorptivos, ou em células secretoras enteroendócrinas (Micchelli e Perrimon, 2006; Ohlstein e Spradling, 2006). A via de sinalização Notch foi identificada como sendo determinante para esta cadeia de proliferação e diferenciação, sendo que, através da ação dos receptores Notch, ocorre a sinalização para que as maturações dos enteroblastos ocorram de forma assimétrica entre os dois tipos celulares, de acordo com a necessidade fisiológica do sistema gastrointestinal (Ohlstein e Spradling, 2007).

Devido à participação da família de receptores Notch nos processos relacionados diretamente à regulação do ciclo celular, tais como maturação tecidual, manutenção do potencial proliferativo e de diferenciação, e apoptose (Bianchi e cols., 2006; Lai, 2004; Lu e cols., 2013; Monet-Leprêtre e cols., 2009), estudos têm buscado avaliar a participação destes receptores em processos tumorigênicos. Desta forma, se evidenciou superexpressão dos receptores Notch3 na leucemia linfoblástica de células T e linfomas. Mutações na ativação do receptor Notch3, envolvendo o ligante Jagged1, também foram descritas em casos de câncer de ovário, colorretal e mieloma múltiplo (Chen e cols., 2010; Choi e cols., 2008; Jundt e cols., 2004; Rodilla e cols., 2009). Foi demonstrado que a inibição da via ativada por Notch3 pelo micro RNA (miRNA) miR-206 resultou em supressão tumoral de câncer colorretal, através do bloqueio da proliferação e migração celular e apoptose das células malignas (Wang e cols., 2015). O receptor Notch3 está expresso em células musculares lisas do endotélio vascular e é necessário para a estrutura e integridade funcional das pequenas artérias, controlando a diferenciação e maturação das células endoteliais. Foram identificadas mutações no gene *NOTCH3* como as principais responsáveis pelo desenvolvimento da síndrome degenerativa da arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia (CADASIL), sendo que o sequenciamento do gene é determinante para o diagnóstico final da síndrome (Monet-Leprêtre e cols., 2009).

Nos adenomas de hipófise, a investigação tem se concentrado na participação do receptor Notch3 em ANFs e, em menor número, em prolactinomas. Foi detectada a superexpressão do gene *NOTCH3* em ambos os

subtipos tumorais através de ensaio com uso de microarranjos (Evans e cols., 2008; Miao e cols., 2012; Moreno e cols., 2005). Poucos estudos têm abordado a participação do receptor Notch3 na tumorigênese hipofisária e embora essas evidências sejam escassas, o envolvimento deste receptor nesta patologia pode fornecer caminhos ainda não explorados que contribuam para a sua elucidação.

1.4. Referências Bibliográficas

Akintoye SO, Chebli C, Booher S, Feuillan P, Kushner H, Leroith D e cols. Characterization of gsp-mediated growth hormone excess in the context of McCune-Albright syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002 Nov;87(11):5104–12.

Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP e cols. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003 Dec;88(12):5593–602.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, e Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999 Apr 30;284(5415):770–6.

Asa SL e Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr. Rev.* 1998 Dec;19(6):798–827.

Asa SL e Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumors. *Annu. Rev. Pathol.* 2009;4:97–126.

Asa SL, Somers K, e Ezzat S. The MEN-1 gene is rarely down-regulated in pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998 Sep;83(9):3210–2.

Aulinas A, Colom C, Ybarra J, Muñoz F, Tresserras P, Resmini E e cols. Immediate and delayed postoperative morbidity in functional and non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary.* 2012 Sep;15(3):380–5.

Bahar A, Simpson DJ, Cutty SJ, Bicknell JE, Hoban PR, Holley S e cols. Isolation and characterization of a novel pituitary tumor apoptosis gene. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 2004 Jul;18(7):1827–39.

Bai F, Pei X-H, Nishikawa T, Smith MD, e Xiong Y. p18Ink4c, but not p27Kip1, collaborates with Men1 to suppress neuroendocrine organ tumors. *Mol. Cell. Biol.* 2007 Feb;27(4):1495–504.

Beckers A e Daly AF. The clinical, pathological, and genetic features of familial isolated pituitary adenomas. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 2007 Oct;157(4):371–82.

Bernal C, Aguayo F, Villarroel C, Vargas M, Díaz I, Ossandon FJ e cols. Reprimo as a potential biomarker for early detection in gastric cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2008 Oct 1;14(19):6264–9.

Bianchi S, Dotti MT, e Federico A. Physiology and pathology of notch signalling system. *J. Cell. Physiol.* 2006 May;207(2):300–8.

Biller BM, Colao A, Petersenn S, Bonert VS, e Boscaro M. Prolactinomas, Cushing's disease and acromegaly: debating the role of medical therapy for secretory pituitary adenomas. *BMC Endocr. Disord.* 2010;10:10.

Boikos SA e Stratakis CA. Molecular genetics of the cAMP-dependent protein kinase pathway and of sporadic pituitary tumorigenesis. *Hum. Mol. Genet.* 2007 Apr 15;16 Spec No 1:R80–7.

Chen X, Stoeck A, Lee SJ, Shih I-M, Wang MM, e Wang T-L. Jagged1 expression regulated by Notch3 and Wnt/ β -catenin signaling pathways in ovarian cancer. *Oncotarget.* 2010 Jul;1(3):210–8.

Choi J-H, Park JT, Davidson B, Morin PJ, Shih I-M, e Wang T-L. Jagged-1 and Notch3 juxtacrine loop regulates ovarian tumor growth and adhesion. *Cancer Res.* 2008 Jul 15;68(14):5716–23.

Clayton RN. New developments in the management of acromegaly. Should we achieve absolute biochemical cure? *J. Endocrinol.* 1997 Oct;155 Suppl 1:S23–9; discussion S31–2.

Daly AF, Jaffrain-Rea M-L, e Beckers A. Clinical and genetic features of familial pituitary adenomas. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme.* 2005 Jun;37(6):347–54.

Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA, e Beckers A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006 Dec;91(12):4769–75.

Daly AF, Tichomirowa MA, e Beckers A. The epidemiology and genetics of pituitary adenomas. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009 Oct;23(5):543–54.

Davis JR, Farrell WE, e Clayton RN. Pituitary tumours. *Reprod. Camb. Engl.* 2001 Mar;121(3):363–71.

Denef C. Paracrinicity: The Story of 30 Years of Cellular Pituitary Crosstalk. *J. Neuroendocrinol.* 2008 Jan;20(1):1–70.

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

Evans D, Thomas I, Thomas S, Prabhu A, e Zhang M. P8 Contributions of neural crest and paraxial mesoderm to craniofacial morphogenesis in the chick embryo. *J. Anat.* 2002 Nov;201(5):428.

Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML e cols. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer.* 2004 Aug 1;101(3):613–9.

Fedele M e Fusco A. Role of the high mobility group A proteins in the regulation of pituitary cell cycle. *J. Mol. Endocrinol.* 2010 Jun;44(6):309–18.

Fernández-Balsells MM, Murad MH, Barwise A, Gallegos-Orozco JF, Paul A, Lane MA e cols. Natural history of nonfunctioning pituitary adenomas and incidentalomas: a systematic review and metaanalysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011 Apr;96(4):905–12.

Findling JW e Raff H. Cushing's Syndrome: important issues in diagnosis and management. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006 Oct;91(10):3746–53.

Franklin DS, Godfrey VL, Lee H, Kovalev GI, Schoonhoven R, Chen-Kiang S e cols. CDK inhibitors p18(INK4c) and p27(Kip1) mediate two separate pathways to collaboratively suppress pituitary tumorigenesis. *Genes Dev.* 1998 Sep 15;12(18):2899–911.

Fre S, Bardin A, Robine S, e Louvard D. Notch signaling in intestinal homeostasis across species: the cases of *Drosophila*, Zebrafish and the mouse. *Exp. Cell Res.* 2011 Nov 15;317(19):2740–7.

Greenman Y e Stern N. Non-functioning pituitary adenomas. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009 Oct;23(5):625–38.

Grossman AB. The molecular biology of pituitary tumors: a personal perspective. *Pituitary.* 2009;12(3):265–70.

G Thurston JK. VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. *Br. J. Cancer.* 2008;99(8):1204–9.

Hamilton JP, Sato F, Greenwald BD, Suntharalingam M, Krasna MJ, Edelman MJ e cols. Promoter methylation and response to chemotherapy and radiation in esophageal cancer. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2006 Jun;4(6):701–8.

Hori K, Sen A, e Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 2013 May 15;126(Pt 10):2135–40.

Hossain MG, Iwata T, Mizusawa N, Qian ZR, Shima SWN, Okutsu T e cols. Expression of p18(INK4C) is down-regulated in human pituitary adenomas. *Endocr. Pathol.* 2009;20(2):114–21.

Jaffrain-Rea M-L, Angelini M, Gargano D, Tichomirowa MA, Daly AF, Vanbellinghen J-F e cols. Expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-interacting protein in pituitary adenomas: pathological and clinical implications. *Endocr. Relat. Cancer.* 2009 Sep;16(3):1029–43.

Jundt F, Pröbsting KS, Anagnostopoulos I, Muehlinghaus G, Chatterjee M, Mathas S e cols. Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood.* 2004 May 1;103(9):3511–5.

Kaltsas GA, Kola B, Borboli N, Morris DG, Gueorguiev M, Swords FM e cols. Sequence analysis of the PRKAR1A gene in sporadic somatotroph and other pituitary tumours. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2002 Oct;57(4):443–8.

Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS e cols. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat. Genet.* 2000 Sep;26(1):89–92.

Korbonits M e Carlsen E. Recent clinical and pathophysiological advances in non-functioning pituitary adenomas. *Horm. Res.* 2009 Apr;71 Suppl 2:123–30.

Kovacs K, Horvath E, e Vidal S. Classification of pituitary adenomas. *J. Neurooncol.* 2001 Sep;54(2):121–7.

Kovacs K, Scheithauer BW, Horvath E, e Lloyd RV. The World Health Organization classification of adenohypophysial neoplasms. A proposed five-tier scheme. *Cancer.* 1996 Aug 1;78(3):502–10.

Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Dev. Camb. Engl.* 2004 Mar;131(5):965–73.

Li MH, Bouffet E, Hawkins CE, Squire JA, e Huang A. Molecular genetics of supratentorial primitive neuroectodermal tumors and pineoblastoma. *Neurosurg. Focus.* 2005 Nov;19(5):E3.

Liu J, Sato C, Cerletti M, e Wagers A. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2010;92:367–409.

Livak KJ e Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* 2001 Dec;25(4):402–8.

Losa M, Mortini P, Barzaghi R, Franzin A, e Giovanelli M. Endocrine inactive and gonadotroph adenomas: diagnosis and management. *J. Neurooncol.* 2001 Sep;54(2):167–77.

Luo J, Zhu Y, Yang G, Gong L, Wang B, e Liu H. Loss of Reprimo and S100A2 expression in human gastric adenocarcinoma. *Diagn. Cytopathol.* 2011 Oct;39(10):752–7.

Lu R, Gao H, Wang H, Cao L, Bai J, e Zhang Y. Overexpression of the Notch3 receptor and its ligand Jagged1 in human clinically non-functioning pituitary adenomas. *Oncol. Lett.* 2013 Mar;5(3):845–51.

Mancini T, Porcelli T, e Giustina A. Treatment of Cushing disease: overview and recent findings. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2010;6:505–16.

Matoso A, Zhou Z, Hayama R, Flesken-Nikitin A, e Nikitin AY. Cell lineage-specific interactions between Men1 and Rb in neuroendocrine neoplasia. *Carcinogenesis*. 2008 Mar;29(3):620–8.

Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J. Clin. Invest.* 2003 Dec;112(11):1603–18.

Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011 May;7(5):257–66.

Mezzomo LC, Gonzales PH, Pesce FG, Kretzmann Filho N, Ferreira NP, Oliveira MC e cols. Expression of cell growth negative regulators MEG3 and GADD45 γ is lost in most sporadic human pituitary adenomas. *Pituitary*. 2012 Sep;15(3):420–7.

Miao Z, Miao Y, Lin Y, e Lu X. Overexpression of the Notch3 receptor in non-functioning pituitary tumours. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 2012 Jan;19(1):107–10.

Micchelli CA e Perrimon N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature*. 2006 Jan 26;439(7075):475–9.

Monet-Leprêtre M, Bardot B, Lemaire B, Domenga V, Godin O, Dichgans M e cols. Distinct phenotypic and functional features of CADASIL mutations in the Notch3 ligand binding domain. *Brain J. Neurol.* 2009 Jun;132(Pt 6):1601–12.

Moreno CS, Evans C-O, Zhan X, Okor M, Desiderio DM, e Oyesiku NM. Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer Res.* 2005 Nov 15;65(22):10214–22.

Muşat M, Morris DG, Korbonits M, e Grossman AB. Cyclins and their related proteins in pituitary tumourigenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010 Sep 15;326(1-2):25–9.

Muşat M, Vax VV, Borboli N, Gueorguiev M, Bonner S, Korbonits M e cols. Cell cycle dysregulation in pituitary oncogenesis. *Front. Horm. Res.* 2004;32:34–62.

Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N e cols. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J. Biol. Chem.* 2000 Jul 28;275(30):22627–30.

Ohlstein B e Spradling A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature*. 2006 Jan 26;439(7075):470–4.

Ohlstein B e Spradling A. Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science*. 2007 Feb 16;315(5814):988–92.

Rishi A, Sharma MC, Sarkar C, Jain D, Singh M, Mahapatra AK e cols. A clinicopathological and immunohistochemical study of clinically non-functioning pituitary adenomas: a single institutional experience. *Neurol. India*. 2010 Jun;58(3):418–23.

Rodilla V, Villanueva A, Obrador-Hevia A, Robert-Moreno A, Fernández-Majada V, Grilli A e cols. Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009 Apr 14;106(15):6315–20.

Scheithauer BW, Kovacs KT, Laws ER, e Randall RV. Pathology of invasive pituitary tumors with special reference to functional classification. *J. Neurosurg.* 1986 Dec 1;65(6):733–44.

Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*. 1994 Nov 18;79(4):551–5.

Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):235–46.

Stratakis CA, Tichomirowa MA, Boikos S, Azevedo MF, Lodish M, Martari M e cols. The role of germline AIP, MEN1, PRKAR1A, CDKN1B and CDKN2C mutations in causing pituitary adenomas in a large cohort of children, adolescents, and patients with genetic syndromes. *Clin. Genet.* 2010 Nov;78(5):457–63.

Suzuki M, Shigematsu H, Takahashi T, Shivapurkar N, Sathyanarayana UG, Iizasa T e cols. RETRACTED: Aberrant methylation of Reprimo in lung cancer. *Lung Cancer*. 2005 Mar;47(3):309–14.

Taylor WR e Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001 Apr 5;20(15):1803–15.

Tichomirowa MA, Daly AF, e Beckers A. Familial pituitary adenomas. *J. Intern. Med.* 2009 Jul;266(1):5–18.

Vandeva S, Jaffrain-Rea M-L, Daly AF, Tichomirowa M, Zacharieva S, e Beckers A. The genetics of pituitary adenomas. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010 Jun;24(3):461–76.

Wang X-W, Xi X-Q, Wu J, Wan Y-Y, Hui H-X, e Cao X-F. MicroRNA-206 attenuates tumor proliferation and migration involving the downregulation of NOTCH3 in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 2015 Mar;33(3):1402–10.

Xu M, Knox AJ, Michaelis KA, Kiseljak-Vassiliades K, Kleinschmidt-DeMasters BK, Lillehei KO e cols. Reprimo (*RPRM*) is a novel tumor suppressor in pituitary tumors and regulates survival, proliferation, and tumorigenicity. *Endocrinology*. 2012 Jul;153(7):2963–73.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a expressão de genes com funções regulatórias sobre o ciclo celular em amostras de adenomas hipofisários.

2.2. Objetivos específicos

a) Analisar a expressão do gene *RPRM*, *NOTCH3* e *JAG1* pelo método de qPCR; em adenomas hipofisários

b) Verificar a associação entre a expressão destes marcadores com os subtipos tumorais;

c) Estabelecer relações clínico-patológicas (idade, sexo, tamanho tumoral) com a classificação tumoral.

3. Artigo científico

A ser submetido para a revista *Journal of Endocrinological Investigation* (JENI).

Fator de impacto: 1.552.

Up and down regulators differential gene expression in non-functioning pituitary adenomas (NFPA).

Frederico Giacomoni Pesce^{1,2}, Lisiane Cervieri Mezzomo^{1,2}, Nelson Pires Ferreira³, Carolina Garcia Soares Leães³, Julia Pereira Lima^{2,3}, Miriam da Costa Oliveira^{2,3}, Maria Beatriz Fonte Kohek^{1,2}.

1 Laboratory of Molecular Biology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre – RS, CEP: 90050-170. Brazil.

2 Post-graduation Program of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre – RS, CEP: 90050-170. Brazil.

3 Neuroendocrinology Center of Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, RS, CEP: 90020-090, Brazil.

*Corresponding Author: Maria Beatriz Fonte Kohek, Post-graduation Program of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS; CEP90050-170. Brazil.

Phone/ Fax: +55 5133038819 / 33038796

E-mail: kohek@ufcspa.edu.br

ABSTRACT

Purpose: Besides pituitary adenomas are considered common intracranial neoplasms, its tumorigenesis is still under investigation. Reprimo (*RPRM*) is a protein responsible for cell cycle arrest in which its expression is suppressed in many tumors. With opposite action, the membrane receptor Notch3 and its ligand Jagged1 (*JAG1*) are related to cell proliferation and differentiation. Its already known that increased expression of these markers is related to tumorigenesis. It has been demonstrated reduction of *RPRM* gene expression, as well as increased *NOTCH3* and *JAG1* gene expression in pituitary adenomas, providing evidence of the involvement of these factors in tumor development. We aimed to investigate the relative gene expression of *RPRM*, *NOTCH3* and *JAG1* in pituitary adenomas according to tumor subtype.

Methods: *RPRM*, *NOTCH3* and *JAG1* relative gene expression was evaluated by qPCR method in 49 pituitary adenomas samples and the results were associated with tumor subtype and clinical data.

Results: *RPRM* gene expression was reduced in non functioning pituitary adenomas (NFPA) compared to growth hormone (GH) secreting adenomas and showed no statistically significant difference in the other subgroups. There was increased expression of *NOTCH3* the comparison between NFPA and GH and prolactin (PRL) secreting adenomas. No statistical difference was found in *JAG1* expression between all groups studied.

Conclusions: The expression of the genes studied confirm the previous reports that must be a wide variability of factors involved in pituitary tumorigenesis, and provide information about *RPRM* and *NOTCH3* relationship in pituitary adenomas formation, suggesting the important role of these biomarkers in cell proliferation mainly in NFPA.

Keywords: pituitary adenomas, cell cycle, cell signaling, tumorigenesis, *RPRM*, Notch3.

INTRODUCTION

Pituitary adenomas are common benign intracranial neoplasms with very low metastatic potential. However, about 30% of pituitary adenomas present infiltration in local structures, causing significant morbidity. These tumors are classified based on symptoms caused by abnormal endocrine activity that depends on the pituitary cell affected. In this case, the tumor is classified as a functioning pituitary adenoma (FPA) [1–3]. Hormone specific immunohistochemistry analysis is used as a parameter to confirm the diagnosis, but 25% of pituitary tumors have no significant alterations in endocrine activity and they are called non-functioning pituitary adenomas (NFPA) [4,5]. Patients used to look for medical attention due to symptoms resulting from tumor growth, compression of neural structures nearby pituitary gland, like visual deficiency and headache [6–8]. Adenomas can show positive immunohistochemistry to one or more pituitary hormones, but also can be constituted by non-reactive null cells [9,10].

The most accepted theory is that pituitary adenomas have monoclonal origin and its proliferation results in tumor growth and/or hormone hypersecretion [11–13]. The specific stimuli and mutations that lead to this neoplastic process are not strongly established and only a few specific genes, like *MEN1*, *PRKAR1A*, *AIP* and *p27*, are known to be differently expressed in some tumor subtypes [14,15]. Furthermore, tumor suppressor genes (TSGs) mutations or oncogenes activation, frequently found in other neoplasms, are rarely detected in pituitary adenomas. For this reason, molecular biomarkers have been the focus of recent research in

the field [16–18]. Tumor development depends on a variety of alterations in cell cycle regulatory factors, which contribute to proliferation. Considering the monoclonal character of pituitary adenomas and the low frequency of mutations, it is believed that activation or inactivation of regulatory cell cycle genes, as well as abnormalities in cell signaling mechanisms are the main factors for tumorigenesis [18]. Recently, Ohki *et al.* reported a novel protein, called Reprimo (*RPRM*), with an inhibitory effect on cell cycle G2 to M transition [19]. *RPRM* is a glycosylated cytoplasmatic protein responsible for cell cycle down-regulation in stress situations that would result in DNA damage and a consequent increase in mutational potential [19,20]. It was already reported that *RPRM* gene is hypermetilated in gastric and esophageal cancer tumor samples taken from patients who had not responded to chemotherapy [21,22]. In addition, overexpression of *RPRM* gene induced by adenovirus in HeLa cells had resulted in complete cell cycle arrest in G2/M checkpoint [19]. Due to these results, *RPRM* is a potential biomarker to determinate neoplasm prognosis and individual response to treatment.

On the other hand, cell communication comprises a complex network of paracrine and autocrine pathways, which are tightly regulated in the developing and adult pituitary [23]. Cell-to-cell signaling regulates pituitary hormone secretion, cell differentiation, growth, survival and plasticity, as well as angiogenesis. Abnormalities in this mechanism may, therefore, participate in pituitary tumorigenesis [23,24]. Considering cell signaling mechanisms in tumoral development, there is a protein receptor family with cell cycle up-regulation function and stem cells proliferative potential maintenance: the Notch family [25–27]. These receptors were first related to embryonic neurogenesis due to its low

mRNA detection in fibroblasts culture that showed undifferentiated neuroblasts accumulation [28]. Later, it was discovered that Notch participates in the maturation of all germ layers. Notch family is composed by four receptor types, Notch 1, 2, 3 and 4, which interacts with three Delta ligands (DLL1, DLL2, and DLL3) and two Jagged ligands (Jagged1 and 2). The signaling pathway is started by contact between cells, where the receptors are activated by their respective ligands [25]. Notch 3 receptor mutations are known as the main cause of Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) and its overexpression, as the ligand Jagged 1, was found in several proliferative diseases, like T-cell lymphoblastic leukemia, lymphomas, multiple myeloma, as in ovarian and colorectal cancer [29–32].

The present study aimed to investigate the gene expression of three cell cycle regulators, Reprimo protein, Notch3 receptor and its ligand, Jagged1, in pituitary adenomas samples.

MATERIALS AND METHODS:

Tumor samples:

Forty-nine fresh pituitary tumor samples were obtained from patients at the São José Hospital of Irmandade Santa Casa de Misericórdia (ISCOMPA) in Porto Alegre, Brazil after adenomectomy. The diagnosis of pituitary tumor was established by clinical, biochemical and radiological findings, and was confirmed by immunohistochemistry analysis for FSH, LH, GH, TSH, ACTH and PRL

hormones. Portions of the surgical specimens were immediately frozen in liquid nitrogen after resection and stored at -80°C until analysis for RNA stabilization. A commercially RNA pool of 88 normal human pituitary glands (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) obtained from autopsies was used as a calibrator. Clinicopathological features were obtained from medical records. All patients included in the study gave their written informed consent before surgery. This study was approved by the Committee of Ethical in Research of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), protocol 1824/12.

Total RNA extraction and cDNA synthesis:

Total RNA was extracted using Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, EUA) according to manufacturer's instructions and its quantification and purification was measured by spectrophotometry at 260 nm using BioSpec Nano (Shimadzu Corp, JPN). Samples with relation 260nm/280nm equal or higher than 1,7 were included. After optimized RNA concentration, all samples and the RNA pool of normal human pituitary glands were reversely transcribed using ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, EUA), according to the manufacturer's protocol. The final volume of each reaction was 20µL.

Real-time quantitative PCR (qPCR):

The target genes expression was measured by qPCR with SYBR-Green Master Mix 2X reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) and specific primers to each gene. Reactions were performed using 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according manufacturer's recommendations. Relative quantification of each sample was done at least in duplicate and constitutive gene *PGK1* (phosphoglycerate kinase 1) was used as endogenous control to perform normalization. A commercially available RNA/cDNA pool of 88 normal pituitary glands (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) was used as a calibrator. Samples from RT reactions in the absence of cDNA were also used as negative controls. The primer sequences used to amplify the target genes were: *RPRM* forward 5'-ATGAACGCGACCTTCCTGAAC-3', reverse 5'-GACCACGGTAAGCGACAGC-3'; *NOTCH3* forward 5'-TGGCGACCTCACTTACGACT-3', reverse 5'-CACTGGCAGTTATAGGTGTTGAC-3'; *JAG1* forward 5'-GGGGCAACACCTTCAACCTC-3', reverse 5'-CCAGGCGAAACTGAAAGGC-3'; and *PGK1* forward 5'-GAACAAGGTTAAAGCCGAGCC-3', reverse 5'-GTGGCAGATTGACTCCTACCA-3'. Relative expression was quantified by Threshold Cycle (Ct) method. In this method, results are given as the number of PCR cycles that passed a certain fluorescence threshold and so, data were expressed as Ct values [33]. Relative cDNA expression (the normalized target concentration related to the endogenous reference) was given by the formula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct = Ct$ (Target gene-*PGK1* tumor) - (Normal pituitary target gene-

PGK1 normal pituitary pool). The relative efficiency was determined by evaluating ΔCt against serial dilutions of target genes.

Statistical Analysis:

Descriptive statistical analysis and normality test (Shapiro–Wilk) were carried out to determine the distribution of data. Student's t test was performed to compare the age between NFPA and FPA groups; and analysis of variance (ANOVA) was used to compare the age between NFPA and FPA subgroups, followed by post-hoc Tukey's test. Mann–Whitney test was used to compare relative gene expression medians between groups (NFPA vs. FPA) and the relative gene expression between NFPA and FPA subgroups was performed using Kruskal Wallis test, followed by post-hoc Dunn's test. Expression status and clinicopathological features, such as tumor size, tumor subtype, sex and age, were analyzed using Chi-square (χ^2) and Fisher's exact test. The SPSS 21.0 software package (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, USA) was used for statistical calculations. Significance was taken at the 5% level.

RESULTS

Clinicopathological Features:

The samples included were 21 (42.86%) non-functioning pituitary adenomas (NFPA) and 28 (57.14%) functioning adenomas (FPA), which were: 5

ACTH-secreting (10.20%), 14 GH-secreting (28.57%) and 9 PRL-secreting (18.37%). The patients group consisted of 26 male (53.06%) and 23 female (46.94%) with ages ranged from 18 to 73 years old, and the mean age (mean \pm SD) in NFPA was 58.2 ± 10.5 years, while in FPA it was 43.8 ± 13.3 years. The tumor size showed variability only in the ACTH-secreting adenomas, where all tumors were microadenomas (≤ 1 cm), and in GH-secreting group, where 13 of the 14 included tumors were macroadenomas (≥ 1 cm). Student's t test showed that patients with NFPA were significantly older (58.2 ± 10.5 years; mean \pm SD) than patients with GH-secreting (45.8 ± 14.3 ; mean \pm DP) ($p=0.416$) and PRL-secreting adenomas (42.6 ± 11.8 ; mean \pm SD) ($p=0.317$). This difference was not found when NFPA was compared with ACTH-secreting adenomas (40.6 ± 14.9 ; mean \pm DP) ($p=0.580$). χ^2 test showed an association between tumor size and subtype ($p<0.01$) in the subset of ACTH-secreting adenomas. Data is shown on table 1.

Regarding relative gene expression of biomarkers studied, we found great variation by comparing the tumor subtypes. Of interest in this analysis, there was a statistically significant decrease of *RPRM* relative gene expression in NFPA compared to FPA ($p=0.014$). When NFPA was compared to each subgroup of secreting tumors, we found statistically significant gene overexpression only in GH group ($p=0.015$). *NOTCH3* relative gene expression was increased in NFPA when compared to FPA ($p<0.001$). However, this statistical difference was only found in GH and PRL ($p<0.001$), when NFPA group was compared to FPA subgroups. Regarding *JAG1* relative gene expression, there was no statistically

significant difference between all groups tested. Quantified relative genes expressions are shown in table 2.

DISCUSSION

The wide knowledge of cellular processes related to the homeostatic maintenance, proliferation, senescence and apoptosis control, lead to the identification of increasingly more markers in each of these pathways [19]. Thus, detection of these markers and their alterations, can serve as parameters that assist in the diagnosis and assessment of prognosis of diseases. Frequent genetic alterations found in several types of neoplasms are not usually detected in pituitary adenomas, representing an additional challenge to elucidate the pathogenesis of this gland [3, 20, 34]. Added to this, recent studies have shown that the expression of genes with cell cycle regulatory function are expressed differently in functioning adenomas, compared with the nonfunctioning tumors, suggesting that a variety of molecular factors might contribute to the emergence of the different tumor types [17].

We analyzed by qPCR method the expression of two cell cycle regulatory genes, which encodes Reprimo protein and Notch3 receptor. We also studied *JAG1* expression, the Notch3 ligand, Jagged1, encoding gene. *RPRM* gene is activated by p53 and triggers a pathway that results in inhibiting G2 stage to M phase progression [19, 20]. With opposite action Notch3 is a membrane receptor that, when activated, starts a chain of events leading to cell proliferation. This receptor is already strongly associated with neoplasms such as ovarian and

colorectal cancer, multiple myeloma, lymphomas and lymphoblastic T cells leukemia [29–32]; and also in tissue formation events, as in CADASIL syndrome [35]. Notch3 is activated by cell to cell contact, where a ligand from a signaling cell interacts with a nearby membrane cell receptor [25]. Also, it was described previously that the *JAG1* gene expression was altered in several types of cancer where Notch3 receptor was up-regulated [29–32].

In this study, *RPRM* relative gene expression median was lower in NFPA than in FPA, ACTH, PRL and GH groups. However, this difference was statistically significant only when comparing NFPA with FPA, and NFPA with GH-secreting adenomas. In both comparisons, *RPRM* relative gene expression was down-regulated in NFPA. This finding indicates that the mRNA is found in greater quantities in the GH-secreting subtype than in PRL and ACTH, as well as in non-functioning adenomas. Similar results were obtained by XU *et al.*, that reported overexpression of *RPRM* mRNA in NFPA when compared with normal pituitary gland, while this gene was not suppressed in GH and ACTH-secreting adenomas. In this same study, mRNA array analysis showed that *RPRM* was suppressed 26-fold in contrast with p53 in 14 gonadotroph pituitary tumors, and no difference was found in the normal tissue samples. Also, cell lines were transfected with *RPRM* cDNA vector presented less than 20% of clonogenic potential that the same cell lines transfected with normal control [36]. It was also previously reported by XU, *et al.* that *RPRM* down-regulation in pituitary adenomas does not occur due promoter gene hypermethylation, and that the methylation status of this gene in other neoplastic pathologies is variable. Takahashi, *et al.* in a review of more than 600

tumors showed methylation of the *RPRM* promoter in 79% of gastric cancers, 57% of lymphomas, 56% of gastric cancers, and 37% of breast cancers, in contrast to significantly lower rates of hypermethylation in brain, ovarian, cervical, and bladder cancer. This data suggest that multiple factors/pathways, which remains unknown, are responsible for this gene modulation [36, 37].

Cell cycle arrest in G2/M was previously investigated by our group. Recently we have demonstrated that *GADD45 γ* gene expression, which is activated by p53 in order to cause the cell cycle down-regulation, was decreased in NFPA, when compared to FPA [17]. Taken into account that *RPRM* acts in the same cell cycle checkpoint as *GADD45 γ* , we are expecting similar results. However, our results showed that this altered expression was not maintained when comparing NFPA with PRL and ACTH. In these subtypes of secreting adenomas the *RPRM* gene expression was statistically similar, and *RPRM* gene was only up-regulated in GH-secreting adenomas when compared to NFPA. This suggests that *RPRM* may differs of *GADD45 γ* gene pathway in functioning and nonfunctioning adenomas, besides both seems to play a role in pituitary tumorigenesis. The differential status of *RPRM* gene in multiple neoplasms, and the significant down-regulation previously reported in NFPA and also found in the present work, reinforce the hypothesis of this gene participation in pituitary tumors growth.

NOTCH3 relative gene expression was up-regulated in NFPA when compared with the FPA group and with GH and PRL subgroups. Besides we have found a higher *NOTCH3* gene expression in NFPA than in ACTH subgroup, this

difference was not statistically significant, probably due to the small number of ACTH secreting adenomas samples available. There was no statistically significant difference in the comparison of *JAG1* gene in all samples. Although previous studies have found similar alterations in *NOTCH3* and *JAG1* [29–32], these results were not obtained in the current work. This finding can be explained by a peculiarity of Notch signaling, which is the lateral inhibition due to ligand-receptor interaction, with intracellular signaling being inactive in cells expressing Notch ligands [38]. Based on this result, we hypothesize that, due to *NOTCH3* expression variability in the majority of samples tested, *JAG1* was not being differently expressed in this tumor subset, and the regulatory Notch pathway is activated by Notch3 receptor expression in NFPA.

The increased expression of *NOTCH3* in NFPA found in this study is consistent with previous results [27, 39]. Miao, *et al.* demonstrated up-regulation of *NOTCH3* by RT-PCR method in NFPA compared to normal pituitary samples and also a higher concentration of the Notch3 protein in the cytoplasm of NFPA cells [39]. Lu, *et al.* reported increased *NOTCH3* expression by RT-PCR and higher Notch3 protein levels by western blot method in NFPA, when compared to normal tissue, while there was no statistical difference in comparison between FPA and normal gland. Furthermore, in this same work, it was found down-regulation of *NOTCH3* relative gene expression in GH, but not in PRL secreting adenomas compared with normal pituitary. However, the analysis in NFPA, GH and PRL secreting adenomas showed significant higher *NOTCH3* relative gene expression in NFPA than in these two secreting adenomas subtypes [27]. Due to *NOTCH3*

role in keeping cellular proliferative potential, the upper relative gene expression found in NFPA may be an evidence of this receptor participation in pituitary development, once tumor growth is most seen in this pituitary adenoma subtype.

No relationship was found between the prevalence of the tumor type and patient's sex, which is consistent with data published by Beckers *et al.* [34]. Patients who had functioning adenomas were statistically younger than those affected by nonfunctioning adenomas. This could be explained by the fact that, due to the clinical manifestations caused by aberrant endocrine activity, secreting adenomas are diagnosed earlier. In NFPA group, 100% of tumors were classified as macroadenomas, while in the FPA group they were 78.57%, while 21.43% were microadenomas. There was a statistically significant difference between tumor size and subtype, since all ACTH-secreting adenomas were classified as microadenomas. According to the literature, the most common occurrence of corticotropinomas are microadenomas, and in some cases reduced tumor size precludes its location by radiological methods [8]. Likewise, Stratakis *et al.* found a large proportion of between ACTH secreting microadenomas analyzed in pediatric patients, a rare occurrence in other tumor subtypes [40].

RPRM relative gene expression was increased in GH group compared with the other groups tested. There was no statistically significant difference between the *RPRM* mRNA detection when compared NFPA and FPA, PRL and ACTH groups. *NOTCH3* gene was increased in NFPA compared to GH and PRL groups. There was no statistically significant difference in the *NOTCH3* expression in ACTH secreting tumors and no statistically significant difference was detected in

JAG1 gene among the tested groups. Further studies with large series of adenomas should be made to consolidate the use of these genes as pituitary biomarkers tumorigenesis.

BIBLIOGRAPHY

1. Kovacs K, Horvath E, Vidal S. Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol*. 2001 Sep;54(2):121–7.
2. Kovacs K, Scheithauer BW, Horvath E, Lloyd RV. The World Health Organization classification of adenohypophysial neoplasms. A proposed five-tier scheme. *Cancer*. 1996 Aug 1;78(3):502–10.
3. Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumors. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:97–126.
4. Fernández-Balsells MM, Murad MH, Barwise A, Gallegos-Orozco JF, Paul A, Lane MA, et al. Natural history of nonfunctioning pituitary adenomas and incidentalomas: a systematic review and metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Apr;96(4):905–12.
5. Jaffrain-Rea M-L, Angelini M, Gargano D, Tichomirowa MA, Daly AF, Vanbellinghen J-F, et al. Expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-interacting protein in pituitary adenomas: pathological and clinical implications. *Endocr Relat Cancer*. 2009 Sep;16(3):1029–43.
6. Losa M, Mortini P, Barzaghi R, Franzin A, Giovanelli M. Endocrine inactive and gonadotroph adenomas: diagnosis and management. *J Neurooncol*. 2001 Sep;54(2):167–77.
7. Rishi A, Sharma MC, Sarkar C, Jain D, Singh M, Mahapatra AK, et al. A clinicopathological and immunohistochemical study of clinically non-functioning pituitary adenomas: a single institutional experience. *Neurol India*. 2010 Jun;58(3):418–23.
8. Aulinas A, Colom C, Ybarra J, Muñoz F, Tresserras P, Resmini E, et al. Immediate and delayed postoperative morbidity in functional and non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*. 2012 Sep;15(3):380–5.
9. Greenman Y, Stern N. Non-functioning pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009 Oct;23(5):625–38.
10. Korbonits M, Carlsen E. Recent clinical and pathophysiological advances in non-functioning pituitary adenomas. *Horm Res*. 2009 Apr;71 Suppl 2:123–30.
11. Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev*. 1998 Dec;19(6):798–827.

12. Grossman AB. The molecular biology of pituitary tumors: a personal perspective. *Pituitary*. 2009;12(3):265–70.
13. Tichomirowa MA, Daly AF, Beckers A. Familial pituitary adenomas. *J Intern Med*. 2009 Jul;266(1):5–18.
14. Evans D, Thomas I, Thomas S, Prabhu A, Zhang M. P8 Contributions of neural crest and paraxial mesoderm to craniofacial morphogenesis in the chick embryo. *J Anat*. 2002 Nov;201(5):428.
15. Boikos SA, Stratakis CA. Molecular genetics of the cAMP-dependent protein kinase pathway and of sporadic pituitary tumorigenesis. *Hum Mol Genet*. 2007 Apr 15;16 Spec No 1:R80–7.
16. Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 May;7(5):257–66.
17. Mezzomo LC, Gonzales PH, Pesce FG, Kretzmann Filho N, Ferreira NP, Oliveira MC, et al. Expression of cell growth negative regulators MEG3 and GADD45 γ is lost in most sporadic human pituitary adenomas. *Pituitary*. 2012 Sep;15(3):420–7.
18. Vandeva S, Jaffrain-Rea M-L, Daly AF, Tichomirowa M, Zacharieva S, Beckers A. The genetics of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jun;24(3):461–76.
19. Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N, et al. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem*. 2000 Jul 28;275(30):22627–30.
20. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001 Apr 5;20(15):1803–15.
21. Bernal C, Aguayo F, Villarroel C, Vargas M, Díaz I, Ossandon FJ, et al. Reprimo as a potential biomarker for early detection in gastric cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Oct 1;14(19):6264–9.
22. Hamilton JP, Sato F, Greenwald BD, Suntharalingam M, Krasna MJ, Edelman MJ, et al. Promoter methylation and response to chemotherapy and radiation in esophageal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2006 Jun;4(6):701–8.
23. Deneff C. Paracrinicity: The Story of 30 Years of Cellular Pituitary Crosstalk. *J Neuroendocrinol*. 2008 Jan;20(1):1–70.

24. Hori K, Sen A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2013 May 15;126(Pt 10):2135–40.
25. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Dev Camb Engl.* 2004 Mar;131(5):965–73.
26. Bianchi S, Dotti MT, Federico A. Physiology and pathology of notch signalling system. *J Cell Physiol.* 2006 May;207(2):300–8.
27. Lu R, Gao H, Wang H, Cao L, Bai J, Zhang Y. Overexpression of the Notch3 receptor and its ligand Jagged1 in human clinically non-functioning pituitary adenomas. *Oncol Lett.* 2013 Mar;5(3):845–51.
28. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999 Apr 30;284(5415):770–6.
29. Chen X, Stoeck A, Lee SJ, Shih I-M, Wang MM, Wang T-L. Jagged1 expression regulated by Notch3 and Wnt/ β -catenin signaling pathways in ovarian cancer. *Oncotarget.* 2010 Jul;1(3):210–8.
30. Rodilla V, Villanueva A, Obrador-Hevia A, Robert-Moreno A, Fernández-Majada V, Grilli A, et al. Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 14;106(15):6315–20.
31. Jundt F, Pröbsting KS, Anagnostopoulos I, Muehlinghaus G, Chatterjee M, Mathas S, et al. Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood.* 2004 May 1;103(9):3511–5.
32. Choi J-H, Park JT, Davidson B, Morin PJ, Shih I-M, Wang T-L. Jagged-1 and Notch3 juxtacrine loop regulates ovarian tumor growth and adhesion. *Cancer Res.* 2008 Jul 15;68(14):5716–23.
33. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods San Diego Calif.* 2001 Dec;25(4):402–8.
34. Beckers A, Daly AF. The clinical, pathological, and genetic features of familial isolated pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc.* 2007 Oct;157(4):371–82.
35. Monet-Leprêtre M, Bardot B, Lemaire B, Domenga V, Godin O, Dichgans M, et al. Distinct phenotypic and functional features of CADASIL mutations in the Notch3 ligand binding domain. *Brain J Neurol.* 2009 Jun;132(Pt 6):1601–12.

36. Xu M, Knox AJ, Michaelis KA, Kiseljak-Vassiliades K, Kleinschmidt-DeMasters BK, Lillehei KO, et al. Reprimo (*RPRM*) is a novel tumor suppressor in pituitary tumors and regulates survival, proliferation, and tumorigenicity. *Endocrinology*. 2012 Jul;153(7):2963–73.
37. Takahashi T, Suzuki M, Shigematsu H, Shivapurkar N, Echebiri C, Nomura M, et al. Aberrant methylation of Reprimo in human malignancies. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2005 Jul 1;115(4):503–10. 38.
39. Miao Z, Miao Y, Lin Y, Lu X. Overexpression of the Notch3 receptor in non-functioning pituitary tumours. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas*. 2012 Jan;19(1):107–10.
40. Stratakis CA, Tichomirowa MA, Boikos S, Azevedo MF, Lodish M, Martari M, et al. The role of germline AIP, MEN1, PRKAR1A, CDKN1B and CDKN2C mutations in causing pituitary adenomas in a large cohort of children, adolescents, and patients with genetic syndromes. *Clin Genet*. 2010 Nov;78(5):457–63.

TABLES

Table 1. Characteristics of tumor subtypes and demographic data

Tumor subtype	Number of cases (%)	Gender M/F	Tumor size Macro/Micro	Age (years) Mean \pm DP (interval)*
Total	49 (100)	26/23	43/6	50.0 \pm 14.0 (18 - 73)
NFPA	21 (42.86)	13/8	21/0	58.2 ^a \pm 10.5 (33 - 73)
FPA	28 (57.14)	13/15	22/6	43.8 \pm 13.3 (18 - 69)
<i>p</i>¹		0.432^A	0.031^B	<0.001^C
ACTH	5 (10.20)	1/4	0/5	40.6 ^b \pm 14.9 (22 - 63)
GH	14 (28.57)	7/7	13/1	45.8 ^b \pm 14.3 (18 - 69)
PRL	9 (18.37)	5/4	9/0	42.6 ^b \pm 11.8 (22 - 58)
<i>p</i>²		0.403^A	<0.001^A	0.002^D

M: male; F: female; Macro: macroadenomas, Micro: microadenomas; SD: standard deviation.

A: χ^2 ; B: Fisher's exact test; C: Student t test; D: ANOVA

*p*¹: NFPA vs. FPA

*p*²: NFPA vs. ACTH vs. GH vs. PRL

* Means followed by the same letter have no statistical difference (Tukey's test, $p < 0.05$).

Table 2. Median of *RPRM*, *NOTCH3* and *JAG1* relative gene expression in each group and subgroup.

Tumor subtype	<i>RPRM</i> Median (25%-75%)	<i>NOTCH3</i> Median (25%-75%)	<i>JAG1</i> Median (25%-75%)
NFPA	6.00 ^A (2.53 – 9.49)	74.64 ^A (49.89 – 115.76)	9.93 (5.59 – 143.50)
FPA	16.20 (3.10 – 70.16)	3.98 (2.76 – 11.29)	10.82 (4.94 – 28.76)
<i>p</i>¹	0.014	<0.001	0.606
ACTH	6.34 ^{AB} (1.14 – 9.57)	11.10 ^{AB} (7.35 – 15.85)	3.25 (1.53 – 12.28)
GH	27.40 ^B (6.35 – 81.40)	3.02 ^B (1.20 – 3.67)	11.71 (6.81 – 33.40)
PRL	25.59 ^{AB} (1.82 – 115.41)	11.35 ^B (6.08 – 28.05)	17.96 (5.67 – 154.56)
<i>p</i>²	0.015	<0.001	0.277

*p*¹. Mann-Whitney test: NFPA vs. FPA

*p*². Kruskal-Wallis test: NFPA vs. ACTH vs. GH vs. PRL;

Median followed by the same letter have no statistical difference (Dunn's test; *p*<0.05)

4. Considerações Finais

As recentes investigações na área da biologia molecular proporcionaram uma série de novos marcadores para a pesquisa de adenomas hipofisários. Uma vez que diversos estudos prévios demonstraram que alterações frequentes na maioria dos tumores não ocorrem neste tipo de adenoma, nosso grupo buscou avaliar a expressão de dois genes com possível ação na tumorigênese hipofisária pelo método de PCR em tempo real e estabelecer relações com características clínico-patológicas. Estes genes foram escolhidos com base em estudos prévios que detectaram alterações no padrão de expressão nesta patologia. A proteína Reprimo participa da regulação do ciclo celular através da indução pela p53 resultando na parada do ciclo celular em presença de fatores nocivos a célula, que podem acarretar em mutações. Por ação oposta o receptor Notch3 estimula a proliferação celular via interações célula-célula e está mais expresso em diversas neoplasias, incluindo os adenomas de hipófise não-funcionantes. No presente trabalho se detectou redução da expressão de *RPRM* e aumento da expressão do gene *NOTCH3* nos adenomas hipofisários não-funcionantes, indicando uma possível participação das vias de proliferação ativadas por estes genes no desenvolvimento destes tumores. Assim, estes genes podem ser fatores que contribuem para maior proliferação celular e este evento poderia explicar o elevado crescimento tumoral.

Ainda, a demonstração de diferentes perfis de expressão dos genes reguladores do ciclo celular nos subtipos de adenomas de hipófise fortalece a

hipótese de que o surgimento desta patologia é influenciado por fatores moleculares variados, embora a origem celular dos tumores seja semelhante.

5. Anexos

5.1. Anexo I – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Perfil de reguladores moleculares da tumorigênese hipofisária: pesquisa de biomarcadores para os adenomas hipofisários.

(Nome completo do paciente – preencher em letra de forma – RG/Estado)

1° - O adenoma de hipófise é o mais comum dos tumores cerebrais, porém, as causas do seu desenvolvimento ainda não estão bem definidas. A presença de alguns genes é diferente entre hipófises humanas normais e adenomas. Esses dados indicam que eles podem estar envolvidos no desenvolvimento dos tumores na hipófise. Neste estudo, pesquisaremos a presença de alguns genes nos adenomas hipofisários de pacientes submetidos a cirurgia.

2° - O procedimento utilizado será a análise do adenoma de hipófise, obtido após cirurgia. O procedimento não traz riscos ao paciente, visto que o material será proveniente de cirurgia prévia.

3° - Os benefícios esperados com os resultados desta pesquisa são para o paciente, para outros pacientes com o mesmo tipo de lesão, e para o desenvolvimento da ciência, o que poderá conferir mudanças no tratamento deste tipo de tumor no futuro.

4° - É garantido ao paciente o recebimento de resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca do estudo.

5° - Caso existirem novas perguntas sobre este estudo, sobre os direitos como participante do mesmo ou prejuízo de qualquer natureza pela participação, deve ser contatada a Dra. *Maria Beatriz da Fonte Kohek* (investigadora principal) pelo telefone (51) 3303-8819 ou entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, pelo telefone: (51) 3303-8804

6° - É dada a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do Estudo, sem que isso traga prejuízo. Ressaltamos também que a concordância em participar do estudo não implica em qualquer modificação no tratamento que já está sendo feito. Da mesma forma, a não concordância em participar do estudo não irá alterar de nenhuma maneira o tratamento já estabelecido.

7° - É dada a garantia de não ser identificado e de ser mantido o caráter confidencial de informação em relação à privacidade do paciente, bem como a não divulgação de qualquer dado que possa produzir a identificação do mesmo durante toda a pesquisa, em respeito a sua privacidade.

8° - É assumido o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade em continuar

participando.

9º - É garantido que todos os gastos de realização de exames do protocolo da pesquisa serão absorvidos pelo orçamento do estudo, não havendo qualquer gasto para o paciente.

10º - A equipe se compromete em utilizar apenas parte do material proveniente da cirurgia para a realização de tal pesquisa, ficando o material restante adequadamente preservado na Instituição depositária (Laboratório de Patologia da ISCMPA) e a disposição do paciente.

Estou ciente e de acordo com a realização de estudos complementares por uma equipe multidisciplinar e, autorizo a utilização do material proveniente da cirurgia para aplicação das técnicas necessárias ao presente estudo. Estou ciente de que não serão violados os segredos profissionais obtidos pelo exames aos quais me submeterei. Assino o presente documento, em duas vias de igual teor, ficando uma em minha posse, ciente de todos os benefícios e riscos descritos acima.

A minha assinatura neste *Consentimento Livre e Esclarecido* dará autorização ao coordenador do estudo e ao Comitê de Ética da UFCSPA de utilizarem os dados obtidos quando for necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha privacidade.

Porto Alegre, _____, _____, _____.
(dia) (mês) (ano)

Assinatura do Voluntário:

Assinatura do Responsável pelo projeto:

Profª. Drª. Maria Beatriz da Fonte Kohek

Assinatura da testemunha:

5.2. Anexo II – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFCSPA)

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Perfil de reguladores moleculares da tumorigênese hipofisária: pesquisa de biomarcadores para os adenomas hipofisários	
Pesquisador Responsável Maria Beatriz da Fonte Kohek	Parecer 1824/12
Data da Versão 13/07/2012	Cadastro 028/12
Data do Parecer 27/09/2012	
Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais	
Objetivos do Projeto Avaliar a expressão de miRNAs em amostras tumorais de adenoma hipofisários.	
Sumário do Projeto Será avaliada a expressão de microRNAs em adenomas hipofisários obtidos de pacientes submetidos à cirurgia transfenoidal no Hospital São José da ISCMPA.	

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

O estudo será realizado em colaboração com o Serviço de Endocrinologia da ISCMPA, que autorizou a realização do estudo.

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 50 Local 50
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Crterios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	10/2012
Data de término prevista	03/2013
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
-----------------------------------	------------------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

5.3. Anexo III – Normas da revista para submissão de artigo científico.

Journal of Endocrinological Investigation (JENI)

Official Journal of Italian Society of Endocrinology (SIE)

Editor-in-Chief: Luigi Bartalena

ISSN: 1720-8386 (electronic version)

Journal no. 40618

2013 Impact Factor 1.552

Types of Papers

Genetic Association studies

The Journal of Endocrinological Investigation is interested in publishing genetic association papers in Endocrine and Metabolic disorders that present results that are novel, statistically valid, and that add significantly to the field. We have followed the reporting guidelines outlined in the STREGA (STrengthening the REporting of Genetic Association studies) Statement (cf. below) [1], and the subsequent criteria should be met for any genetic study submitted to the journal.

1) The authors must present a power calculation based on sample size and minor allele frequency of the included SNP, in order to estimate if the size of the study has the power to detect the association. We suggest authors may consult the "Genetic Power Calculator" [2] as a possible program to perform power and/or sample size calculations for genetic association studies.

2) Test on Hardy-Weinberg Equilibrium must be carried out and the p-value reported

3) If multiple SNPs in a single gene are tested, the LD (linkage disequilibrium) structure must be reported

4) Appropriate correction for multiple testing (if multiple independent SNPs are reported) must be included.

5) If the study describes a novel association, a replication study must be included in the submitted manuscript. However, if the first study has already an appropriate sample size and if the results show a strong association, it might not be necessary to provide a replication. Also, if the study population has specific characteristics that make it difficult to find a second cohort, the replication study may not be required.

6) If the submitted study replicates previously published findings, there should be sufficient novelty to add significantly to the literature (for example, extending the observed association to additional intermediate traits or disease groups).

References:

[1] Little J et al: STrengthening the REporting of Genetic Association Studies (STREGA): an extension of the STROBE statement. PLoS Med. 2009 Feb 3;6(2):e22.

[2] Purcell S, et al. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. Bioinformatics 2003, 19(1):149-150 (cf. below).

- STREGA statement
- Genetic Power Calculator

Review Articles

Overview papers on selected topics. Both Reviews and Short Reviews articles are in general invited by the editors but suggestions by interested individuals may also be considered. Prospective authors should submit a formal and detailed proposal to the Editor, indicating the title and a brief outline of the content.

Manuscripts should provide an up-to-date and authoritative review of a topic in any area of experimental and clinical endocrinology, metabolism and andrology.

Review Articles should not exceed 7.500 words including an abstract of no more than 250 words, references, tables and figures. Keywords are requested.

Short Review articles

Short Review Articles should not exceed 4.000 words including an abstract of no more than 250 words, references, tables and figures. Keywords are requested.

Original Articles

Accounts of research or clinical practice that should be based on original rather than confirmatory data. Typically, Original Articles will present new data derived from a sizable series of subjects or patients. Original Articles should not exceed 5.000 words including an abstract of no more than 250 words, references, tables and figures. Keywords are requested.

Rapid Communications

Rapid Communications are reserved to novel findings that require fast publication, while confirmatory or negative data will not be considered for this kind of publication.

They should not exceed 2.000 words, including an abstract of no more than 150 words, 1-2 illustrations and up to 10 references are permitted. Keywords are requested.

Brief Reports

Comments are reserved to concise articles that are primarily based on essentially negative or confirmatory data or are of a relatively minor relevance.

They should not exceed 1.000 words, 1-2 illustrations and up to 5 references are permitted. Comments should not have an abstract, keywords are requested.

Opinions

Opinions written by recognized authorities in their own field of research will be published only under direct invitation by the Editorial Board. They should not exceed 1.500 words, 1-2 illustrations and up to 10 references are permitted. Opinions should not have an abstract, keywords are requested.

Letter to the Editor

Publication of correspondence is at the discretion of the Editorial Board.

Brief letters providing pertinent comments on published articles will be considered and the authors concerned will be given a right to reply. Letters raising problems of general interest will also be considered.

They must not exceed 500 words, 3 references and 3 authors. They should not have an abstract. No figures or tables are allowed. They should be addressed to the Editor-in-Chief. Submitted letters will be subject to shortening and editorial revision.

Editorials

Invited Editorials linked to recent high-quality papers are also published at the discretion of the Editorial Board. They should not exceed 750 words, not include illustrations, and references should be limited to 3.

Endocrinology and art

Descriptions of paintings and sculptures showing subjects with identifiable endocrine problems are published occasionally. They should not exceed 200 words, references should be no more than 2.

"Endocrinology and art" are usually invited, although unsolicited "Endocrinology and art" may be considered for publication.

Authors hoping to submit an unsolicited "Endocrinology and art" should first consult the Editors-in-Chief and the section editor at valeriana.ramondo@springer.com

Proposals should include the paper and a full author list with affiliations and areas of expertise.

- Guidelines, position statements, consensus statements on relevant clinical and therapeutic problems are regularly published. They are mostly generated by the Italian Society of Endocrinology, but may be submitted by well established national or international societies. They should not exceed 3500 words, 3-4 illustrations, references should in principle be limited to 50-60. An abstract is not requested.
- Clinical Symposia from invited contributors are published occasionally.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Language

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to ask a native speaker to help you or arrange for your manuscript to be checked by a professional language editor prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

- Edanz Editing Global

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions). Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling ("self-plagiarism")).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:
 - If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
 - If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
 - The author's institution may be informed.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" on the title page when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the Instructions for Authors carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia

- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants and/or animals

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards."

For retrospective studies, please add the following sentence:

"For this type of study formal consent is not required."

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning. The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.” If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included: “Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer’s online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.