

Universidade Federal do Maranhão  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós Graduação em Saúde Materno Infantil  
Mestrado Acadêmico

**BRUNO DE ALMEIDA NUNES**

Análise da expressão dos receptores da somatostatina (SST1-5) e  
da dopamina (DR2) em adenomas hipofisários

São Luís

2012

**BRUNO DE ALMEIDA NUNES**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DA  
SOMATOSTATINA (SST1-5) E DA DOPAMINA (DR2) EM  
ADENOMAS HIPOFISÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil  
da Universidade Federal do Maranhão,  
para obtenção do Título de Mestre em  
Saúde Materno Infantil

Orientador: Profa. Dra. Emygdia Rosa Leal  
Mesquita

Orientador: Prof. Dr. Manuel dos Santos  
Faria

São Luís

2012

Nunes, Bruno de Almeida

Análise da expressão dos receptores da somatostatina (SST1-5) e da dopamina(DR2) em adenomas hipofisários / Bruno de Almeida Nunes.\_São Luís, 2012.

101f.:Il.

Impresso por computador (fotocópia)

Orientador: Emygdia Rosa Leal Mesquita

Co-orientador: Manuel dos Santos Faria

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Maranhão, Mestrado em Saúde Materno Infantil, 2012.

1. Somatostatina \_ Rceptor. 2. Dopamina. 3. Tumores hipofisários. I. Título.

CDU 616-006

**Bruno de Almeida Nunes**

**Análise da Expressão dos Receptores da Somatostatina (SST1-5) e da  
Dopamina (DR2) em Adenomas Hipofisários**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do Título de Mestre em Saúde Materno Infantil.

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: 12 / 03 / 2012.

---

Profa. Dra. Emygdia Rosa Leal Mesquita (orientadora)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Manuel dos Santos Faria (orientador)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Leandro Miranda Alves  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Lívio Martins Costa Júnior  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Raimundo Gomes Oliveira  
Universidade Federal do Maranhão

**A Deus e a minha família.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus motivo e causa maior de todas as coisas, sem O qual nada seria possível.

Aos meus pais que sempre ao meu lado me ensinaram a perseverar e lutar pelos meus objetivos sempre confiando em Deus.

A minha irmã que sempre me compreendeu e incentivou, partilhando comigo dessa árdua missão de executar um projeto de dissertação de mestrado.

A Mayara minha noiva, que tem me acompanhado, sempre carinhosa e atenciosa conosco.

As minhas queridas Larissa e Laura (minhas filhas) e Conceição que tornam meus dias mais tranquilos e harmoniosos com sua existência.

Aos meus orientadores prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Emygdia Rosa por possibilitar a realização deste projeto e por todos os anos de orientações, e ao prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Manuel Faria pela confiança depositada em mim, que nos permitiu uma relação que ultrapassou o campo profissional e me fez hoje mais um de seus admiradores, principalmente pelo modo devotado e apaixonado ao trabalho, além de todos os ensinamentos a mim conferidos por ele juntamente com o Dr<sup>o</sup> Gilvan Cortês e a Dr<sup>a</sup> Ana Gregória.

Aos amigos que fiz na UFRJ que me receberam de braços abertos, sempre dispostos a ajudar. Ao grupo da Dr<sup>a</sup> Mônica Gadelha, e de modo muito especial ao laboratório da prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Christina Takiya que é mais um dos exemplos que pretendo levar por toda a vida de amor à ciência e comprometimento com o trabalho. Ao prof. Dr<sup>o</sup> Leandro Miranda, ao Dr<sup>o</sup> Leandro Kasuki e a Luis Fragoso companheiros de pesquisa e bons amigos.

Aos meus amigos do LEGH que nos últimos meses estamos fiando novas e mais saudáveis relações, que nos permitiram uma maior convivência e conhecimento mútuo, de modo particular as alunas Fernanda Oliveira e Amanda Vidal, grandes amigas, partes essenciais para a execução e realização deste projeto de pesquisa.

Ao Serviço de Patologia e ao Centro de Pesquisa Clínica do HUUFMA por todas as colaborações realizadas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Tecnológico do Maranhão - FAPEMA pelo apoio financeiro ao projeto, concedido via bolsa de mestrado e edital universal nº 010/2009.

“ Não é o mais forte que sobrevive,  
nem o mais inteligente, mas o que  
melhor se adapta às mudanças.”

(Charles Darwin)

“ Pensamos demasiadamente  
Sentimos muito pouco  
Necessitamos mais de humildade  
Que de máquinas.  
Mais de bondade e ternura  
Que de inteligência.  
Sem isso,  
A vida se tornará violenta e  
Tudo se perderá.”

(Charles Chaplin)

## RESUMO

Os tumores hipofisários correspondem por cerca de 15% das neoplasias intracranianas e são geralmente benignos. O tratamento primário mais comumente utilizado é a cirurgia com exceção para os prolactinomas, devido a eficácia do tratamento com a utilização de agonistas dopaminérgicos. Caso o resultado cirúrgico não leve a ressecção da doença, faz-se necessário o uso de outras modalidades terapêuticas, na tentativa de controlar os níveis hormonais e crescimento tumoral. A radioterapia e o tratamento medicamentoso com os análogos da somatostatina e/ou os agonistas dopaminérgicos são frequentemente utilizados como tratamento adjuvante. O presente estudo teve por objetivo analisar a presença, distribuição e frequência dos receptores da somatostatina e da dopamina (DR2) em adenomas hipofisários e comparar as suas expressões do mRNA e proteicas, através de testes por qPCR em tempo real e por imunohistoquímicos. Foram analisados 38 pacientes diagnosticados com adenomas hipofisários. Os adenomas secretores de GH apresentaram imunoreatividade mais frequente dos receptores SST2 e SST3, presentes em 100% dos tumores, seguidos pelos receptores SST5, SST4 e SST1, respectivamente. Nos adenomas clinicamente não funcionantes o receptor mais amplamente distribuído foi o SST3, presente em 13 dos 14 tumores seguidos pelo SST2, SST4, SST1 e SST5 respectivamente. A expressão do mRNA dos receptores SST2 e SST5 estava presente em todos os adenomas hipofisários estudados, com maior expressão do subtipo SST2. A expressão do mRNA do receptor DR2 foi encontrada em aproximadamente 85% das amostras analisadas. Em conclusão, a elevada expressão do SST2 nos somatotropinomas reforça a possibilidade do uso do octreotide como terapia complementar no tratamento dos pacientes acromegálicos. Os pacientes com adenomas clinicamente não funcionantes apresentaram expressão dos receptores da somatostatina e da dopamina o que indica a possibilidade de tratamento destes pacientes com os análogos da somatostatina e/ou agonistas dopaminérgicos.

Palavras-Chave: Tumores hipofisários. Receptores da somatostatina. Receptor da dopamina

## ABSTRACT

Pituitary tumors represent 15% of intracranial neoplasms and are usually benign. The treatment primary is surgical resection with exception for prolactinomas because dopamine agonists are very effective in the treatment these tumors. If surgery does not lead to healing, it is necessary other therapeutic strategy in a attempt to control hormone levels and tumor size reduction. The radiotherapy and medical treatment with somatostatin analogs and agonist dopamine are often used. The study aimed to analyze the presence, distribution and frequency of somatostatin receptor and dopamine receptor (DR2) in pituitary adenomas, and compared their mRNA expression and protein expression. We studied 38 patients with pituitary adenomas. The GH-secreting adenomas showed immunoreactivity more frequent SST2 and SST3 present in 100% of the tumors followed SST5, SST4 and SST1 respectively. Clinically nonfunctioning adenomas SST3 receptor was most widely distributed, present in 13 of 14 tumors followed SST2, SST4, SST1 and SST5 respectively. The mRNA expression of SST2 and SST5 receptor was present in all pituitary adenomas with higher expression of SST2. The DR2 receptor was present and 85% of samples analyzed. In conclusion, the high expression of SST2 in somatotropinomas support the possibility of the use of octreotide as an adjunct therapy in the treatment of acromegalic patients. Patients with clinically nonfunctioning adenomas showed expression of somatostatin receptor and dopamine which indicates the possibility of treating these patients with the somatostatin analogues and / or dopamine agonists.

Keywords: Pituitary tumors. Somatostatin receptor. Dopamine receptor

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Localização cromossômica e atividade celular dos receptores da somatostatina SST1-5.	21
Tabela 2 – Anticorpos policlonais anti-receptor da somatostatina (SST1-SST5).	47
Tabela 3 – Sequência de primers, tamanho do produto e temperatura de anelamento dos receptores da somatostatina (SST1-5), dopamina (DR2) e controle endógeno ( $\beta$ -actin) para PCR em tempo real.	50
Tabela 4 – Perfil da imunexpressão protéica dos receptores da somatostatina (SST1-SST5) em somatotropinomas.	53
Tabela 5 – Perfil da imunexpressão protéica dos receptores da somatostatina (SST1-SST5) em corticotropinomas.	55
Tabela 6 – Perfil da imunexpressão protéica dos receptores da somatostatina (SST1-SST5) em adenomas hipofisários não funcionantes.	58
Tabela 7 – Perfil da imunexpressão protéica dos receptores da somatostatina (SST1-SST5) em prolactinomas.	60
Tabela 8 – Expressão gênica dos receptores SST2, SST5 e DR2 em adenomas hipofisários não funcionantes, somatotropinomas, corticotropinomas e prolactinoma.	67
Tabela 9 – Expressão do mRNA e expressão protéica dos receptores da somatostatina SST2 e SST5 em adenomas hipofisários.	68
Tabela 10 – Comparação entre o perfil da expressão do mRNA e protéica dos receptores da somatostatina SST2 e SST5.	69

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 – Esquema da principal cascata de sinalização intracelular associada a receptores de somatostatina em células de hipófise.	25
Figura 2 – Esquema estrutural do receptor DR2. DR2 longo com inserção de sequência com 29 aminoácidos no terceiro loop citoplasmático.	31
Figura 3 – Gráfico da incidência dos SST1-5 nos somatotropinomas.	52
Figura 4 – Gráfico da presença dos diferentes subtipos de receptores da somatostatina em somatotropinoma.	53
Figura 5 – Fotomicrografias de adenomas hipofisários de pacientes acromegálicos.	54
Figura 6 – Fotomicrografias de adenomas hipofisários de pacientes com a doença de Cushing.	56
Figura 7 – Gráfico da incidência dos SST1-5 nos adenomas clinicamente não funcionantes.	57
Figura 8 – Gráfico da presença dos diferentes subtipos de receptores da somatostatina em ACNF.	58
Figura 9 – Fotomicrografias de adenomas hipofisários de pacientes com adenomas hipofisários clinicamente não-funcionantes.	59
Figura 10 – Fotomicrografias de adenomas hipofisários de pacientes com adenomas hipofisários secretores de prolactina.	61
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 2,5%.	63
Figura 12 – Gráfico da curva de dissociação evidenciando a presença de um único pico Amplificação das amostras em estudo para o gene $\beta$ -actina.	64

Figura 13 - Gráfico das diluições  $10^8$ - $10^1$  para formação da curva padrão necessária para a quantificação absoluta por PCR em tempo real. Diluições em triplicatas do gene  $\beta$ -actina.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AD – Agonista dopaminérgicos

ACNF – Adenoma hipofisário clinicamente não funcionante

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

BSA – *Bovine serum albumin* – Albumina sérica bovina

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DR2L – Receptor de dopamina tipo 2 isoforma longa

DR2S – Receptor de dopamina tipo 2 isoforma curta

DR – *Dopamine receptors* – Receptores de dopamina

FSH – Follicle-stimulated hormone – hormônio folículo estimulante

GH – *Growth Hormone* – Hormônio do crescimento

GHRH - *Growth-hormone releasing hormone* - Hormônio liberador do hormônio do crescimento

Gs – proteína G estimulatória

IGF-I – *Insulin-like growth factor type I* – Fator de crescimento insulina-símile tipo I

mRNA - *messenger ribonucleic acid* – ácido ribonucléico mensageiro

IP3 – 1,4,5-inositol trifosfato

MAPK – mitogen-activated protein kinase – proteína quinase regulada por mitógenos

PBS – *Phosphate buffer saline* – Tampão salina fosfato

PKA – Proteína quinase A

PKC – Proteína quinase C

PRL – Prolactina

*real time* qRT-PCR – *real time reverse transcriptase polymerase chain reaction* –  
Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RM – Ressonância magnética

RT-PCR – Transcrição reversa – Reação em cadeia da polimerase

SST – Somatostatina

SSTR – *Somatostatin receptors* – Receptores de somatostatina

TC – Tomografia computadorizada

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TOTG – Teste oral de tolerância à glicose

## SÚMARIO

	Pág.
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	17
<b>1.1 – Somatostatina</b>	18
1.1.1 – Receptores da somatostatina	19
1.1.2 – Análogos da somatostatina (SST1-SST5)	23
1.1.3 – Mecanismo de ação	24
<b>1.2 – Dopamina</b>	26
1.2.1 – Receptores da dopamina	27
1.2.2 – Agonistas dopaminérgicos	28
1.2.3 – Mecanismo de ação	30
<b>1.3 - Somatotropinomas</b>	32
<b>1.4 - Corticotropinomas</b>	36
<b>1.5 – Adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes.</b>	38
<b>2. OBJETIVOS</b>	42
2.1 – Objetivo geral	42
2.2 – Objetivos específicos	42
<b>3. PACIENTES E MÉTODOS</b>	43
3.1 – Local do estudo	43
3.2 – Tipo de estudo	43
3.3 – População estudada	43
3.4 – Amostra	44
3.5 – Aspectos Éticos	44
3.6 – Testes realizados	44
3.6.1 – Imunohistoquímica	45

	Pág.
3.6.2 – Biologia molecular	47
<b>3.7 – Análise Estatística</b>	51
<b>4. RESULTADOS</b>	50
<b>4.1 – Caracterização da casuística</b>	51
<b>4.2 – Perfil da expressão proteica dos (SST1-5)</b>	51
4.2.1 – Expressão proteica dos receptores da somatostatina em somatotropinomas	52
4.2.2 – Expressão proteica dos receptores da somatostatina em corticotropinomas	55
4.2.3 – Expressão proteica dos receptores da somatostatina em adenomas hipofisários clinicamente não-funcionantes	57
4.2.4 – Expressão proteica dos receptores da somatostatina em prolactinomas	60
<b>4.3 – Perfil da expressão do mRNA dos SST2, SST5 e DR2</b>	62
4.3.1 – Expressão do mRNA do receptor da somatostatina SST2 e SST5	65
4.3.2 – Expressão do mRNA do receptor da dopamina subtipo DR2	66
<b>4.4 – Comparação entre os perfis da expressão do mRNA e proteica</b>	68
<b>5. DISCUSSÃO</b>	70
<b>6. CONCLUSÃO</b>	80
<b>REFERÊNCIA</b>	81
<b>APENDICE 1 – Termo de Consentimento livre e esclarecido</b>	91
<b>ANEXO 1 – Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa</b>	95
<b>ANEXO 2 – PROTOCOLO: Purificação total de RNA de tecido animal</b>	97
<b>ANEXO 3 – PROTOCOLO: Kit <i>DNase I (RNase-free)</i></b>	100
<b>ANEXO 4 – PROTOCOLO: Reação da transcriptase reversa PCR</b>	101

## **1 - INTRODUÇÃO**

Os tumores da adeno-hipófise representam 15% das neoplasias intracranianas e são geralmente benignos. Apesar de comuns na população geral, um pequeno número destes tumores leva a manifestações clínicas, seja pela presença de compressão de estruturas vizinhas (hipopituitarismo, sintomas visuais, cefaléia) ou devido a síndromes endócrinas causadas pela hipersecreção hormonal (PORTERFIELD; WHITE, 2007).

Vários estudos sugerem que os diversos tipos de adenomas hipofisários podem ser resultado de proliferações celulares de natureza monoclonal, o que pode indicar a ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores tumorais. Dependendo de sua origem, eles podem ser classificados como somatotropinomas, corticotropinomas, prolactinomas ou adenomas hipofisários não funcionantes. A maioria destes adenomas possui uma velocidade de crescimento lenta, porém, em cerca de um terço dos casos o tumor apresenta um comportamento invasivo e em uma pequena fração pode ocorrer metástase (FERONE et al., 2007; BEM-SHLOMO, 2008; GROZINSKY-GLASBERB et al., 2008).

O tratamento primário mais comumente usado em pacientes com adenomas hipofisários é a remoção cirúrgica do tumor, com exceção dos prolactinomas que apresentam uma boa resposta ao tratamento medicamentoso com a utilização dos agonistas dopaminérgicos. No tratamento cirúrgico a via transesfenoidal é a mais utilizada, por apresentar baixas taxas de morbidades e mortalidade, indicada para tumores que possuem pequena ou moderada extensão supra-selar, outra via de acesso é a transcraniana indicada em casos onde os adenomas apresentem grande extensão supra-selar (MORTINI et al., 2005; GROZINSKY-GLASBERB et al., 2008).

A cirurgia tem por objetivo a ressecção da massa tumoral, com preservação da função hipofisária e busca a cura do paciente. Dependendo de fatores, tais como, a localização do tumor, tamanho, agressividade e ainda da experiência do neurocirurgião existe sempre a possibilidade de reminiscência da massa tumoral e recidiva, variando a eficácia do procedimento em 50% dos casos (MELMED et al., 2002; NOMIKOS et al., 2005; BATISTA et al., 2006; TULIPANO; SCHULZ, 2007; HOFLAND, 2008).

Caso o resultado cirúrgico não logre êxito, faz-se necessário o uso de outras modalidades terapêuticas, na tentativa de controlar os níveis hormonais e crescimento tumoral. Dentre elas, estão disponíveis a radioterapia e o tratamento medicamentoso, sendo os mais frequentemente utilizados os análogos da somatostatina e/ou os agonistas dopaminérgicos, que tem importantes efeitos anti-secretórios e antiproliferativos já descritos (HOFLAND, 2008; LANIA et al., 2008).

### **1.1 – Somatostatina**

Somatostatina (SS) é um neuropeptídeo que regula neurotransmissão no cérebro e secreção hormonal da hipófise anterior, pâncreas e do trato gastrointestinal. É sintetizada inicialmente como uma grande molécula precursora que sofre processamento proteolítico e gera duas formas biologicamente ativas, consistindo de 14 e 28 aminoácidos SS-14 e SS-28 respectivamente, que exibem expressão tecido-específica. O SS-14 e SS-28 atuam com alta afinidade via receptores de membrana ligados à proteína G (CSABA; DOURNAUD, 2001; HOFLAND; LAMBERTS, 2003, TULIPANO; SCHULZ, 2007).

A somatostatina exerce uma variedade de efeitos biológicos, e semelhante a todas as moléculas sinalizadoras hidrossolúveis, necessita ligar-se a receptores específicos das células-alvo. Os efeitos mais importantes da somatostatina ocorrem na adeno-hipófise, com a inibição da secreção de GH e TSH, e no trato gastrointestinal, com inibição da insulina, glucagon, a produção de ácido hipoclorídrico, absorção do fluído intestinal, contratilidade vascular e absorção de nutrientes e íons. Além de possuir papel nas funções neurotransmissoras e cognitivas, este peptídeo controla a proliferação de células normais e tumorais (MELMED, et al., 2002; GUILLERMET-GUIBERT, 2005; GAHETE et al., 2008).

#### 1.1.1 – Receptores da Somatostatina (SST1-SST5)

A ação biológica da somatostatina é mediada por cinco subtipos de receptores ligados à proteína G, que são codificados por cinco diferentes genes, todos localizados em cromossomos distintos, expressos em tecidos neuronais, não neuronais, e tumorais, apresentando um complexo padrão de expressão. Via *splicing* alternativo o receptor SST2 pode gerar duas formas, SST2<sub>A</sub> e SST2<sub>B</sub>, possuindo diferença no comprimento da cauda citoplasmática. A família desses receptores foi identificada primeiramente em 1978 por Schonbrunn e Tashjian em células da hipófise de ratos (JACOBS; SCHULZ, 2008; HOFLAND, 2008; VOLANTE et al., 2008).

Os receptores estão amplamente distribuídos, no sistema nervoso, no pâncreas, intestino, na hipófise, glândula tireóide, células do sistema imune e em tumores endócrinos, podendo ser expresso mais de um subtipo do receptor. Técnicas de imunohistoquímica e autoradiografia revelaram a expressão protéica dos SST's

(receptores da somatostatina, SST1-SST5), em gastrinomas, insulinomas, tumores carcinóides e em suas metástases, com uma distribuição heterogênea dos receptores. Entretanto, a frequência e o padrão de expressão de cada subtipo de receptor podem variar em diferentes tipos tumorais e também em cada indivíduo (GUILLERMET-GUIBERT, 2005).

Os tumores neuroendócrinos como os adenomas hipofisários, os tumores de células de ilhotas, carcinóides paragangliomas, feocromocitomas e carcinomas da tireóide apresentam frequentemente, elevada expressão dos SST's. A expressão desses receptores tem sido demonstrada devido à utilização de técnicas de biologia molecular como hibridização *in situ*, ensaios de proteção utilizando-se RNase e RT-PCR (transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase) e a imunohistoquímica (VIKIC-TOPIC et al. 1995; TABOADA et al., 2007; TAKEI et al., 2007).

Os subtipos de receptor da somatostatina exercem ações biológicas distintas em resposta a somatostatina. Essas ações incluem inibição da atividade da adenilil ciclase (AC), e bloqueio dos canais de cálcio que levam a inibição da secreção hormonal, estimulação da fosfotirosina fosfatase (PTPases) ou ativação da MAP quinase (MAPK). A ativação da fosfotirosina fosfatase, através dos SST1 e SST2, é importante, pois possui atividade antimitótica em resposta aos análogos da somatostatina, enquanto a ativação do SST5 via redução dos níveis de cálcio intracelular também resulta na inibição da proliferação celular. Por outro lado, a ativação do receptor subtipo SST3, induz a apoptose (PATEL, 1997; HOFLAND; LAMBERTS, 2003; ZATELLI et al., 2005; TULIPANO; SCHULZ, 2007).

**Tabela 1** – Localização cromossômica e atividade celular dos receptores da somatostatina SST1-SST5 na adeno-hipófise.

Receptor	Cromossomo	Atividade Celular
SST1	14q13	Associado a diminuição na progressão celular e angiogênese, além do aumento da expressão da p21.
SST2	17q24	Induz a apoptose por mecanismos independentes da p53, redução da expressão do anti-apoptótico Bcl-2, inibi a secreção do GH através do aumento do TNF $\alpha$ (Fator de necrose tumoral).
SST3	22q13.1	Ativação da p53, proteína pró-apoptótica Bax e caspase 8.
SST4	20p11.2	Sem função definida
SST5	16p13.3	Inibição da secreção de GH, através da inibição da adenilil cilclase e canais de potássio.

Uma parcela considerável dos tumores humanos que expressam receptores da somatostatina apresenta a expressão de múltiplos subtipos de receptores, sendo o subtipo SST2 o mais amplamente distribuído. Entretanto, pode haver divergências entre os níveis de expressão do mRNA e protéica. A expressão do mRNA pode, em alguns casos, apresentar-se mais elevada quando comparada aos níveis de expressão protéica, podendo essas divergências serem atribuídas a diferenças na sensibilidade das técnicas utilizadas como a RT-PCR e a imunohistoquímica, à regulação negativa dos receptores, ou ainda a diferenças entre os produtos da transcrição, mRNA, e os produtos da tradução gênica, que nos eucariotos pode não ocorrer de forma simultânea. Contudo, de modo geral técnicas como qRT-PCR podem superestimar a porcentagem real da expressão dos receptores, devido à presença de vasos sanguíneos, células imunes e

contaminação com células normais, que circundam os tumores humanos (REUBI et al., 1994, HOFLAND; LAMBERTS, 2003).

A sequência de ativação intracelular dos SST's é similar a outros receptores acoplados a proteína G e incluem fosforilação e internalização dos receptores. Após a ligação do agonista e ativação da proteína G, a sinalização é mediada pela fosforilação de domínios de receptores quinases intracelulares acoplados a proteína G e subsequente recrutamento de proteínas citoplasmáticas denominadas arrestinas que interrompem a ligação entre o receptor e seus cognatos heterotriméricos da proteína G. Contudo as arrestinas não mediam endocitose de todos os GPCR's (JACOBS; SCHULZ, 2008).

Após a internalização dos receptores há uma desfosforilação nos endossomos e subsequentemente, esses receptores são reciclados e direcionados novamente para a membrana plasmática ou são degradados nos lisossomos. A regulação negativa dos receptores pode está relacionada a essa degradação nos lisossomos e/ou a um decréscimo na síntese de mRNA, que consequentemente levaria a uma diminuição da síntese dos receptores de somatostatina. Os subtipos de SST's diferem em suas habilidades de internalização devido à formação do complexo receptor-ligante, que é um passo fundamental para a ligação direta do análogo ou dos componentes citotóxicos no núcleo da célula tumoral (HOFLAND; LAMBERTS, 2003; TULIPANO; SCHULZ, 2007).

### 1.1.2 – Análogos da somatostatina

Os análogos da somatostatina foram sintetizados com base nos dados estruturais e funcionais do SS-14, demonstrando que os resíduos dos aminoácidos nas posições 7-10 eram fundamentais para sua atividade biológica. Entre as numerosas designações os octa-peptídeos, por exemplo, octreotide e lanreotide, possuem afinidades pelos receptores da somatostatina, em particular pelo subtipo SST2 e são utilizados para uso clínico. Os análogos de “longa duração” têm sido amplamente aceitos como a melhor opção medicamentosa para o tratamento da acromegalia (HOEK et al., 2007; BEM-SHLOMO; MELMED, 2008; VOLANTE et al., 2008).

Novos análogos sintéticos com alta afinidade de ligação por todos os subtipos de receptores estão atualmente sendo investigados, como o cíclico hexapeptídeo pasireotide (SOM230) que possui um perfil de ligação universal aos receptores da somatostatina com afinidade 25, 5 e 40 vezes maior pelos subtipos SST1, SST3 e SST5 respectivamente, e 2,5 vezes menor afinidade pelo subtipo SST2 quando comparado com o octreotide (HOEK et al., 2007; VOLANTE et al., 2008).

A maioria dos tumores hipofisários, particularmente os adenomas secretores de GH e TSH, respondem aos análogos da somatostatina, com uma diminuição ou normalização dos níveis hormonais, com evidente melhora dos sinais e sintomas clínicos da doença. Desde a descoberta das propriedades anti-secretoras, os análogos da somatostatina têm sido amplamente empregados na terapia medicamentosa dos adenomas hipofisários. Contudo, pelo menos 35% dos pacientes são considerados parcialmente ou totalmente resistentes ao tratamento com os análogos da somatostatina comercialmente disponíveis, podendo esta resistência ser associada à baixa expressão

do SST2, e possivelmente a mutações no oncogene *gsp* (TULIPANO; SCHULZ, 2007; BEM-SHLOMO; MELMED, 2008)

### 1.1.3 – Mecanismo de Ação

A ligação da somatostatina ou de seus análogos ao seu receptor inicia um conjunto de eventos de sinalização marcados pela interação e ativação dos receptores com um grande número de diferentes padrões protéicos que envolvem principalmente a ativação da proteína G e consequente ativação de enzimas chaves, incluindo a adenilil ciclase, PTPases e *MAPK* que são moduladas com alterações nos níveis intracelular de íons cálcio e potássio. Os análogos da somatostatina em células de tumores hipofisários produzem sua ação anti-proliferativa agindo via sinalização da fosfatidilinositol 3-kinase (*PI3K*) /AKT (TULIPANO; SCHULZ, 2007).

A somatostatina e seus análogos desempenham importante papel no tratamento de tumores neuroendócrinos, ambos em termos de controles dos sintomas clínicos e da atividade anti-proliferativa. Devido a este fato, a ligação e a expressão dos receptores da somatostatina são fundamentais para o entendimento do seu sistema de ação. Deste modo, muitos estudos analisam em detalhes, as diferenças na formação do complexo receptor-ligante e/ou a expressão dos receptores de somatostatina (LANIA et al., 2008).

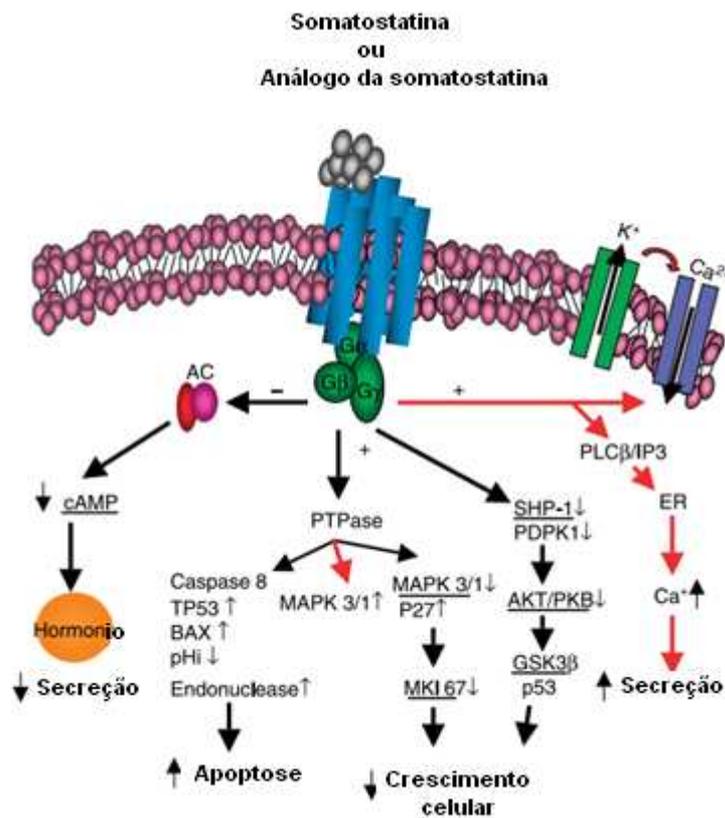


Figura 1 – Esquema da principal cascata de sinalização intracelular associada a receptores de somatostatina em células de hipófise. A ligação da somatostatina (ou análogos da somatostatina) ao seu receptor inibe a *adenylil cyclase*, ativando canais de K<sup>+</sup> e/ou inibindo canais de Ca<sup>2+</sup>. *PTPases* e *MAPK* podem também produzir ações citostáticas. E mais recentemente, aumento da apoptose via p53 foi também demonstrada. (Adaptado de Ferone et al., 2009).

O interesse na expressão e distribuição destes receptores em tumores neuroendócrinos tem crescido, sobretudo devido à expansão do arsenal terapêutico aberto pelo uso dos agonistas dopaminérgicos e análogos da somatostatina para o controle dos sintomas hormonais e diminuição do crescimento tumoral.

## **1.2 – Dopamina**

Dopamina (DA) é uma catecolamina que no sistema nervoso central funciona como um neurotransmissor e neurohormônio, sendo responsável por diversas funções incluindo cognição, emoção, atividade locomotora, fome e saciedade, e regulação do sistema endócrino. A dopamina também desempenha múltiplas funções na periferia como modulador das funções cardiovascular e renal, da motilidade gastrointestinal e no sistema endócrino funciona exercendo suas funções via ligação aos receptores de dopamina (PIVONELLO et al., 2004).

A biossíntese da dopamina inicia-se com o aminoácido tirosina, proveniente na sua maior parte da alimentação, contudo, uma pequena quantidade deste aminoácido tem sua origem na hidroxilação hepática da fenilalanina pela fenilalanina hidroxilase. A tirosina é captada pelos neurônios por processo ativo, e convertida em L-dopa pela ação da tirosina hidroxilase (TH), que representa a etapa limitante na síntese da dopamina. Sequencialmente a L-dopa sob ação da L-aminodescarboxilase, também denominada hidroxifenilalanina descarboxilase, é convertida em dopamina. A dopamina recém sintetizada é translocada para o interior de vesículas secretoras, onde permanece armazenada para estoque, secreção e proteção contra a inativação enzimática (BEM-JONATHAN; HNASKO, 2001).

### 1.2.1 – Receptores da Dopamina

A ação biológica da dopamina (DA) é mediada através de receptores acoplados à proteína G, atualmente, conhece-se cinco subtipos diferentes de receptores da dopamina DR1-DR5, subdivididos em dois grupos, de acordo com sua estrutura e função, um grupo chamado *D1-like*, que compreendem os receptores DR1 e DR5, encontram-se ligados a proteína G estimulatória (Gs), e são capazes de aumentar os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular quando estimulados. O grupo chamado *D2-like* incluem os receptores DR2, DR3 e DR4, geralmente associados a funções inibitórias da proteína G (Gi), impedindo a elevação dos níveis de AMPc (MISSACLE et al., 1998; PIVONELLO et al., 2007).

Os cinco subtipos de receptores são codificados por genes localizados em diferentes *loci* cromossômicos e demonstram considerável homologia entre suas estruturas e funções. Todos os subtipos de receptores são compostos de sete domínios transmembrana, formando três alças intracelulares e três alças extracelulares, além dos domínios NH<sub>2</sub>-terminal e COOH-terminal (PIVONELLO et al., 2007).

A região NH<sub>2</sub>-terminal possui um número similar de resíduos de aminoácidos para todos os subtipos e carregam um número variável de sítios de N-glicosilação, que também podem aparecer nas alças extracelulares. A região carboxi-terminal é aproximadamente sete vezes mais longa para o grupo de receptores *D1-like*, quando comparado ao *D2-like*, e rica em resíduos de serina e treonina, contendo ainda, resíduos de cisteína provavelmente envolvidos na ancoragem da cauda citoplasmática à membrana. Os potenciais sítios de fosforilação estão localizados também na região das alças intracelulares, principalmente na terceira alça intracelular que representa o domínio que funcionalmente é o mais importante, onde ocorre a interação com as

proteínas G e outras moléculas efetoras que regulam os efeitos fisiológicos e neuroquímicos dos receptores da dopamina (PIVONELLO et al., 2007).

Os receptores *D1-like* tem uma curta terceira alça intracelular típica para interação dos receptores com a proteína Gs, que estimula a produção do AMPc. E os receptores *D2-like* tem uma longa terceira alça intracelular, típica para interação dos receptores com a proteína Gi, que inibi a produção de AMPc (MISSALE et al., 1998; PIVONELLO et al., 2007).

O receptor DR2 apresenta duas principais variantes, uma isoforma longa, chamada DR2 *long* (DR2L) e uma isoforma curta, chamada DR2 *short* (DR2S), geradas por *splicing* alternativo de 87 pares de bases, com a inserção de 29 aminoácidos na terceira alça intracelular em sua estrutura protéica. As duas isoformas de DR2 possuem atividades farmacológicas semelhantes, porém diferentes características funcionais na ativação de diferentes vias de sinalização (PIVONELLO et al., 2007).

### 1.2.2 Agonistas dopaminérgicos

Os agonistas dopaminérgicos representam a primeira geração de drogas efetivas utilizadas no tratamento de tumores hipofisários. A introdução desta classe de compostos foi devido à atividade da dopamina na inibição da secreção hormonal na hipófise e no sistema hipotálamo – hipófise, em particular prolactina e hormônios derivados do pró-opimelanocortina (FERONE et al., 2007).

O perfil farmacológico dos receptores da dopamina demonstra diferenças entre os receptores D1 e D2 *like*, principalmente na afinidade de ligação por certos agonistas e antagonistas. A dopamina liga-se a todos os cinco tipos de receptores com afinidades

diferentes, além da dopamina, agonistas e antagonistas se ligam preferencialmente ou exclusivamente aos receptores D1 e D2 *like* (PIVONENELLO et al., 2007).

Entre os agonistas dopaminérgicos estão a bromocriptina e a cabergolina ambos com capacidade de ligar-se aos receptores D1 e D2 *like*, com alta afinidade, possuindo a cabergolina uma grande seletividade para os receptores do subtipo DR2. Entretanto, a cabergolina tem demonstrado possuir maior afinidade que a bromocriptina, não somente para as isoformas DR2, como também para os receptores DR3 e DR4 (PIVONENELLO et al., 2007; FERONE, 2008; SAVEANU et al., 2008).

A bromocriptina foi a primeira droga utilizada no tratamento de pacientes acromegálicos, porém os resultados na normalização dos níveis de IGF-1 foram desanimadores, onde somente foi observada normalização em aproximadamente 10% dos pacientes apesar da utilização em elevadas doses da medicação (JAFFE, BARKEN, 1992).

A cabergolina tem demonstrado normalizar os níveis de IGF-1 em aproximadamente 39% dos pacientes acromegálicos sendo utilizada como monoterapia. A eficácia da terapia é mais elevada quando aplicada a pacientes com hiperprolactinemia e quando os níveis de IGF-1 e GH são somente leves ou moderadamente elevados (ABS et al., 1998).

A secreção da prolactina pode ser inibida principalmente pela ligação dos agonistas principalmente ao receptor DR2, ainda permanecendo o questionamento a cerca da função dos receptores em outros tipos histopatológicos de adenomas hipofisários (FERONE et al., 2007).

### 1.2.3 – Mecanismo de Ação

Os receptores de dopamina podem controlar o efeito da dopamina e dos componentes dopaminérgicos por diferentes mecanismos de transdução. Dentre esses, o mais importante é a modulação da atividade da adenilil ciclase por estimulação ou inibição dos níveis de AMPc que resulta na modulação da proteína quinase A que é responsável através da fosforilação ou desfosforilação, pela regulação da síntese de proteínas citoplasmáticas e nucleares, funções nos canais membranares, sensibilização e desensibilização de diferentes receptores acoplados a proteína G (VALLONE; BORRELLI, 2000).

Os receptores da dopamina também são capazes de ativar outros mecanismos de sinalização transducional, incluindo a modulação da fosfolipase C ou a liberação de ácido araquidônico, bem como a atividade de canais de cálcio e potássio. Sendo importante ressaltar que os receptores da dopamina são capazes de controlar o crescimento e diferenciação celular com diferentes mecanismos (MISSALE et al., 1998; PIVONELLO et al., 2007). Estes receptores são amplamente distribuídos no sistema nervoso central, em particular nos neurônios dopaminérgicos, substância negra, área tegmental e hipotálamo, além de serem expressos na hipófise, onde regulam a síntese e secreção dos hormônios adeno-hipofisários (MISSALE et al., 1998).

A presença destes receptores também foi demonstrada em tumores hipofisários, sendo o subtipo DR2 o mais frequentemente expresso. Estudos recentes, em corticotropinomas, têm demonstrado que a ativação do DR2 pelos agentes dopaminérgicos é capaz de inibir a secreção do hormônio adenocorticotrópico (ACTH), sugerindo como papel fisiológico da dopamina a regulação da liberação de ACTH. No entanto, foi observado que o tratamento apenas com o agonista *cabergolina* foi capaz de

induzir a remissão do tumor secretor de ACTH em um terço dos casos da doença de Cushing (FERONE et al., 2007; HERDER et al., 2007).

Tem sido demonstrado que tanto a isoforma DR2S como a DR2L tem envolvimento direto com as subunidades  $G\beta\gamma$  e proteína quinase C, geralmente envolvidas na regulação do crescimento celular, diferenciação e apoptose. Em particular nos tumores hipofisários, os agonistas dopaminérgicos demonstram claros efeitos anti-proliferativos, induzindo morte celular por apoptose (PIVONELLO et al., 2007).

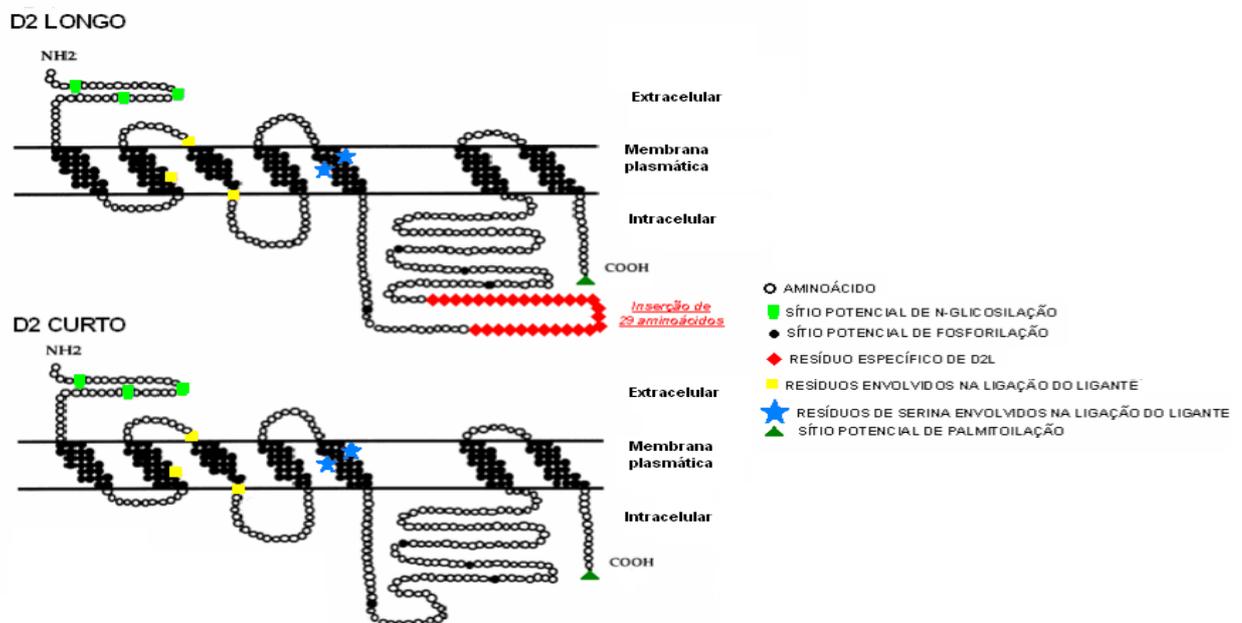


Figura 2 – Esquema estrutural do receptor DR2. DR2 longo com inserção de sequência com 29 aminoácidos no terceiro loop citoplasmático e DRS. Potenciais sítios de glicosilação, fosforilação e ligação em ambas as isoformas. (Vallone et al., 2000).

Os receptores da dopamina estão sujeitos a uma variedade de mecanismos regulatórios que podem modular positiva ou negativamente a sua expressão, bem como a atividade funcional, no entanto, os mecanismos envolvidos nesta regulação ainda não estão completamente elucidados. Assim como os SST's, os DRs sofrem um processo de dessensibilização quando expostos continuamente a agonistas, o que é um processo comum a todos os receptores ligados à proteína G. Neste processo, pode ocorrer

desacoplamento do receptor da proteína G ou internalização do receptor em um compartimento endossomal, onde ele pode ser desfosforilado e reciclado para a superfície celular ou degradado (PIVONELLO et al., 2007).

### **1.3 – Somatotropinomas.**

Os somatotropinomas são gerados a partir de uma célula somatotrópica mutante, secretora do hormônio do crescimento (GH) também conhecido como somatotropina. Estes adenomas podem levar a uma produção excessiva do hormônio GH, que ocorrendo antes da puberdade e do fechamento das epífises, levará o indivíduo a um crescimento longitudinal anormal, denominado gigantismo (HOLDAWA; RAJASOORYA, 1999; MELMED et al., 2002).

O excesso hormonal do GH na fase adulta, não leva a um crescimento ósseo, mas sim a um crescimento contínuo de regiões cartilaginosas e membranares, com característico alargamento das mãos e dos pés, chamado acromegalia, que é uma doença debilitante e desfigurante que se não controlada adequadamente, leva a complicações cardiovasculares, metabólicas, respiratórias e neoplásicas (HOLDAWA; RAJASOORYA, 1999; MELMED et al., 2002).

A acromegalia é uma doença causada predominantemente por um adenoma hipofisário hiper-secretor de GH. Esta hipersecreção ocasiona um aumento nas concentrações dos hormônios circulantes GH e do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I, insulin-growth factor I) que está associado a um aumento na mortalidade causada por doenças cardiovasculares, respiratórias, hipertensão e diabetes (PORTERFIELD; WHITE, 2007; TAKEI et al., 2007). Como tratamento são indicados

a remoção cirúrgica do tumor e o tratamento medicamentoso como terapia complementar com objetivo de obter a redução e normalização dos níveis de GH e IGF-I, diminuindo assim o risco de complicações como o desenvolvimento de neoplasias, disfunções metabólicas dentre outras (DALM et al., 2007).

A intervenção cirúrgica tem sido ao longo dos anos a primeira opção de tratamento para indivíduos acromegálicos, contudo, a remissão pós-cirúrgica é relativamente baixa quando realizada em pacientes com macroadenomas e em tumores invasivos. Melmed et al. (2002) relataram uma maior proporção de cura em indivíduos que apresentavam microadenomas compreendendo de 70 a 80% dos pacientes, quando comparado com os paciente que apresentavam macroadenomas, especialmente aqueles com comportamento invasivo, onde o processo cirúrgico alcançou cura em menos de 50% dos indivíduos.

Os somatotropinomas expressam múltiplos subtipos de receptores da somatostatina, onde os subtipos SST2 e SST5 são os predominante, tanto a nível de mRNA quanto a nível protéico. O SST2 parece ser o receptor predominante na determinação do efeito inibitório do octreotide e lanreotide na liberação do GH circulante em pacientes acromegálicos, demonstrando uma correlação positiva com o nível de expressão e a redução dos níveis de GH (REUBI et al., 2001; HOEK et al., 2007; TABOADA et al. 2007).

A introdução dos sintéticos octapeptídeos análogos da somatostatina como tratamento medicamentoso promoveu uma nova dimensão ao tratamento da acromegalia, para indivíduos que não obtiveram normalização dos níveis de GH e IGF-I com o procedimento cirúrgico. Análogos como o octreotide e lanreotide são as drogas mais amplamente utilizadas e demonstraram significante melhora nos sinais e sintomas clínicos, sendo amplamente aceitos como primeira opção de tratamento medicamentoso

para pacientes acromegálicos, em muitos casos, reduzindo a hipersecreção de GH e normalizando os níveis de IGF-I em uma significativa porção dos pacientes tratados (HOEK et al., 2007). A expressão predominante do receptor SST2 em tumores humanos forma a base para o sucesso da aplicação clínica dos octapeptídeos como o octreotida e o lanreotida no controle dos sintomas relacionados à hipersecreção em pacientes com adenomas hipofisários secretores de GH, tumores de células de ilhota, ou tumores carcinóides (HOFLAND, 2003).

Takei et al. (2007) estudaram 22 indivíduos acromegálicos e analisou a expressão protéica dos receptores da somatostatina, subtipos SST2A e SST5, através da técnica de imunohistoquímica, encontraram elevada imunomarcagem em 100% e 95,4%, respectivamente nas células tumorais. O SST2A foi localizado principalmente na membrana celular, enquanto o SST5 foi detectado principalmente no citoplasma, possivelmente como resultado da internalização celular, o que sugere uma baixa atividade do SST citoplasmático.

Em culturas primárias de adenomas hipofisário humanos secretores de GH, novos análogos com maior afinidade de ligação ao SST2 inibem a secreção de GH mais potencialmente quando comparados com os octapeptídeos análogos da somatostatina clinicamente utilizados, octreotida e lanreotida (SHIMON et al., 1997). Em adição, alguns adenomas demonstram melhor resposta a análogos específicos ao SST2, enquanto outros respondem melhor a análogos específicos ao SST5, sendo mais potentes na supressão da liberação de GH. Saveanu et al., (2001) estudando um grupo de adenomas hipofisários humanos resistentes ao octreotida, sugeriram que em tumores que possuem baixa expressão de mRNA de SST2, quando comparados a expressão de SST5, o SST5 seria de maior importância na regulação da liberação de GH.

A inibição da secreção do hormônio GH é potencializada quando há ativação de ambos os subtipos de receptores SST2 e SST5, provavelmente mediada via uma associação funcional de ambos os subtipos. O achado desta associação funcional levou ao desenvolvimento de análogos com seletividade a múltiplos subtipos de SST's (HOEK et al. 2007).

Um destes análogos é o SOM230 que possui um perfil de ligação universal aos receptores da somatostatina, ligando-se com maior afinidade aos subtipos SST1, SST3 e SST5, e com menor afinidade ao subtipo SST2, quando comparado ao análogo octreotide. Esta capacidade de maior inibição da secreção em indivíduos com adenomas secretores de GH com baixos níveis do SST2 e maiores níveis de expressão do SST5 sugere um importante papel do SST5 em mediar a inibição da secreção de GH em indivíduos com respostas parciais ao octreotide (HOEK et al., 2007).

A resposta a cabergolina está relacionada principalmente à expressão do receptor subtipo DR2. A cabergolina parece ser mais efetiva que os demais agonistas no tratamento da acromegalia por promover normalização dos níveis hormonais e também pela significativa indução na redução tumoral (COZZI et al., 1998; FERONE et al., 2007).

Estudos utilizando ação combinada dos análogos da somatostatina e dos agonistas dopaminérgicos demonstraram um efeito aditivo na inibição dos níveis de GH e normalização de IGF-I em pacientes com acromegalia, utilizando as drogas octreotide e cabergolina (COLAO et al., 2007)

#### **1.4 – Corticotropinomas.**

Os corticotropinomas são derivados de células hipofisárias corticotrópicas produtoras do hormônio adenocorticotrópico (ACTH), que é um aminoácido sintetizado como parte de um grande pró-hormônio, pró-opiomelanocortina (POMC). A hipersecreção do ACTH causa uma produção aumentada de cortisol pelas glândulas adrenocorticais, que pode levar a hipertensão, diabetes *mellitus*, osteoporose, e distúrbios psiquiátricos, entre outras condições características da doença de Cushing, que é uma severa desordem endócrina causada pela produção de ACTH por um adenoma hipofisário (VALLONE et al., 2000; PIVEONELLO et al., 2004).

A adenohipofisectomia transesfenoidal seletiva é o tratamento de escolha mais frequentemente utilizado, contudo a cura neste primeiro tratamento, não excede os 70% (DALM et al., 2007; DE BRUIN et al., 2009). Em caso de persistência ou recorrência da doença, uma nova cirurgia apresenta uma possibilidade de cura menor do que o da primeira intervenção; outras possibilidades terapêuticas são a radioterapia e adrenalectomia. Contudo, todas estas opções de tratamento possuem desvantagens significativas a serem consideradas, incluindo o risco de hipopituitarismo permanente e a dependência de tratamentos para reposição hormonal (DE BRUIN et al., 2009).

Estudos evidenciaram a expressão de múltiplos receptores da somatostatina e da dopamina em células de adenomas secretores de ACTH e vêm investigando a ação dos análogos da somatostatina e dos agonistas dopaminérgicos para o tratamento da doença de Cushing. Hofland et al. (2005) demonstraram a importância da expressão do SST5 na regulação da secreção de ACTH em células de adenomas corticotróficos, sugerindo-o como um possível potencial alvo terapêutico dos análogos da somatostatina seletivo ao SST5 para indivíduos com a doença de Cushing (DALM et al., 2007).

Batista et al. (2006) identificou a presença da expressão protéica dos cinco subtipos receptores da somatostatina em corticotropinomas, apresentando o subtipo SST5 como o receptor mais frequentemente expresso, presente em 83% das amostras. Analisando o mRNA através da técnica de RT-PCR encontraram a expressão do mRNA dos subtipos SST1, SST2, SST4 e SST5. Em cultura primária de seis corticotropinomas humanos, após o uso do análogo SOM230 foi observado uma significativa redução dos níveis de proliferação celular e redução na secreção de ACTH.

O análogo octreotide seletivo ao SST2 não possui efeito na secreção basal do hormônio liberador de corticotropina (corticotrophin releasing hormone – CRH) e na liberação de ACTH, em pacientes com a doença de Cushing. Acredita-se que essa perda de efeito seja devido à dessensibilização do receptor em estado hipercortisolêmico. Deste modo, os glicocorticóides teriam um efeito regulatório negativo na expressão dos receptores da somatostatina, principalmente o subtipo SST2 (HOFLAND, 2008).

Silva et al. (2005) em seu estudo utilizando ratos, realizou um estudo comparativo da inibição da indução do CRH e ACTH, pelos análogos SOM230 e o octreotide, e encontrou uma menor inibição da secreção por parte do análogo octreotide quando comparado ao ligante universal SOM230, o que sugere uma atividade diferencial dos subtipos dos SSTs no controle da liberação de ACTH.

O receptor da dopamina subtipo DR2 foi encontrado expresso em aproximadamente 80% dos adenomas corticotrópicos. A utilização do agonista seletivo de DR2, cabergolina, levou a normalização dos níveis de cortisol urinário livre em 40% dos indivíduos com a doença de Cushing (PIVONELLO et al., 2004), demonstrando ser um potencial alvo terapêutico no tratamento dos indivíduos que não obtiveram cura na intervenção cirúrgica.

De Bruin et al. (2009) estudando o tecido de 30 indivíduos com a doença de Cushing, encontrou uma alta expressão dos receptores SST5 e DR2 na maioria dos corticotropinomas, com uma co-expressão comum entre estes receptores. Desta forma, a terapia medicamentosa com a utilização de agonistas dopaminérgicos com afinidade seletiva ao subtipo DR2 e/ou a utilização dos análogos da somatostatina com afinidade ao subtipo SST5, podem ser outra estratégia terapêuticas em casos de persistência ou recorrência dos tumores corticotrópicos que levam a doença de Cushing.

Novos componentes híbridos, que contém elementos estruturais tanto para somatostatina quanto para dopamina e possui atividade seletiva para ambos os receptores, demonstram um maior potencial terapêutico na inibição da secreção hormonal e controle da proliferação celular em diferentes modelos celulares *in vitro*, quando comparado com os análogos clássicos da somatostatina (FERONE et al., 2007).

### **1.5 – Adenomas hipofisários clinicamente não-funcionantes**

Os adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes (ACNF) representam um grupo de tumores muito heterogêneo que não causam síndromes de hipersecreção hormonal, correspondendo por 25 a 40% de todos os adenomas de hipófise, com uma prevalência estimada em 7-22 casos por 100000 habitantes (COLAO et al., 2007; FERNANDEZ et al., 2010). Geralmente os pacientes com este tipo de adenoma apresentam níveis hormonais normais no sangue, contudo, a análise histopatológica por imunohistoquímica de ACNF pode demonstrar imunopositividade para os hormônios hipofisários, porém são incapazes de secretá-los ou fazem-no em suas formas inativas (PAWLIKOWSKI et al., 2003; FERONE et al., 2007).

A maioria dos indivíduos com este tipo de adenoma é diagnosticada tardiamente ao longo do curso da doença, quando o tumor já atinge um grande tamanho, chamado de macroadenoma. Os sinais e sintomas de ACNF variam desde a compressão das vias ópticas, apoplexia hipofisária (isquemia ou hemorragia) que representa uma expansão aguda do volume tumoral que se manifesta por cefaléias de forte intensidade, sintomas neuro-oftalmológicos até alterações nos níveis de consciência; podendo se apresentar como um incidentaloma. Os ACNF podem ser classificados em gonadotropinomas que expressam os hormônios gonadotróficos, tumores silenciosos, que expressam algum hormônio hipofisário, *null cell* que não expressam nenhum hormônio (DEKKERS et al., 2007).

A intervenção cirúrgica para a retirada da massa tumoral é a primeira opção de tratamento, porém não leva à cura a maioria dos pacientes e apresenta altas porcentagens de recorrência devido a não excisão completa do tumor ou recidiva tumoral. A radioterapia é a única modalidade que demonstra ser efetiva na prevenção do crescimento residual tumoral, entretanto, não é indicada em vários casos (FERONE et al., 2007).

Os ACNF apresentam a expressão de múltiplos receptores tanto da somatostatina (SST1-5) como da dopamina, principalmente DR2 (PIVONELLO et al., 2004; VIEIRA et al., 2009). Pawlikowski et al. (2003) estudaram a expressão protéica dos receptores da somatostatina em 18 adenomas hipofisários não funcionantes através de técnicas de imunohistoquímica e encontraram a expressão de todos os subtipos de receptores da somatostatina, apresentando-se como mais frequente os subtipos SST1 e SST5, sugerindo uma possibilidade de tratamento para esses pacientes com a utilização de análogos da somatostatina seletivos para esses receptores.

Sugeriu-se que a expressão da isoforma DR2 curta em relação à isoforma DR2 longa possa estar associada com uma resposta mais favorável ao tratamento quando utilizado a cabergolina (PIVONELLO et al., 2004). A utilização da terapia com uso dos agonistas dopaminérgicos tem sido associada a uma diminuição na prevalência do aumento residual tumoral ou estabilidade do volume tumoral em pacientes com adenomas não funcionantes, particularmente quando o tratamento é iniciado antes de indícios do crescimento tumoral. Sugerindo que o uso de drogas dopaminérgicas como rotina podem prevenir a expansão da massa tumoral em paciente com adenomas não funcionantes que não obtiveram cura por intervenção cirúrgica (GREENMAN et al., 2005)

Não há até o momento, um tratamento farmacológico bem estabelecido para os adenomas clinicamente não funcionantes. Contudo o tratamento usual utiliza os agonistas dopaminérgicos e análogos da somatostatina para esse tipo tumoral, por conta de evidências em estudos *in vitro* e *in vivo* da expressão de receptores da somatostatina e da dopamina. A detecção dos receptores da somatostatina em ACNF, principalmente os subtipos SST2 e SST5, suscitou a possibilidade de utilização dos análogos da somatostatina no tratamento desse tipo tumoral, entretanto, os efeitos benéficos dessa terapia têm se mostrado variável e pouco frequente, além de se correlacionarem à expressão dos receptores da somatostatina (PAWLIKOWSKI et al., 2003).

Resultados conflitantes igualmente têm sido relatados quanto ao efeito da terapia medicamentosa com os agonistas dopaminérgicos na redução do crescimento tumoral, onde alguns estudos descrevem uma redução tumoral de até 20% em alguns pacientes e outros descrevem uma ação ineficaz da droga (BEVAN et al., 1992; DE BRUIN et al., 1992; FERONE et al., 2007).

Andersen et al. (2001) avaliaram a ação combinada do análogo octreotida e do agonista cabergolina no tratamento de dez macroadenomas de ACNF, analisando a redução tumoral após seis meses de tratamento (OCT 200µg 3x/dia; CAB 0,5mg/dia) e observou uma redução tumoral de 30% apenas nos pacientes que possuíam capacidade secretora, entretanto em quatro indivíduos o tratamento não surtiu efeito.

Há evidências que o receptor DR2 humano forma heterodímeros com os subtipos SST2 e SST5. A composição destes “receptores complexos” pode alterar a resposta tanto para os análogos da somatostatina como para os agonistas dopaminérgicos em sistemas celulares heterogêneos (ROCHEVILLE et al., 2000; VIEIRA et al., 2009).

Os estudos quantitativos da expressão dos receptores da dopamina e dos receptores da somatostatina nos adenomas hipofisários vêm ganhando grande destaque na literatura nos últimos anos. Com o objetivo de alcançar-se um emprego racional dos fármacos que atuam via estes receptores, permitindo uma racionalização e assim uma otimização do tratamento clínico dos pacientes que apresentam adenomas hipofisários e não obtiveram cura na intervenção cirúrgica.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivo geral.**

Avaliar a frequência e distribuição dos subtipos de receptores da Somatostatina (SST1-5) e da Dopamina (DR2) em adenomas hipofisários.

### **2.2 – Objetivos específicos.**

- Avaliar a expressão e a distribuição dos receptores de dopamina e da somatostatina em adenomas hipofisários secretores de GH;
- Avaliar a expressão e a distribuição dos receptores da dopamina e da somatostatina em adenomas hipofisários secretores de ACTH;
- Avaliar a expressão e a distribuição dos receptores de dopamina e da somatostatina em adenomas hipofisários não funcionantes;
- Avaliar a expressão e a distribuição dos receptores da dopamina e da somatostatina em adenomas hipofisários secretores de prolactina;
- Comparar à expressão do mRNA e protéica dos receptores da dopamina e da somatostatina em adenomas hipofisários.

### **3 – PACIENTES E MÉTODOS**

#### **3.1 – Local do estudo**

O estudo foi realizado no Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade (LEGH), no Centro de Pesquisa Clínica (CEPEC) do Hospital Universitário da UFMA (HUUFMA) e no Laboratório de Patologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### **3.2 – Tipo de estudo.**

Estudo Transversal-Retrospectivo.

#### **3.3 – População estudada**

Pacientes acompanhados pelo serviço de endocrinologia do Hospital Universitário da UFMA que apresentavam adenomas hipofisário e estavam com cirurgia marcada para a remoção do tumor, devido à necessidade terapêutica do paciente, além de blocos de parafina de tumores hipofisários do serviço de Patologia do HUUFMA que foram arquivados no período de 2005 a 2010 com consentimento prévio da Direção da Unidade Hospitalar.

### **3.4 – Amostras**

Participaram do estudo 38 pacientes, destes, quinze foram acompanhados durante a intervenção cirúrgica e foi possível a coleta de material fresco para estudos de Biologia Molecular e em 34 foram realizados testes imunohistoquímico para a avaliação proteica dos receptores.

### **3.5 – Aspectos éticos**

Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, apêndice 1). O Projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do HUUFMA parecer nº 162/10 e COMIC (anexo 1).

### **3.6 – Testes realizados**

Foram estudados adenomas hipofisários, divididos em quatro grupos: adenomas secretores de GH – somatotropinomas, adenomas secretores de ACTH – corticotropinomas, adenomas clinicamente não-funcionantes - ACNF, e adenomas secretores de prolactina – prolactinomas.

O diagnóstico dos somatotropinomas, corticotropinomas, dos adenomas não funcionantes e dos prolactinomas, foi realizado de acordo com a rotina do ambulatório do serviço de endocrinologia do HUUFMA, baseado em dados clínicos dos pacientes e análise de exames laboratoriais e/ou histopatológicos devido à possível presença de

hipersecreção hormonal. A presença de todos os adenomas foi confirmada através de exames de imagem obtidos por ressonância magnética nuclear.

### 3.6.1 – Imunohistoquímica

As imunomarcações foram realizadas no Laboratório de Patologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro chefiado pela Profa. Dra. Christina Maeda Takiya, no Centro de Pesquisa Clínica - CEPEC do HUUFMA e no Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade do LEGH/HUUFMA.

Uma amostra do tecido hipofisário tumoral para estudos imunohistoquímicos foi fixada em uma solução de Formol 10% / Zinco monohidratado durante 48 horas. Após este período a solução com formol foi descartada e a amostra tratada em soluções de etanol em concentrações crescentes (70, 80, 90% e 100%) durante 5 minutos cada, logo após, foi transferida para solução de xilol em concentrações crescentes (80,90 e 100%) durante 10 minutos cada, a amostra foi embebida em parafina I e II durante trinta minutos cada e finalmente preenchida com parafina líquida à 60°C.

Foram feitos cortes de 4µm das peças tumorais contidos nos blocos de parafina, que foram colocados em lâminas recobertas por organossilano ou POLYLISINA (*Dako Silanized Slides*), os cortes foram mantidos *overnight* em estufa a 60°C. Após esse período foram tratadas em quatro soluções de concentrações decrescentes de xilol (100, 90, 80 e 70%) por 15 minutos/cada, para desparafinização; seguidos de hidratação em quatro soluções de concentrações decrescentes de etanol (100, 90, 80 e 70%) por cinco minutos cada. O bloqueio dos resíduos aldeídicos livres foi realizado

em solução de Tetraborato de Sódio a 5% por 30 minutos. Para recuperação antigênica foi utilizado tampão ácido cítrico 0,01M (pH – 6,0), durante cinco minutos em microondas em potência máxima, após esse período, as lâminas foram deixada em repouso até atingirem a temperatura ambiente. Para bloqueio da peroxidase endógena foi utilizada uma solução de peróxido de hidrogênio 3% em metanol durante 30 minutos. O bloqueio das ligações inespecíficas às imunoglobulinas foi realizada em uma solução de PBS-BSA 3%, Gelatina 0,01%, Triton 0,1%, Tween 0,05%, durante 60 minutos.

Em seguida, os cortes foram incubados com seus respectivos anticorpos primários, *overnight* em geladeira a 4°C. Os anticorpos policlonais contra SST foram comercialmente adquiridos do laboratório *Chemicon* (Tabela 2). Após esse período, as secções foram lavadas com PBS e incubadas por uma hora com o anticorpo secundário *Kit Dako®EnVision™+ Dual link System HR* (Dako K4061, Carpinteria, CA, USA), seguidos de incubação com o revelador, diaminobenzidina *Kit Dako®Liquid DAB+ Substrate Chromogen System*, (Dako K3468, Carpinteria, CA, USA), por 10 minutos. Os cortes foram contrastados com a hematoxilina de Harris (diluição de 1:3) por 5 minutos. Foram utilizados lâminas com cortes de tecido pancreático para controles positivos e para controle negativo foi realizada a omissão dos anticorpos primários.

A imunoreatividade das células foi calculada semiquantitativamente de acordo com o percentual de células imunomarcadas, metodologia adaptada e empregada por Takei et al. (2007). Com uma divisão em quatro grupos de escores: 0 negativo ou ausente; 1+ presente em menos que 25%, fracamente distribuídos; 2+ presente entre 25-50%, moderadamente distribuídos; 3+ presente em mais que 50%, fortemente distribuídos, de todas as células tumorais.

A histomorfometria foi realizada utilizando um sistema de análise de imagens (Image Pro Plus 4.5.1 – Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) e um microscópio óptico (Eclipse 400, NIKON, Japan). Foram capturados 10 campos aleatórios de cada região tumoral por lâmina em um aumento de 40x. Os campos foram contados utilizando-se o programa Image-Pro Plus Demo 4.0, onde todas as células foram contadas, as que apresentavam imunomarcação foram classificadas como positivas, calculando-se assim o percentual médio de células imunomarcadas por campo e por lâmina de cada paciente.

**Tabela 2** – Anticorpos policlonais anti-receptores de somatostatina (SST1-SST5).

Anticorpo Policlonal	Diluição	Número catálogo ( <i>Chemicon</i> )
SST1	1:100	AB9283
SST2	1:200	AB9486
SST3	1:200	AB9285
SST4	1:80	AB9487
SST5	1:150	AB9287

### 3.6.2 - Biologia molecular

A amostra tecidual para os estudo de Biologia Molecular, foi processada utilizando-se o reagente de estabilização de RNA (*RNAlater<sup>TM</sup>*), durante 24 horas à 4°C. Após esse período o *RNAlater* foi desprezado conforme protocolo do fabricante e o

tumor congelado em *freezer* -80°C, até a extração do RNA. A extração do RNA foi realizada a partir de aproximadamente 20mg do tecido, utilizando nitrogênio líquido para a maceração do tecido, seguido da extração do RNA total, através do kit *Rneasy MiniKit* comercializado pela *Qiagen, Valencia, CA*, sendo seguido indicações presentes no protocolo do fabricante (anexo 2). O RNA foi então tratado com o kit DNase I (*Biolabs, New England*) e incubado a 37°C, para eliminar possível contaminação com DNA genômico, de acordo com protocolo do fabricante (anexo 3). Ao final deste processo, foi gerado um volume de 20uL de solução (RNA total + água RNase-free). Após a extração foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado em um sistema de fotodocumentação (*Vilber Lourmat, France*), para verificação da integridade do RNA extraído.

O RNA foi quantificado através de métodos espectrofotométricos (*UV 1101 Biotech Photometer, U.K.*). Para a transcrição reversa e formação do cDNA foi utilizado aproximadamente um micrograma de RNA total, utilizando-se o kit *High Capacity RNA-to-cDNA kit*, (*Applied Biosystems, USA*), em uma reação de volume final de 30μL, seguindo o protocolo do fabricante (anexo 4).

Os *primers* utilizados para os receptores da somatostatina foram previamente descritos na literatura por Taboada et al. (2007) e os da dopamina por Vieira-Neto et al. (2009) (Tabela 3). Uma PCR convencional foi realizada para verificar a eficiência da reação da transcrição reversa e a especificidade de cada primer, com as seguintes concentrações tampão 1X, dNTP's 0.8mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Go Taq Flexi DNA Polimerase 2,5U (*Promega*), primer 10pmol (*Invitrogen, Brasil LTDA*). A termociclagem foi realizada no *GenAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems, USA*) e consistiu para os receptores da somatostatina de um ciclo de 95° por 10min, 35 ciclos de 95° por 30seg, anelamento 61° por 1min, 72° por 1min. Para o receptor da dopamina

os ciclos constituíram-se de 95° por 10min, 40 ciclos de 95°por 30seg, anelamento 61° por 1min, 72° por 1min. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5%, durante 60minutos, corados com brometo de etídeo e visualizados em um sistema de fotodocumentação (*Vilber Lourmat, France*).

O método de quantificação absoluta, por PCR em tempo real, foi desenvolvida para cada gene alvo e para o gene  $\beta$ -actina, que foi utilizado como controle endógeno. Para a construção da curva-padrão, uma alíquota do produto de PCR de cada gene foi purificado usando o kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Alemanha). Em seguida, o produto foi quantificado através de métodos espectrofotométricos (*UV 1101 Biotech Photometer, U.K.*), a partir do produto purificado foi preparada diluições seriadas de  $10^8$  a  $10^1$  cópias/ $\mu$ L. Para uma reação com confiabilidade, a curva de eficiência pode variar entre 90 e 110%, onde uma eficiência de 100% indica que todas as cópias em cada ciclo foram amplificadas.

Um microlitro de cDNA foi amplificado por PCR em tempo real em 15 $\mu$ L de reação, utilizando o kit *Power SYBR Green 2X PCR MASTER MIX* (Applied Biosystems, USA). A amplificação foi realizada no *7500 Real Time PCR System*, e consistia de ciclos de 50° por 2min, 95° 10 min, seguidos de 40 ciclos de desnaturação 95° por 30 seg e anelamento 61° 1min. Ao final da amplificação, uma curva de dissociação foi usada para confirmar a especificidade da reação. O valor da expressão do mRNA em cada amostra foi determinado pela razão entre a expressão do gene alvo pela expressão da  $\beta$ -actina e multiplicados por 100 para facilitar a tabulação dos dados (gene alvo/ $\beta$ -actina x 100), como descrito por Muscarella et al. (2011).

### 3.7 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Bioestat 5.0 (2007). Inicialmente aplicou-se a estatística descritiva. Para comparação da expressão do mRNA e expressão protéica foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Em todos os testes o nível de significância aplicado foi de 5%, ou seja, considerou-se significativo quando  $p < 0,05$ . Os resultados foram apresentados como mediana.

**Tabela 3** – Sequência de *primers*, tamanho do produto e temperatura de anelamento dos receptores da somatostatina (SST1-5), dopamina (DR2) e controle endógeno ( $\beta$ -actin) para PCR em tempo real.

	Sequência 5'- 3'	PB*	Anelamento (°C)
sst1(F)	CAC ATT TCT CAT GGG CTT CCT	165	61
sst1(R)	ACA AAC ACC ATC ACC ACC ATC		
sst2(F)	GGC ATG TTT GAC TTT GTG GTG	185	61
sst2(R)	GTC TCA TTC AGC CGG GAT TT		
sst3(F)	TGC CTT CTT TGG GCT CTA CTT	190	61
sst3(R)	ATC CTC CTC CTC AGT CTT CTC C		
sst4(F)	CGT GGT CGT CTT TGT GCT CT	174	64
sst4(R)	AAG AAT CGG CGG AAG TTG T		
sst5(F)	CTG GTG TTT GCG GGA TGT T	183	61
sst5(R)	GAA GCT CTG GCG GAA GTT GT		
DR2(F)	CGAGCATCCTGAACTTGTGTG	172	61
DR2(R)	GCGTTATTGAGTCCGAAGAGG		
$\beta$ -actin(F)	ACT CTT CCA GCC TTC CTT CCT	176	61
$\beta$ -actin(R)	CAG TGA TCT CCT TCT GCA TCC T		

PB – pares de base

## **4- RESULTADOS**

### **4.1 – Caracterização da casuística**

Foram estudados trinta e oito pacientes diagnosticados com adenomas hipofisários, vinte e três mulheres (60,5%), com média de idade no momento da intervenção cirúrgica de quarenta e quatro anos (23-67anos) e quinze homens, com média de idade de quarenta anos (22-62 anos). Destes, doze eram adenomas secretores de GH – somatotropinomas, seis adenomas secretores de ACTH – corticotropinomas, dezoito adenomas não-secretores – adenomas clinicamente não funcionantes, e dois secretores de prolactinomas – prolactinomas.

### **4.2 – Perfil da expressão protéica dos receptores da somatostatina (SST1-5)**

A expressão protéica foi avaliada em trinta e quatro amostras de tecido tumoral, destas, doze eram de somatotropinomas, quatro corticotropinomas, dezesseis adenomas clinicamente não funcionantes e dois prolactinomas. Em todas as amostras foi confirmada a presença do tumor pela análise histopatológica com coloração de hematoxilina e eosina.

Foi observada imunomarcção predominantemente na membrana plasmática, e também citoplasmática de todos os subtipos de receptores da somatostatina nos tumores estudados. Sendo frequentemente visualizados como depósitos granulares finos de cor marrom acastanhada.(Figura 5,6,9,10).

#### 4.2.1 - Expressão protéica dos receptores da somatostatina em somatotropinomas.

Os resultados da expressão dos subtipos dos receptores da somatostatina nos somatotropinomas encontram-se descritos na tabela 4. Foi observada a prevalência na expressão dos subtipos SST2 e SST3 presentes em 100% dos tumores analisados, seguidos dos subtipos SST5 e SST4, presentes em aproximadamente 90% e do subtipo SST1 em aproximadamente 80% das amostras estudadas (Figura 3).

Classificando os escores utilizados 0, 1+, 2+, 3+, como distribuição ausente, fracamente distribuído, moderadamente distribuído e fortemente distribuído, respectivamente. Em cerca de 50% das amostras foi observada a presença de todos os cinco subtipos de SST's com graus variáveis de distribuição, em aproximadamente 40% foi observada a expressão de quatro diferentes subtipos de SST's e em cerca de 10% observou-se positividade de pelo menos três subtipos de receptores da somatostatina (Figura 4).

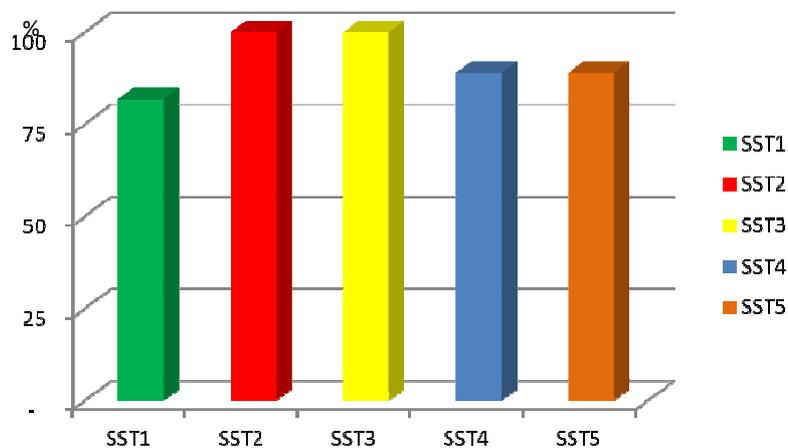


Figura 3 – Gráfico da incidência dos SST1-5 nos somatotropinomas.

**Tabela 4** – Perfil da imunexpressão protéica dos receptores da somatostatina (SST1-5) em somatotropinomas (n = 12).

N	SST1		SST2		SST3		SST4		SST5	
	Escore	(+) céls (%)								
AH02	2+	40	1+	20	2+	45	2+	40	1+	7,5
AH05	1+	25	2+	45	2+	35	2+	30	0	0
AH15	2+	40	2+	40	3+	75	2+	40	3+	60
AH21	1+	10	1+	5	2+	40	2+	30	0	0
AH23	3+	70	1+	20	3+	90	3+	60	2+	30
AH26	-	-	2+	30	-	-	-	-	1+	15
AH29	1+	10	3+	60	2+	10	1+	20	3+	70
AH30	1+	10	1+	5	3+	80	-	-	1+	5
AH32	0	0	1+	5	1+	25	1+	20	1+	20
AH35	0	0	2+	45	2+	40	1+	15	1+	15
AH36	1+	20	3+	60	3+	85	0	0	-	-
AH38	3+	70	3+	80	2+	30	1+	15	2+	45

N = identificação do paciente; SST1-5 = receptores da somatostatina. Escore 0 = imunomarcagem ausente, escore 1+ : < 25%, escore 2+ : 25-50%, escore 3+ : > 50%. Traço (-) reação sem resultado.

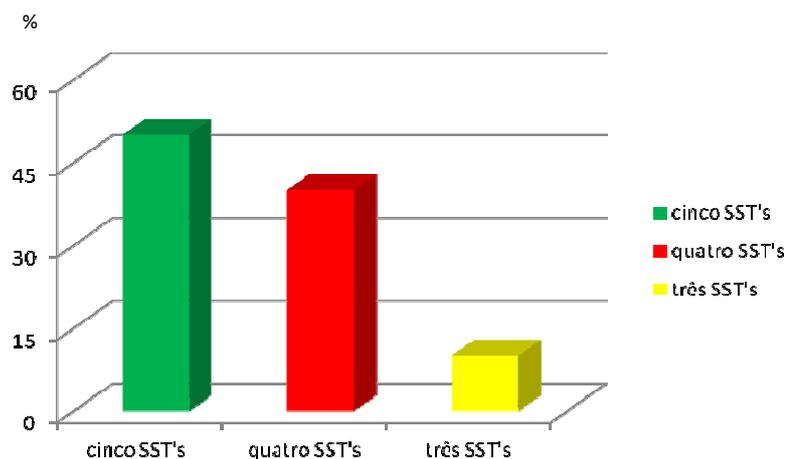


Figura 4 – Gráfico da presença dos diferentes subtipos de receptores da somatostatina em somatotropinoma.

**Figura 5 - Fotomicrografias de adenomas hipofisários de pacientes acromegálicos.**

Figura 5A - Fotomicrografia de somatotropinoma - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 0 para o receptor SST4 do paciente dez. Barra = 400 $\mu$ M.

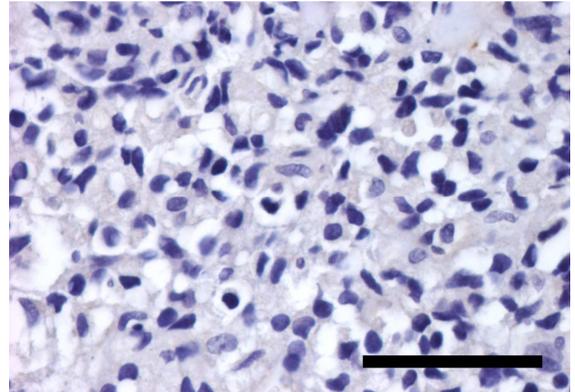


Figura 5B - Fotomicrografia de somatotropinoma - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 1+ para o receptor SST4 do paciente seis. Barra = 400 $\mu$ M.

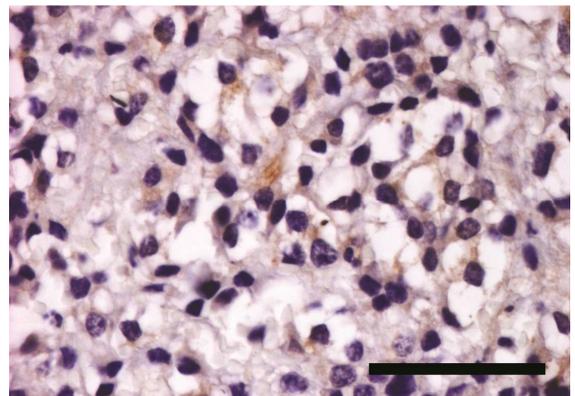


Figura 5C - Fotomicrografia de somatotropinoma - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 2+ para o receptor SST3 do paciente quatro. Barra = 400 $\mu$ M

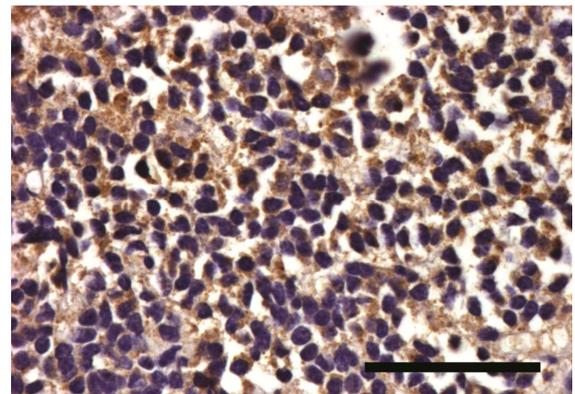
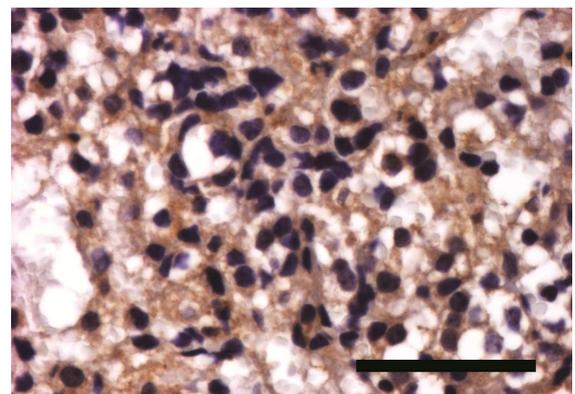


Figura 5D - Fotomicrografia de somatotropinoma - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 3+ para o receptor SST2 do paciente seis. Barra = 400 $\mu$ M



4.2.2 - Expressão protéica dos receptores da somatostatina em corticotropinomas.

Os resultados da distribuição dos subtipos dos receptores da somatostatina nos corticotropinomas encontram-se descritos na tabela 5. Foi encontrada a expressão protéica de todos os subtipos de receptores da somatostatina na amostra estudada.

**Tabela 5** – Perfil da imunexpressão protéica dos receptores da somatostatina (SST1-5) em corticotropinomas (n = 4).

N	SST1		SST2		SST3		SST4		SST5	
	escore	(+) céls (%)								
AH11	0	0	1+	10	3+	60	3+	60	1+	5
AH19	3+	80	3+	80	1+	10	3+	70	1+	10
AH22	2+	20	3+	70	1+	20	2+	30	0	0
AH27	3+	60	-	-	2+	45	2+	50	1+	10

N = identificação do paciente; SST1-5 = receptores da somatostatina. Escore 0 = imunomarcção ausente, escore 1+: < 25%, escore 2+ : 25-50%, escore 3+: > 50%. Traço (-) reação sem resultado.

**Figura 6 - Fotomicrografias de adenomas hipofisários de pacientes com a doença de Cushing.**

Figura 6A - Fotomicrografia de corticotropinoma - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 0 para o receptor SST5 do paciente um. Barra = 400 $\mu$ M.

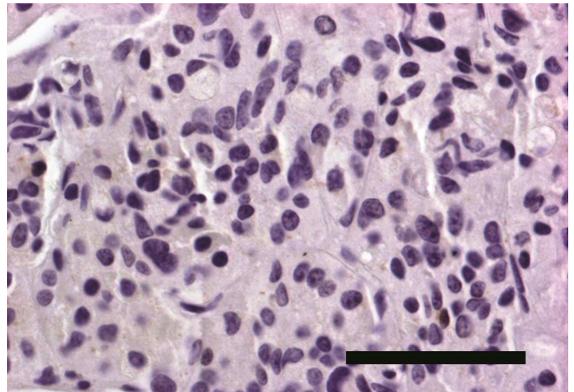


Figura 6B - Fotomicrografia de corticotropinoma - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 1+ para o receptor SST1 do paciente um. Barra = 400 $\mu$ M.

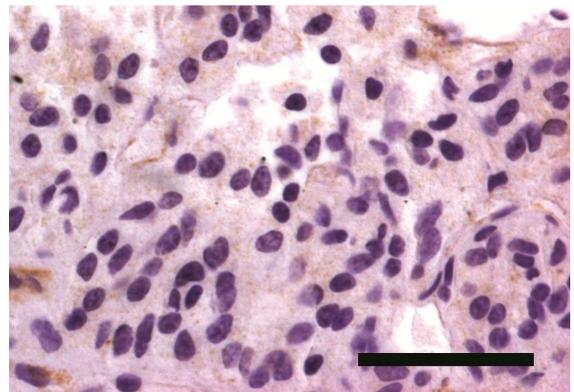


Figura 6C - Fotomicrografia de corticotropinoma - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 2+ para o receptor SST4 do paciente três. Barra = 400 $\mu$ M

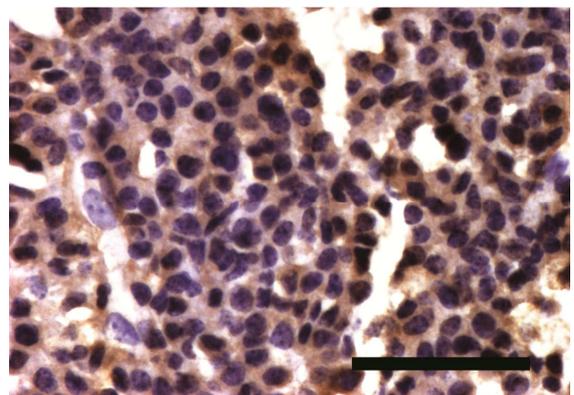
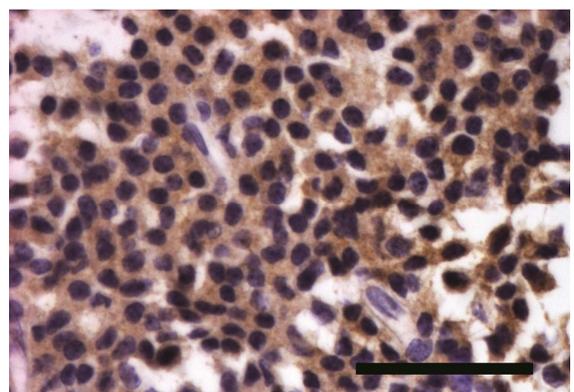


Figura 6D - Fotomicrografia de corticotropinoma - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 3+ para o receptor SST2 do paciente três. Barra = 400 $\mu$ M



O resultado da distribuição dos subtipos de receptores da somatostatina nos adenomas clinicamente não funcionantes encontram-se descritos na tabela 6. Foi encontrada distribuição mais freqüente do subtipo SST3 em aproximadamente 90% dos adenomas; seguidos dos subtipos SST2 e SST4 presentes em cerca de 80% das amostras; e dos subtipos SST1 e SST5 em 80 e 70% dos adenomas analisadas, respectivamente (Figura 7).

Os receptores subtipos SST1, SST2, SST3 e SST5 apresentaram-se mais frequentemente como moderadamente distribuídos em aproximadamente 40; 50; 50 e 45%, respectivamente. O subtipo SST4 apresentou-se mais frequentemente como fracamente distribuído em aproximadamente 35% dos tumores analisados. Cada amostra tumoral apresentou imunopositividade para pelo menos dois diferentes subtipos de receptores, aproximadamente 20% apresentaram positividade para todos os cinco subtipos de SST, 65% positividade para quatro subtipos, e 7% positividade para pelo menos três e dois subtipos de receptores da somatostatina (Figura 8).

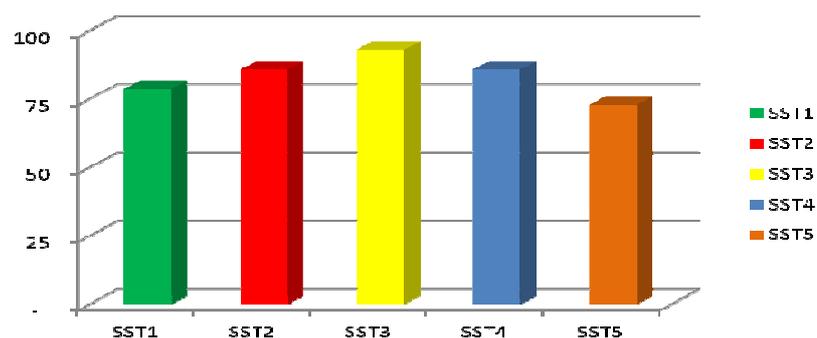


Figura 7 – Gráfico da incidência dos SST1-5 nos adenomas clinicamente não funcionantes.

**Tabela 6** - Perfil da imunoposição protéica dos receptores da somatostatina (SST1-5) em adenomas clinicamente não funcionantes (n = 16).

N	SST1		SST2		SST3		SST4		SST5	
	escore	(+) céls (%)								
AH01	2+	35	1+	25	3+	55	2+	40	2+	50
AH06	2+	30	3+	70	2+	30	1+	20	0	0
AH07	3+	80	1+	20	1+	20	3+	60	0	0
AH08	3+	85	2+	50	2+	40	1+	20	1+	5
AH09	2+	50	2+	50	2+	30	1+	20	2+	30
AH12	1+	5	3+	60	2+	50	2+	40	-	-
AH14	1+	15	2+	50	1+	20	0	0	3+	60
AH16	0	0	2+	45	1+	5	1+	20	3+	70
AH17	1+	20	2+	35	2+	35	2+	40	-	-
AH24	2+	30	2+	50	1+	5	3+	60	0	0
AH25	0	0	3+	60	2+	45	3+	80	2+	30
AH31	2+	30	2+	40	2+	30	0	0	2+	30
AH33	0	0	0	0	1+	25	1+	10	2+	30
AH34	2+	35	0	0	0	0	2+	30	-	-
AH37	-	-	1+	20	-	-	-	-	2+	40
AH39	-	-	1+	20	-	-	-	-	1+	20

N = identificação do paciente; SST1-5 = receptores da somatostatina. Escore 0 = imunomarcção ausente, escore 1+: < 25%, escore 2+ : 25-50%, escore 3+: > 50%. Traço (-) reação sem resultado.

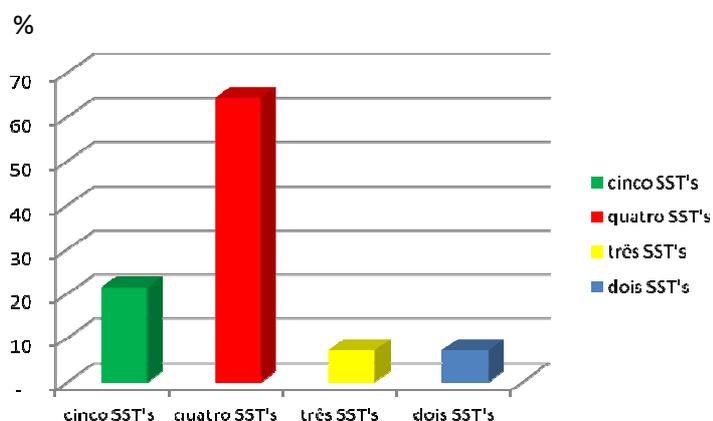


Figura 8 – Gráfico da presença dos diferentes subtipos de receptores da somatostatina em ACNF.

## Figura 9 - Fotomicrografias de adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes.

Figura 9A - Fotomicrografia de adenomas não funcionantes - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 0 para o receptor SST1 do paciente oito. Barra = 400 $\mu$ M.

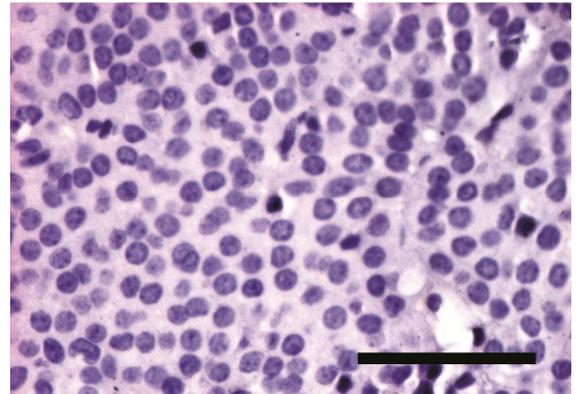


Figura 9B - Fotomicrografia de adenoma não funcionantes - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 1+ para o receptor SST3 do paciente oito. Barra = 400 $\mu$ M.

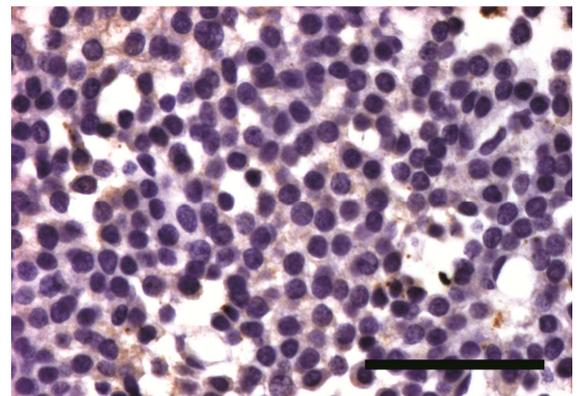


Figura 9C - Fotomicrografia de adenoma não funcionante - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 2+ para o receptor SST3 do paciente seis. Barra = 400 $\mu$ M

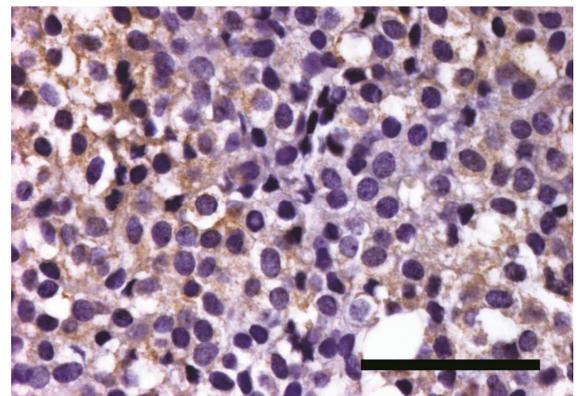
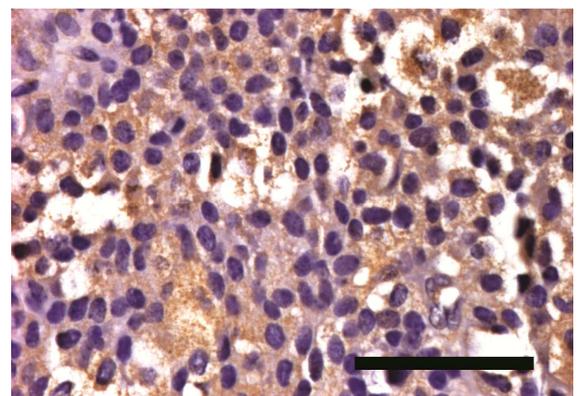


Figura 9D - Fotomicrografia de adenoma não funcionante - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 3+ para o receptor SST2 do paciente seis. Barra = 400 $\mu$ M



4.2.4 - Expressão protéica dos receptores da somatostatina em adenomas hipofisários secretores de prolactina.

Os resultados da distribuição dos subtipos dos receptores da somatostatina nos prolactinomas encontram-se descritos na tabela 7. Foi encontrada expressão de todos os subtipos de receptores nas amostras analisadas, onde pelo menos dois subtipos estavam co-expressos.

**Tabela 7** - Perfil da imunexpressão protéica dos receptores da somatostatina (SST1-SST5) em adenomas secretores de prolactina.

N	SST1		SST2		SST3		SST4		SST5	
	escore	(+) céls (%)								
AH10	-	-	3+	60	2+	35	1+	10	3+	65
AH20	1+	5	0	0	1+	20	0	0	0	0

N = identificação do paciente; SST1-5 = receptores da somatostatina. Escore 0 = imunomarcção ausente, escore 1+: < 25%, escore 2+ : 25-50%, escore 3+: > 50%. Traço (-) reação sem resultado.

**Figura 10 - Fotomicrografias de adenomas hipofisários secretores de prolactina.**

Figura 10A - Fotomicrografia de prolactinoma - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 0 para o receptor SST4 do paciente dois.

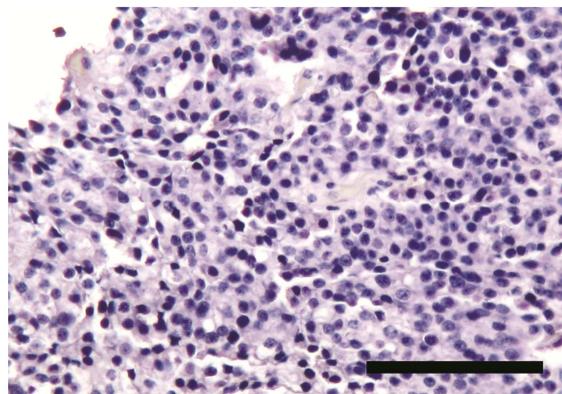


Figura 10B - Fotomicrografia de prolactinoma - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 2+ para o receptor SST3 do paciente um. Barra = 400μM.

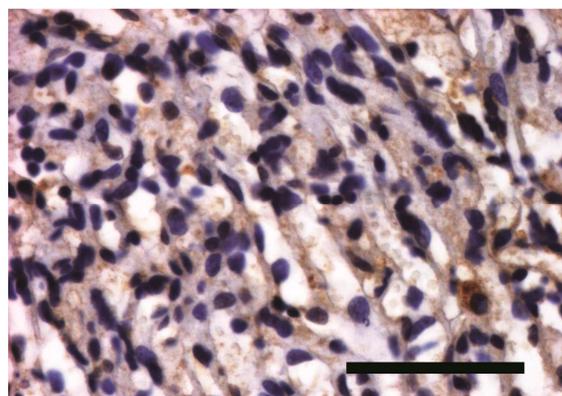
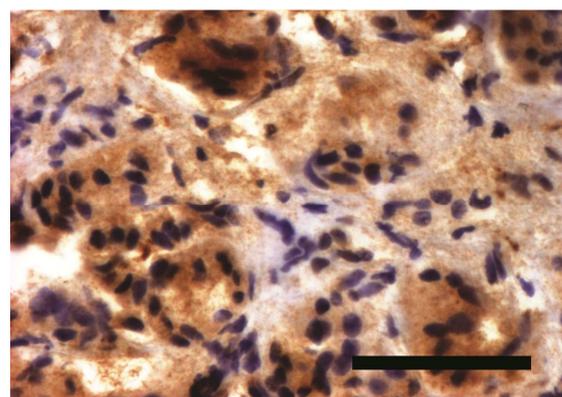


Figura 10C - Fotomicrografia de prolactinoma - reação imunohistoquímica com reatividade correspondente ao escore 3+ para o receptor SST2 do paciente um. Barra = 400μM



#### **4.3 – Perfil da expressão do mRNA dos receptores da somatostatina (SST2, SST5) da dopamina(DR2).**

Dos 38 pacientes estudados em 15 amostras foi possível analisar a expressão do mRNA dos receptores SST2, SST5 e DR2 em adenomas hipofisários. Destes, oito eram adenomas clinicamente não funcionantes, quatro somatotropinomas, dois corticotropinomas, e um prolactinoma que possuíam material fresco para a análise da expressão do mRNA. A especificidade dos *primers* utilizados foi confirmada inicialmente por reação de PCR convencional que tiveram seus produtos submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5% com posterior coloração com brometo de etídeo e demonstram a presença de uma única banda para cada subtipo de receptor (Figura 11). Para a reação de qRT-PCR foi realizada para cada par de *primer* uma curva de dissociação dos genes alvos e do gene constitutivo. Todos apresentaram um único pico, podendo-se assim, descartar a presença de produtos inespecíficos e dímeros de *primer* (Figura 12).

As reações para a realização das curvas-padrão e das amostras em análise foram feitas em triplicatas, obtendo valores de ct concordantes entre elas. Os valores de  $R^2$  para todas as curvas-padrão variaram entre 0,9837 e 0,9966 (Figura 13).

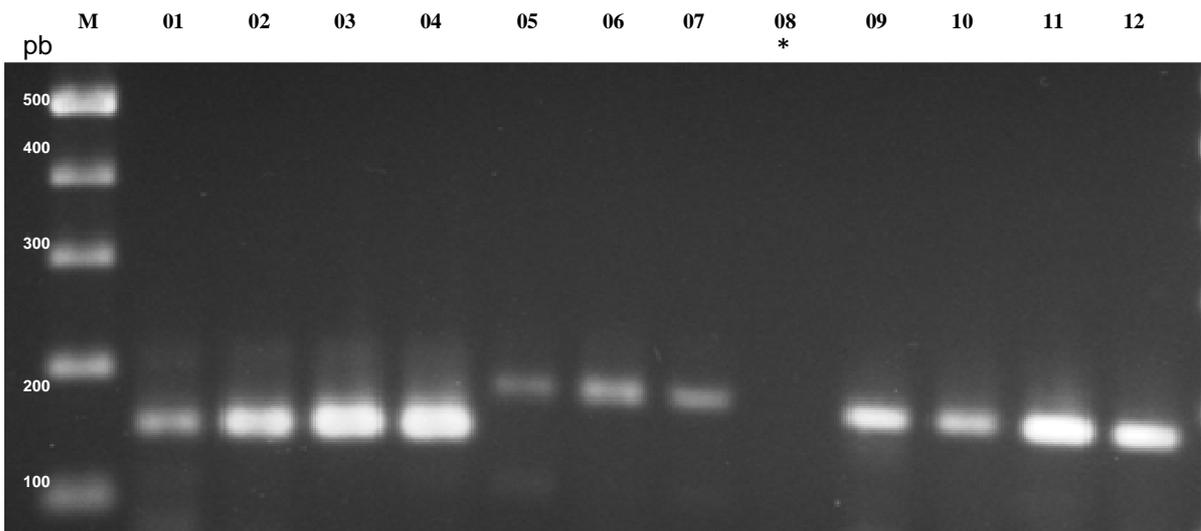


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 2,5%, 100 volts por 90 minutos. Gene  $\beta$ -actina, gene constitutivo, 176pb, ( amostras 01-04); SST5 - receptor da somatostatina 5, 183pb, (amostras 05-08); SST2 – receptor da somatostatina 2, 185pb, (amostras 09-12). pb – pares de base; M – marcador de peso molecular de DNA (1000pb). \* amostras 08 não apresentou expressão.

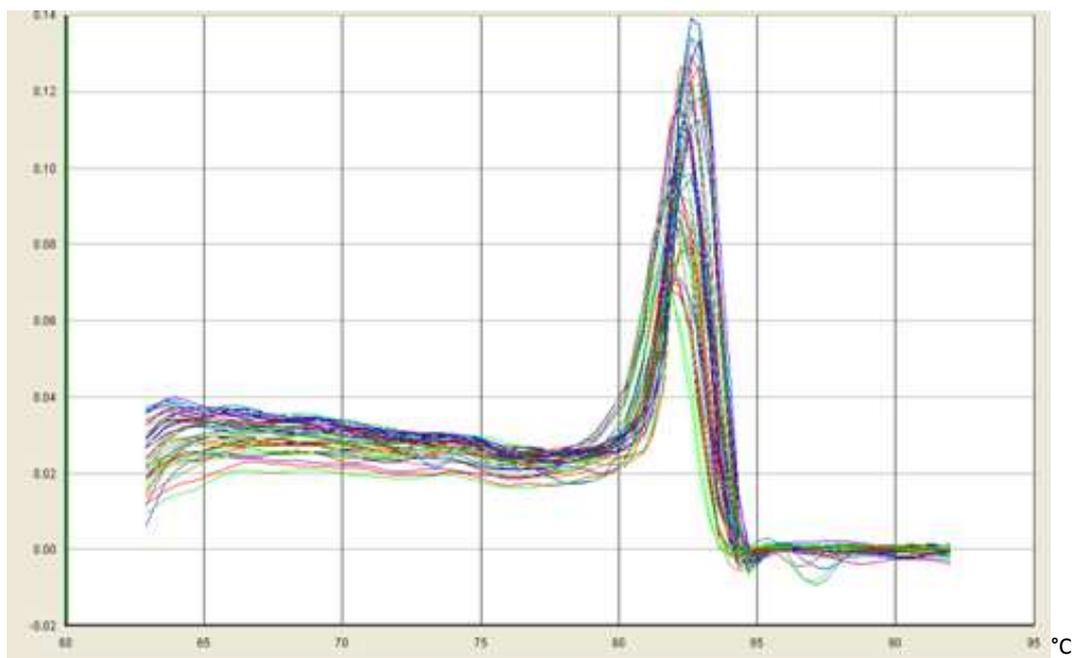


Figura 12: Gráfico da curva de dissociação evidenciando a presença de um único pico. Amplificação das amostras em estudo para o gene  $\beta$ -actina.



Figura 13: Gráfico das diluições seriadas  $10^8 - 10^1$ , para formação da curva padrão necessária para a quantificação absoluta por PCR em tempo real. Diluições em triplicatas do gene  $\beta$ -actina.

#### 4.3.1 – Expressão do mRNA do receptor da somatostatina SST2 e SST5.

Foi observada a expressão dos receptores da somatostatina subtipos 2 e 5 em todas as amostras estudadas, com maior expressão do subtipo SST2 em dez das quinze amostras dos adenomas hipofisários, que se apresentou como a isoforma dominante em aproximadamente 70% dos tumores analisados quando comparados com SST5 (tabela 8).

Nos adenomas classificados com clinicamente não funcionantes, a nível da expressão do mRNA, houve maior expressão do subtipo SST2 em aproximadamente 60% das amostras. Nas demais aproximadamente 40% apresentaram maior expressão do SST5, onde a maior diferença foi observada no paciente AH02 quando comparada com a expressão do subtipo SST2.

Nos somatotropinomas foi observada a expressão de ambos os receptores da somatostatina SST2 e SST5 em todas as amostras analisadas, onde o SST2 foi mais expresso no paciente AH26 e o subtipo SST5 no paciente AH05. Já nos corticotropinomas e prolactinoma foi observada a presença dos receptores ST2 e SST5 com maior expressão do receptor subtipo SST2 em todas as amostras.

#### 4.3.2 – Expressão do mRNA do receptor da dopamina subtipo DR2.

O receptor da dopamina subtipo 2 foi observado em treze das quinze amostras analisadas, aproximadamente 90% dos adenomas hipofisários. Dentre os adenomas não funcionantes, o receptor DR2 apresentou elevada expressão do mRNA nos pacientes AH07, AH12, AH14 quando comparado com as demais amostras e ausência nos paciente AH02 e AH13 (Tabela 8).

Nos somatotropinomas, corticotropinomas e prolactinoma o receptor DR2 estava expresso em todas as amostras em estudo, apresentando elevada expressão no somatotropinoma AH03.

**Tabela 8** – Expressão do mRNA dos receptores SST2, SST5 e DR2 em adenomas hipofisários não funcionantes, somatotropinomas, corticotropinomas e prolactinoma. Número absoluto de cópias estimadas e valores corrigidos pelo controle endógeno ( $\beta$ -actina).

N	SST2	SST5	DR2	$\beta$ -ACTIN	SST2/ $\beta$ -ACTIN	SST5/ $\beta$ -ACTIN	DR2/ $\beta$ -ACTIN	
AH02	3380	44447	0	226271	1,49	19,64	0,00	ACNF
AH07	16014	6785	463426	9890000	0,16	0,06	4,68	
AH08	2174	177	81	176542	1,23	0,10	0,04	
AH12	237821	58918	132593	2490000	9,55	2,36	5,32	
AH13	4680	5912	0	26257	17,82	22,15	0,00	
AH14	5670	29371	8276	155846	3,63	18,84	5,31	
AH37	2566	137	468	137028	1,87	0,09	0,34	
AH39	14648	213	1271	298954	4,89	0,07	0,42	
Mediana	5175,00	6348,50	869,50	201406,50	2,75	1,23	0,38	
AH03	7290	9405	164443	3950000	0,18	0,23	4,16	Somatotropinomas
AH05	1800	20533	4869	577095	0,31	3,55	0,84	
AH15	10181	362	3511	381573	2,66	0,09	0,92	
AH26	3287	141	431	43984	7,47	0,32	0,97	
Mediana	5422,50	6130,25	2391,00	250180,25	1,49	0,28	0,63	
AH04	13100	6156	15505	1210000	1,08	0,50	1,28	Corticotropinomas
AH11	57400	26043	44425	2480000	2,31	1,05	1,79	
AH10	4096	250	28581	454780	0,90	0,05	6,28	Prolactinomas

SST2 receptores da somatostatina subtipo 2; SST5 receptor de somatostatina subtipo 5; DR2 receptor de dopamina subtipo 2. ACNF = Adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes.

#### 4.4 – Comparações entre os perfis da expressão do mRNA e protéica

Os níveis de expressão do mRNA e protéica para os receptores da somatostatina subtipo SST2 e SST5 apresentaram níveis de expressão concordantes na maioria das amostras analisadas, onde foi possível a implementação das duas técnicas de análise, embora não estatisticamente significante (Tabelas 9 e 10).

**Tabela 9** – Expressão do mRNA e expressão protéica dos receptores da somatostatina SST2 e SST5 em adenomas hipofisários.

	mRNA		Proteína		
	SST2/ $\beta$ -ACTIN * 100	SST5/ $\beta$ -ACTIN * 100	sst2 imuno	sst5 imuno	
AH02	1.49	19.64	-	-	ACNF
AH07	0.16	0.06	1+	0	
AH08	1.23	0.10	2+	1+	
AH12	9.55	2.36	3+	0	
AH13	17.82	22.15	2+	2+	
AH14	3.63	18.84	2+	3+	
AH37	1.87	0.09	1+	2+	
AH39	4.89	0.07	1+	1+	
Mediana	2.75	1.23			
AH03	0.18	0.23	1+	1+	Somatotropinomas
AH05	0.31	3.55	2+	0	
AH15	2.66	0.09	2+	3+	
AH26	7.47	0.32	2+	1+	
Mediana	1.49	0.28			
AH04	1.08	0.50	-	-	Corticotropinomas
AH11	2.31	1.05	1+	1+	
AH10	0.90	0.05	3+	3+	Prolactinoma

SST2 receptores da somatostatina subtipo 2; SST5 receptor de somatostatina subtipo 5; D2 receptor de dopamina subtipo 2. ACNF = Adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes. Escore 0 = imunomarcção ausente, escore 1+: < 25%, escore 2+ : 25-50%, escore 3+: > 50%. (r = 0,5365 e p = 0,0321).

**Tabela 10** - Comparação entre o perfil da expressão gênica e protéica dos receptores da somatostatina SST2 e SST5.

Receptor	escore imunohistoquímica				p valor
	0	1+	2+	3+	
<b>SST2</b>	0	1,88(0,16-4,89)	5,52(0,31-17,82)	5,23	0.2012
<b>SST5</b>	1,99(0,06-3,55)	0,35(0,07-1,05)	11,12(0,09-22,15)	6,33(0,09-18,84)	0.8138

## 5 - DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado a expressão protéica dos receptores da somatostatina (SST1-5) e da expressão do mRNA dos receptores da somatostatina (SST2 e SST5) e DR2 da dopamina, através de técnicas de imunohistoquímica e qRT-PCR, respectivamente. Alguns estudos vêm utilizando a técnica de PCR em tempo real para avaliar a expressão do mRNA dos receptores da dopamina e da somatostatina em adenomas hipofisários. Estudo realizado por De Bruin et al. (2009) analisaram a co-expressão dos receptores da somatostatina e da dopamina em adenomas corticotrópicos. Casarini et al. (2009) correlacionaram a expressão dos receptores da somatostatina com a resposta clínica ao tratamento com octreotide-Lar. Taboada et al. (2007) avaliaram a expressão dos receptores da somatostatina em somatotropinomas e adenomas clinicamente não funcionantes e Vieira et al. (2009) avaliaram a expressão dos receptores da dopamina e da somatostatina em hipófises normais, em adenomas clinicamente não funcionantes e somatotropinomas.

Grande parte dos tumores humanos que expressam receptores da somatostatina apresenta expressão de múltiplos subtipos de receptores, sendo o subtipo SST2 o mais amplamente distribuído. No entanto, pode haver divergências entre os níveis de expressão do mRNA e da expressão protéica. A expressão do mRNA pode, em alguns casos, apresentar-se mais elevada quando comparada aos níveis de expressão das proteínas, e tais divergências podem ser atribuídas a diferenças na sensibilidade das técnicas utilizadas; ademais, podem ocorrer diferenças entre os produtos da transcrição e da tradução gênica, pois trata-se de um processo que pode não acontecer de forma simultânea nos eucariotos, e/ ou a regulação negativa dos receptores (REUBI et al., 1994, HOFLAND; LAMBERTS, 2003).

O presente estudo encontrou uma frequente e variável expressão dos receptores da somatostatina e da dopamina em todos os quatro diferentes histotipos de adenomas hipofisários analisados – somatotropinomas, corticotropinomas, adenomas clinicamente não funcionantes e prolactinomas. Estes resultados corroboraram com os achados de estudos prévios, que também demonstraram a presença destes receptores em amostras teciduais de adenomas hipofisários. Demonstrado serem de grande relevância no que diz respeito à possibilidade de direcionamento na escolha da terapia medicamentosa a ser utilizada como adjuvante nos casos em que o procedimento cirúrgico não alcançou o resultado esperado. (CORBETTA et al., 2001; PAWLIKOWSKI et al., 2003; TABOADA et al., 2007; TAKEI et al., 2007; FERONE et al., 2008; COLAO et al., 2009).

A média de idade ao diagnóstico deste estudo foi de 42,7 anos, com uma pequena diferença entre o número de pacientes do sexo feminino (n=23; 60,5%) e do sexo masculino (n=15; 39,5%), entretanto, estes valores estão dentro do percentual descrito em estudos prévios (FERNANDEZ et al., 2009).

Neste estudo foi avaliada a expressão protéica dos receptores da somatostatina em doze somatotropinomas, tendo sido observado a presença dos cinco subtipos dos receptores de SST (SST1-5), distribuídos de formas variáveis nesses adenomas, sendo que os subtipos SST2 e SST3 apresentaram uma distribuição bastante ampla, presente em 100% dos tumores analisados, com diferença nas porcentagens das células imunomarcadas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Takei et al. (2007) que avaliaram a apenas a expressão protéica dos receptores da somatostatina subtipos SST2 e SST5 em 22 somatotropinomas e encontraram imunomarcção em 100% e 95,4% respectivamente, tendo o subtipo SST2 demonstrado maior positividade com

distribuição média em mais de 50% das células tumorais. Thodou et al. (2006) em seu estudo avaliaram a expressão protéica utilizando técnicas de imunohistoquímica, em 30 somatotropinomas de uma série de 90 adenomas hipofisários, e encontraram a expressão protéica de todos os diferentes subtipos de receptores da somatostatina, porém com predomínio da expressão protéica do subtipo SST5 seguido do SST2A.

Esta frequente expressão do SST2 corrobora com os descritos na literatura que sinalizam o SST2 como amplamente distribuído nos somatotropinomas, o que forma a base para a aplicação clínica da terapia medicamentosa para o tratamento dos tumores hipofisários humanos com a utilização dos análogos da somatostatina, como o octreotide e o lanreotide no controle dos sintomas relacionados à hipersecreção em pacientes com adenomas hipofisários secretores de GH ou tumores carcinóides, devido à alta afinidade destes componentes pelo receptor SST2 da somatostatina (HOFLAND; LAMBERTS, 2003; BEVAN et al., 2004; TULIPANO; SCHULZ, 2007).

Sabe-se que a maioria dos tumores hipofisários secretores de GH respondem aos análogos da somatostatina, com uma diminuição ou normalização dos níveis hormonais, com consistente melhora dos sinais e sintomas da doença, contudo, uma parcela dos pacientes é parcial ou totalmente resistentes ao tratamento, geralmente devido à baixa expressão do subtipo SST2 que pode está associado à ausência do oncogene *gsp* (HOFLAND; LAMBERTS, 2003; BEVAN et al., 2004; TULIPANO; SCHULZ, 2007).

Os nossos achados mostraram uma elevada expressão do receptor SST2 que foi observada de moderada a forte em aproximadamente 60% dos pacientes, coloca-os como candidatos em potencial para um resposta positiva ao tratamento com octreotide LAR, para aqueles que não obtiverem cura durante a intervenção cirúrgica. Casarini et al. (2009) analisando a expressão do mRNA dos receptores da somatostatina em

somatotropinomas encontraram uma correlação positiva em paciente que fizeram uso de octreotide LAR e que demonstraram um alto nível de expressão do subtipo SST2, conseguindo uma diminuição nas porcentagens do GH e IGF-1 circulante, além de demonstrar uma correlação da resposta ao análogo com a expressão do subtipo SST1.

Nossos resultados demonstraram o SST1 com uma distribuição de moderada a forte em aproximadamente 35% dos tumores analisados, cujos pacientes poderiam se beneficiar com a utilização de análogos seletivos ao receptor SST1. Achado semelhante foi obtido por Zatelli et al. (2003) que estudaram quinze culturas primárias de adenomas secretores de GH, tratadas com somatostatina ou com BIM23926, agonista seletivo ao SST1, e observou uma significativa inibição de GH e PRL, além de demonstrar uma correlação positiva entre os efeitos antiproliferativos. Referido autor sugeriu que o receptor SST1 pode representar um novo alvo terapêutico para o tratamento medicamentoso na tentativa de controlar o crescimento e a secreção nos tumores hipofisários.

Benvan (2005) em sua revisão com 921 acromegálicos demonstrou que o tratamento com os análogos da somatostatina alcançou uma redução do tamanho tumoral em 42% dos pacientes. Estes dados corroboraram com resultados previamente descritos *in vitro* que demonstravam uma significativa redução no número de células em três de seis culturas primárias de adenomas secretores de GH tratados com octreotide em diferentes concentrações que variaram de 1-10 $\mu$ M. Efeitos similares foram demonstrados em estudos que utilizavam culturas primárias de ACNF (RENNER et al., 1994; ZATELLI et al., 2007).

Encontramos em aproximadamente 80% dos somatotropinomas estudados a presença do subtipo SST5 com uma distribuição de moderada a forte em cerca de 30% dos pacientes. O subtipo SST5 vem ganhando destaque recentemente em vários estudos

que, demonstraram que uma ativação combinada dos receptores da somatostatina, subtipos SST2 e SST5, resultam em um efeito inibitório aditivo da secreção de GH e IGF-1, provavelmente mediada via uma associação funcional de ambos os subtipos de receptores, através dos análogos com seletividade a múltiplos ligantes da somatostatina (ROCHEVILLE et al., 2000; HOEK et al., 2007).

A elevada expressão protéica do SST2 e SST5 observada em aproximadamente 30% dos somatotropinomas sinaliza para a possibilidade de utilização do Pasireotide, graças ao seu perfil de ligação universal aos receptores da somatostatina, o que teoricamente permitiria aos pacientes do presente estudo, beneficiar-se da ação combinada dos receptores visando uma maior inibição da secreção de GH e IGF.

Em nosso estudo um resultado pouco comum quando comparado com os dados descritos na literatura, foi à expressão protéica do subtipo SST4, que muitas vezes é tido como infrequente ou mesmo ausente em adenomas hipofisários e até mesmo em hipófise normal (COLAO et al., 2007 ; FERONE et al., 2009). Julgamos que como algumas revisões sinalizaram o subtipo SST4 na condição de infrequente ou ausente, muitos estudos deixaram de avaliar a expressão do subtipo SST4, como os estudos de Plöckinger et al. (2008) que analisaram apenas os demais subtipos de receptores da somatostatina; os de Ferone et al. (2008) que estudaram somente o subtipo SST2A, e os de Takei et al. (2007), que analisaram a expressão dos subtipos SST2A e SST5. Assim o SST4 é um subtipo de receptor da somatostatina pouco estudado, necessitando, desta forma, de mais dados sobre sua expressão e sobre seu papel regulatório em tecidos de adenomas hipofisários. Em concordância com os nossos achados, Thodou et al. (2006) avaliando a expressão protéica dos receptores da somatostatina através de técnicas de imunohistquímica, demonstraram igualmente uma expressão significativa do receptor

SST4 em adenomas hipofisários utilizando um anticorpo primário anti-SST4 produzido por um laboratório diferente do utilizado no presente estudo.

A análise dos corticotropinomas foi realizada em cinco amostras de pacientes que apresentavam a doença de Cushing e foram submetidos a tratamento cirúrgico. Em quatro amostras foi realizada a análise da expressão protéica e foi demonstrada a presença de todos os receptores da somatostatina nos adenomas estudados, sendo que em dois pacientes foi possível avaliar a expressão do mRNA dos receptores SST2, SST5 e DR2. Estes dados estão de acordo com os dados obtidos em estudos prévios que demonstraram a expressão protéica dos subtipos de receptores da somatostatina em adenomas corticotrópicos (NIELSEN et al., 2001; HOFLAND et al., 2005; BATISTA et al., 2006).

Batista et al. (2006) analisaram a expressão do mRNA e a expressão protéica dos receptores da somatostatina em treze corticotropinomas, e demonstraram a expressão de todos os subtipos de receptores (SST1-SST5), com altos escores do subtipo SST5. E utilizando culturas primárias de seis corticotropinomas relataram significativa diminuição nos níveis de ACTH e da proliferação celular, após a utilização do análogo Pasireotide. Dessa forma, a utilização terapêutica do análogo Pasireotide poderá vir a ser uma importante ferramenta no tratamento dos pacientes que demonstraram a presença do SST5 e que não alcançaram a normalização dos níveis de ACTH circulantes após o tratamento cirúrgico.

Uma das limitações encontradas no presente estudo foi o baixo número de espécimes de corticotropinomas analisados, parte devido ao número reduzido de pacientes acometidos pela doença de Cushing, que é uma doença de baixa prevalência na população geral e parte devido às características morfológicas tumorais que dificultam a obtenção de material para os estudos.

A análise da expressão dos receptores da somatostatina nos ACNF foi realizada em dezessete amostras, tendo sido avaliada a expressão protéica dos SST's em dezesseis amostras. Encontrada a presença de todos os receptores da somatostatina com distribuição variável nos tumores. A distribuição do SST's nos ACNF, aponta para a possibilidade da utilização de tratamento medicamentoso como opção terapêutica para estes tumores com os análogos da somatostatina (PAWLIKOWSKI et al., 2003; TABOADA et al., 2007).

O subtipo SST3 foi o receptor mais frequentemente encontrado nos ACNF, presente em aproximadamente 90% adenomas estudados, com uma imunopositividade prevalente do tipo moderadamente distribuída nas células tumorais. Tais resultados estão em consonância com os achados obtidos por Taboada et al. (2007), que analisando a expressão dos receptores da somatostatina em dezenove adenomas não funcionantes, encontraram uma maior prevalência da expressão do subtipo SST3.

A elevada expressão do SST3 é indicativa de uma potencial resposta ao tratamento medicamentoso com a utilização de análogos da somatostatina seletivos ao SST3, ou mesmo o multiligando Pasireotide. Foi demonstrado *in vitro* que a ativação do SST3 podem ativar vias de sinalização que levam a apoptose por indução da expressão dos genes p53, pró apoptótica Bax e caspase 8 (TULIPANO; SCHULZ, 2007). No caso de ACNF seria de grande importância, visto que as principais complicações neste tipo tumoral são decorrentes da expansão tumoral.

Os subtipos SST2, SST4 estavam presentes em aproximadamente 85% dos ACNF analisados, diferindo, contudo, na distribuição das células imunomarcadas. Em cerca de 60% dos adenomas clinicamente não funcionantes o SST2 apresentou-se como moderado a fortemente distribuídos, indicando a possibilidade de resposta positiva ao tratamento com a utilização dos análogos octreotide e lanreotide que possuem alta

afinidade pelo SST2, que além do efeito anti-secretório está relacionado a uma atividade antimitótica que pode ser importante na redução ou estabilização do tamanho tumoral dos ACNF.

Plöckinger et al.(1994) e Warnet et al.(1997) obtiveram redução significativa do volume tumoral em pacientes com adenomas não funcionantes após o tratamento com octreotide. No entanto, os efeitos anti-proliferativa do octreotide observados *in vitro* sobre ACNF tem sido relatados em poucos estudos, observada uma redução da massa tumoral em 11-13% dos casos estudados.

Os subtipos SST1 e SST5 foram expressos em aproximadamente 75% e 70%, respectivamente. Nossos achados diferem dos encontrados por Pawlikowski et al. (2003), que analisando a expressão protéica dos receptores da somatostatina em 18 tumores apontaram os subtipo SST1 e SST5 como possíveis alvos terapêuticos para os ACNF, devido as suas maiores imunopositividade, e demonstraram também uma fraca imunopositividade do subtipo SST2A. Referidos resultados divergem com os achados no presente estudo que demonstrou o subtipo SST3 como o receptor da somatostatina mais expresso seguido de uma alta expressão do SST2.

No que cerne à avaliação da expressão do mRNA dos receptores SST2, SST5 e DR2 foi analisado a expressão em quinze adenomas hipofisários, sendo oito ACNF, quatro somatotropinomas, dois corticotropinomas e um prolactinoma. Em todas as amostras foi demonstrada a presença dos receptores da somatostatina subtipo SST2 e SST5, com predominância do subtipo SST2. Nas amostras em que houve uma maior expressão do SST5 este receptor pode tornar-se um importante alvo terapêutico, como descrito por Saveanu et al. (2001), que sugeriram que em tumores com baixa expressão do SST2, quando comparado a expressão de SST5, o SST5 seria de maior importância na regulação da liberação do GH.

Para os adenomas com maior expressão do subtipo SST2, o tratamento com octreotíde pode oferecer uma importante ferramenta no tratamento dos pacientes com recidiva, com boas chances de apresentarem uma resposta positiva, segundo os resultados já descritos na literatura, reduzindo a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica que ao longo do tempo se mostrou menos eficaz que a primeira cirurgia, podendo acometer os pacientes a mais complicações, além de todo o desgaste psicológico causado pelo estresse pré e pós operatório (DALM et al., 2007; COLAO., 2009).

O receptor DR2 da dopamina estava presente em aproximadamente 85% das amostras estudadas. Esses resultados estão de acordo com os descritos por Ferone et al. (2009), que demonstraram a presença da expressão dos receptores da dopamina e da somatostatina em adenomas hipofisários. A utilização dos agonistas dopaminérgicos tem sido associados à diminuição da prevalência do aumento residual tumoral ou a estabilidade do volume tumoral em ACNF Greenman et al.(2005) sugeriram que o uso de drogas dopaminérgicas podem prevenir a expansão da massa tumoral em pacientes com ACNF que não obtiveram cura na intervenção cirúrgica, ensejando a possibilidade do uso da cabergolina como uma opção terapêutica no tratamento dos pacientes com adenomas hipofisários.

No presente estudo foi observada a coexpressão do mRNA dos receptores da dopamina e da somatostatina em aproximadamente 85% da amostras estudadas. De Bruin et al. (2009) avaliaram a coexpressão dos subtipos de receptores da dopamina e da somatostatina em trinta adenomas corticotrópicos e concluíram que o subtipo SST5 e DR2 são altamente expressos em adenomas corticotrópicos e que a coexpressão deles é um fenômeno comum, sustentando a teoria que afirma que a ação combinada dos

análogos da somatostatina e agonistas dopaminérgicos podem ser uma opção terapêutica válida para os indivíduos acometidos pela doença de Cushing.

Estudos utilizando a ação combinada dos análogos da somatostatina e dos agonistas dopaminérgicos demonstraram um efeito aditivo na inibição dos níveis de GH e normalização do IGF-1 em pacientes com acromegalia, utilizando octreotida e cabergolina (COLAO et al., 2007).

O esperado é que haja esta correlação positiva entre os resultados da expressão do mRNA e da proteína, o que nos permitiria afirmar que os produtos gerados durante o processo de transcrição do mRNA estão sendo traduzidos em proteínas. Resultados divergentes entre a expressão do mRNA e protéica podem estar relacionados tanto a um processo de internalização dos receptores como com as próprias limitações das técnicas, onde a qRT-PCR em tempo real demonstra-se uma técnica bem mais sensível de análise. O baixo número amostral revelou-se como uma das limitações do nosso estudo; na busca de um maior número amostral parcerias multicêntricas tem sido desenhadas para uma avaliação mais segura da relação da expressão dos receptores da dopamina e da somatostatina nos tumores hipofisários.

## 6 - CONCLUSÃO

- A expressão protéica dos receptores da somatostatina (SST1-SST5) foi encontrada em todos os adenomas hipofisários, com distribuição e frequência que variaram entre os quatro histotipos tumorais e entre os pacientes estudados;
- Nos somatotropinomas, a expressão protéica do SST2 foi encontrada em todos os tumores, o que pode indicar uma resposta positiva ao tratamento com o octreotide nos pacientes que não obtiverem cura na cirurgia;
- Para os corticotropinomas e prolactinomas há a necessidade de aumentar o número amostral para poder caracterizar seu perfil protéico;
- Nos ACNF, o receptor SST3 foi o mais expresso;
- A expressão do mRNA dos receptores da somatostatina SST2 e SST5 e da dopamina DR2 estava presente em todos os quatro histotipos tumorais, com maior expressão do SST2;
- Não foi encontrada uma correlação positiva entre a expressão do mRNA e proteica do receptor SST's.

## REFERÊNCIAS

ANDERSEN, M. In vivo secretory potential and the effect of combination therapy with octreotide and cabergoline in patients with clinically non-functioning pituitary adenomas. **Clinical Endocrinology**. v.54, p. 23-30, 2001.

ABS, R. et al., Cabergoline in the treatment of acromegaly: a study of 64 patients. **J Clin Endocrinol Metab**. v.83, p.374-378, 1998.

BATISTA, D. L. et al. The effects of SOM230 on cell proliferation and adrenocorticotropin secretion in human corticotroph pituitary adenomas. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 91(11), p. 4482-4488, 2006.

BEN-JONATHAN, N., HNASKO, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. **Endocr Rev**. v. 22, p.724-763, 2001.

BEN-SHLOMO, A.; MELMED, S. Somatostatin agonists for treatment of acromegaly. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 286, p. 192-198, 2008.

BEN-SHLOMO, A.; MELMED, S. Pituitary somatostatin receptor signaling. **Trends Endocrinol Metab**. v. 21, p. 123-133, 2010.

BEVAN, J.S. et al. Dopamine agonists and pituitary tumors shrinkage. **Endocrine Reviews**. v. 13, p.220-240, 1992.

BEVAN, J.S., The antitumoral effects of somatostatin analog therapy in acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab**. v.90, p.1856-1863, 2005.

CASARINI, A.P.M. Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. **Pituitary**. v. 12, p. 297-303, 2009.

COLAO, A. et al. Combined therapy of somatostatin analogues and dopamine agonist in the treatment of pituitary tumours. **European Journal of Endocrinology**. v. 156, p. S57-S63, 2007.

COLAO, A. et al. Medical therapy of pituitary adenomas: effects on tumor shrinkage. **Rev Endocr Metab Disord**. v. 10, p. 111-123, 2009.

CORBETTA, S. et al. Somatostatin receptor subtype 2 and 5 in human GH-secreting pituitary adenomas: analysis of gene sequence and mRNA expression. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 31, p. 208-214, 2001

CSABA, Z.; DOURNAUD, P. Cellular biology of somatostatin receptor. **Neuropeptides News and Reviews**. v. 35, p. 1-23, 2001.

DALM, V.A.S.H., HOFLAND, L.J., LAMBERTS, S.W.J. Future clinical prospects in somatostatin/cortitastin/somatostatin receptor field. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 14, p. 262-277, 2008.

DAVIS, J.R.E. et al. Pituitary tumours. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 121, p. 363-371, 2001.

DE BRUIN, T. W. et al. Clinically non functioning pituitary adenoma and octreotide response to long term high dose treatment, and studies in vitro. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 75, p. 1310-1317, 1992.

DE BRUIN, C. et al. Somatostatin and dopamine receptors as targets for medical treatment of Cushing's Syndrome. **Rev Endocr Metab Disord**. v. 10, p. 91-102, 2009.

DE BRUIN, C. et al. Coexpression of Dopamine and Somatostatin Receptor Subtypes in Corticotroph adenomas. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 94, p. 1118-1124, 2009.

DEKKERS, O.M., et al. The natural course of non-functioning pituitary macroadenomas. **Eur. J. Neurosci.** v.156(2), p. 217-224, 2007.

FERNANDEZ, A., KARAITAKI, N., WASS, J.A. Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). **Clinical Endocrinology (Oxf).** vol. 72, p. 377-382, 2010.

FERONE, D. et al. Novel chimeric somatostatin analogs: facts and perspectives. **European Journal of Endocrinology.** v. 156, p. S23-S28, 2002.

FERONE, D. et al. Preclinical and clinical experiences with the role of dopamine receptor in the treatment of pituitary adenomas. **European Journal of Endocrinology.** v. 156, p. S37-43, 2007.

FERONE, D. Correlation of *in Vitro* and *in Vivo* Somatotropic Adenoma Responsiveness to Somatostatin Analogs and Dopamine Agonists with Immunohistochemical Evaluation of Somatostatin and Dopamine Receptors and Electron Microscopy. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 93, p. 1412–1417, 2008.

FERONE, D. et al. The clinical-molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. **Journal of Molecular Endocrinology.** v. 42, p. 361-370, 2009.

GAHETE, M. D. et al. Are somatostatin and cortistatin two siblings in regulating endocrine secretions? *In vitro* work ahead. **Molecular and Cellular Endocrinology.** v. 286, p. 128-134, 2008.

GREENMAN, Y. et al. Post-operative treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonist decrease tumour remnant growth. **Clinical Endocrinology.** v. 63, p.39-44, 2005.

GROZINSKY-GLASBERG, S.; GROSSMAN, A. B.; KORBONITS, M. The role of somatostatin analogues in the treatment of neuroendocrine tumours. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 286, p. 69–74, 2008.

GUILLERMET-GUIBERT, J.; et al. Physiology of somatostatin receptor. **Journal Endocrinol Invest**, v. 28, p.5-9, 2005.

GUYTON, A. C. Os hormônios hipofisários e seu controle pelo hipotálamo. In:\_\_\_\_\_. **Tratado de Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1992. cap. 75, p.720-730.

HERDER, W. W. Diagnostic imaging of dopamine receptor in pituitary adenomas. **European Journal of Endocrinology**. v. 156, p. S53-56, 2007.

HOEK, J.; LAMBERTS, S. W. J.; HOFLAND, L.J.; Preclinical and clinical experiences with the role of somatostatin receptors in the treatment of pituitary adenomas. **European Journal of Endocrinology**. v. 156, p. S45-S51, 2007.

HOFLAND, L. J.; LAMBERTS, S. W. J. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. **Endocrine Reviews**. v. 24, p. 28-47, 2003.

HOFLAND, L. J. et al. The multi-ligand somatostatin analogue SOM 230 inhibits ACTH-secretion by cultured human corticotroph adenomas via somatostatin receptor type 5. **European Journal of Endocrinology**. v.152, p. 645-654, 2005.

HOFLAND, L. J. Somatostatin and somatostatin receptors in Cushing's disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 286, p. 199-205, 2008.

HOLDAWAY, I.M.; RAJASOORYA C. Epidemiology of acromegaly. **Pituitary**. v. 2, p. 29-41, 1999.

JACOBS, S.; SCHULZ, S. Intracellular trafficking of somatostatin receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 286, p. 58-62, 2008.

JAFFE, C.A.; BARKEN, A.L., Treatment of acromegaly with dopamine agonist. **Endocrinol Metab Clin North Am**. v.21, p.713-725, 1992.

JAFFE, C.A, Clinically non-functioning pituitary adenoma. **Pituitary**. v. 9, p.317-321, 2006.

LANIA, A.; MANTOVANI, G.; SPADA, A. Genetic abnormalities of somatostatin receptors in pituitary tumors. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 286, p. 180-186, 2008.

MELMED, S. et al. Acromegaly treatment consensus workshop participants. Guidelines for acromegaly management. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 87, p. 4054-4058, 2002.

MEMELD, S. Acromegaly pathogenesis and treatment. **Journal Endocrinol Invest**. v.119, p.3189-3202, 2009.

MISSALE, C. et al. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiological Reviews**. v.78, p. 189-225, 1998.

MIN-LI, P. D. et al. Somatostatin, Somatostatin Receptors, and Pancreatic Cancer. **World Journal of Surgery**. v. 29, p. 293-296, 2005.

MORTINI, P. et al. Results of transphenoidal surgery in a large series of patients with pituitary adenoma. **Neurosurgery**. v. 56, p. 222–1233, 2005.

MUSCARELLA, L.A. et al. Gene expression of somatostatin receptor subtypes SSTR2a, SSTR3 and SSTR5 in peripheral blood of neuroendocrine lung cancer affected patients. **Cell Oncol**. 2011.

NIELSEN, S. et al. Expression somatostatin receptor on human pituitary adenomas in vivo and ex vivo. **Journal Clin Invest.** v. 24, p. 430-437, 2001

NOMIKOS, P. et al., The outcome of surgery in 668 patients with acromegaly using current criteria of biochemical “cure”. **European Journal of Endocrinology** . v.152, p.379-387,

OSAMURA, R.Y. et al. Pathology of the human pituitary adenomas. **Histochem Cell Biol.** v. 130, p.495-507, 2008.

PATEL, Y. C. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. **Journal Endocrinol Invest.** v. 20, p. 348–367, 1997.

PATEL, Y.C. Somatostatin and its receptor family. **Front Neuroendocrinol.** v. 20, p. 157-198, 1999.

PAWLIKOWSKI, M. et al. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtypes in “clinically nonfunctioning” pituitary adenomas. **Endocrine Pathology.** v.14, p.231-238, 2003.

PIVONELLO, R., et al. Dopamine Receptor Expression and Function in Corticotroph Pituitary Tumors. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 89, p. 2452-2462, 2004.

PIVONELLO, R. et al. Novel insights in dopamine receptor physiology. **European Journal of Endocrinology.** v. 156, p. S13-S21, 2007.

PORTERFIELD, S. P.; WHITE, B. A. The Hypothalamus-pituitary complex. In: \_\_\_\_\_. **Endocrine Physiology.** Philadelphia,USA., ed. 3, p. 107-140, 2007.

PLÖCKINGER, U. et al. Preoperative octreotide treatment of growth hormone-secreting and clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas: effect on tumor volume and lack of correlation with immunohistochemistry and somatostatin receptor scintigraphy. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 79(5), p. 1416-1423, 1994.

PLÖCKINGER, U., et al. Selective Loss of Somatostatin Receptor 2 in Octreotide-Resistant Growth Hormone-Secreting Adenomas. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 94, p. 1203-1210, 2008

RENNER, U. et al., Effect of bromocriptine and SMS201-995 on growth of human somatotrophic and non-functioning pituitary adenoma cells *in vitro*. **European Journal of Endocrinology.** v.137, p.80-91, 1994.

REUBI, J.C.; HORISBERGER, U. LAISSUE, J. High density of somatostatin receptor in veins surrounding human cancer tissue: role in tumor-host interaction? **International Journal of Cancer.** v. 56, p.681-688,1994.

REUBI, J.C. et al. Somatostatin receptor SST1-SST5 expression in normal and neoplastic human tissue using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. **European Journal of Nuclear Medicine.** v. 28, p. 836-846. 2001

ROCHEVILLE, M. et al. Receptor for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. **Science.** v. 288, p. 154-157. 2000

SAVEANU, A. et al. Relevance of coexpression of somatostatin and dopamine D2 receptors in pituitary adenomas. **Molecular and Cellular Endocrinology.** v. 286, p. 206-213, 2008.

SCHMIND, H. A. Pasireotide (SOM230): Development, mechanism of action and potential applications. **Molecular and Cellular Endocrinology.** v. 286, p. 69-74, 2008.

SCHONBRUNN, A. Selective agonist in somatostatin receptor signaling and regulation. **Molecular and Cellular Endocrinology.** v. 286, p. 35-39, 2008.

SHIMON, I. et al. Somatostatin receptor (SSTR) subtype-selective analogues differentially suppress *in vitro* growth hormone and prolactin in human pituitary adenomas. Novel potential therapy for functional pituitary tumors. **Journal Clin Invest.** v. 100, p. 2386-2392, 1997.

SHIMON, I. Somatostatin receptors in pituitary and development of somatostatin receptor subtype-selective analogs. **Endocrine**. v. 20, p.265-269, 2003.

TABOADA, G. F. et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype(SSTR1–5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. **European Journal of Endocrinology**. v. 156, p. 65-74, 2007.

TAKEI, M. et al. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor(SSTR) subtypes 2A and 5 in pituitary adenoma from acromegalic patients: good correlation with preoperative response to ocreotide. **Endocrine Pathology**. v. 18, p. 208-216, 2007.

TULIPANO, G.; SCHULZ, S. Novel insights in somatostatin receptor physiology. **European Journal of Endocrinology**. v. 156, p. S3-S11, 2007.

VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E., Structure and function of dopamine receptors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 24, p. 125-132, 2000.

VIEIRA-NETO, L. et al. Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between dopamine and somatostatin receptors with clinical response to octreotide-LAR in acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab**. v.94, p.1931-1937, 2009.

VIKIC-TOPIC, S. et al. Expression of somatostatin receptor subtypes in breast carcinomas, carcinoid tumor, and renal cell carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 80, p. 2974-2979, 1995.

VILAR, L. et al. Effectiveness of cabergoline in monotherapy and combined with ketoconazole in the management of Cushing's disease. **Pituitary**. v. 13, p. 123-129, 2010.

VILAR, L. et al., et al. Role of the addition of cabergoline to the management of acromegalic patients resistant to longterm treatment with oct LAR. **Pituitary**. v.14, p.148-156, 2011.

VIOLLET, C. et al. Somatostatinergic systems in brain: Networks and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 286, p. 75-87, 2008.

VOLANTE, M. et al. Somatostatin, cortistatin and their receptors in tumours. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 286, p. 219-229, 2008.

ZATELLI, M.C., et al. Somatostatin receptor subtype 1 selective activation in human growth hormone and prolactin-secreting pituitary adenomas: effects on cell viability, growth hormone and prolactin secretion. **J Clin Endocrinol Metab**. v.88, p. 2797-2802, 2003.

ZATELLI, M.C.et al. Control of pituitary adenomas cell proliferation by somatostatin analogs, dopamine agonists and novel chimeric compounds. **European Journal of Endocrinology**. v.156, p. 529-534, 2007.

WARNET, et al. A prospective multicenter trial of octreotide in 24 patients with visual defects caused by nonfunctioning and gonadotropin-secreting pituitary adenomas. French multicenter octreotide study group. **Neurosurgery**. v. 41 (4), p. 786-797, 1997.

YOGESH, C. P. Somatostatin and its receptor family. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v. 20, p. 157-198, 1999.

# APÊNDICE

## APÊNDICE 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: “**Análise da Expressão do mRNA dos Receptores da Dopamina e da Somatostatina em Adenomas Hipofisários.**”

Nome do (a) Pesquisador (a): Bruno de Almeida Nunes.

Nome do (a) Orientador (a): Emygdia Rosa Leal Mesquita; Manuel dos Santos Faria.

1. **Natureza da pesquisa:** o Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa que tem como finalidade analisar alguns tipos de adenomas (tumores) que ocorrem na hipófise.

2. **Envolvimento na pesquisa:** O Senhor (a) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o senhor (a). Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA.

3. **Riscos e desconforto:** a participação nesta, não traz nenhum risco adicional ao indivíduo que será submetido à cirurgia independentemente de sua aceitação em participar do estudo.

4. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o (a) pesquisador (a) e o (a) orientador (a) terão conhecimento dos dados.

5. **Benefícios:** ao participar desta pesquisa o senhor (a) não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo venha fornecer informações importantes sobre os tumores que serão analisados. De forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa em um futuro próximo auxiliar na escolha da terapêutica medicamentosa, minimizando assim os riscos de uma segunda

intervenção cirúrgica. Onde os pesquisadores se comprometem a divulgar os resultados obtidos.

6. **Pagamento:** o Senhor (a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem: Confiro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Obs.: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito do mesmo.

### **Consentimento Livre e Esclarecido**

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

São Luís, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Nome do Participante da Pesquisa  
Pesquisa

Assinatura do Participante da

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador

**Pesquisador Responsável: EMYGDIA ROSA LEAL MESQUITA**

**Laboratório de Estudos Genômicos e de Histocompatibilidade - (LEGH)**

**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO – UNIDADE MATERNO INFANTIL.**

**Endereço: Rua dos Prazeres, nº215, Centro – Cep: 65020-468**

**Fone: (98) 21091265**

**EQUIPE EXECUTORA**

Profª. Drª. Emygdia Rosa Leal Mesquita (Bióloga-Geneticista) [emygdia@elo.com](mailto:emygdia@elo.com)

Profº. Drº Manuel dos Santos Faria (Médico-Endocrinologista)  
[mfarias@elo.com](mailto:mfarias@elo.com)

Bruno de Almeida Nunes (Biólogo) [nunesb.bioufma@hotmail.com](mailto:nunesb.bioufma@hotmail.com)

Profº Msc. Marcelo Souza de Andrade (Biólogo)

Gilvan Cortês Nascimento (Médico-Endocrinologista)

Viviane Chaves de Carvalho (Médico-Endocrinologista)

Fernanda de Carvalho Ferreira (Bióloga) [nandacf\\_ferreira@hotmail.com](mailto:nandacf_ferreira@hotmail.com)

Maxwellem de Jesus Costa Ferreira (Bióloga)

Amanda Ferreira Vidal [amanda\\_vidal@hotmail.com](mailto:amanda_vidal@hotmail.com)

Fernanda Oliveira Graça [nanda\\_2020\\_oliveira@hotmail.com](mailto:nanda_2020_oliveira@hotmail.com).

**ANEXOS**

## **ANEXO 1 - APROVAÇÃO COMITÊ DE ETICA**

## ANEXO 2

### PROTOCOLO: Purificação total de RNA de tecido animal – Rneasy Handbook

- amostra: máximo – 30 mg  
15-20 mg: tecido estabilizado RNA later
- volume mínimo de eluição = 30 µl

Obs.: partes do cérebro são mais difíceis de serem lisadas, ou tendem a formar precipitados durante a purificação de RNA. Pode ser necessário aumentar-se o volume do buffer RLT para facilitar à completa homogeneização.

Obs.: Adicionar β-mercaptoetanol ao buffer RLT.

1 ml buffer RLT p/ 10 µl de β-mercaptoetanol

- Buffer RLT = 600 µl para facilitar quebra e homogeneização.

<b>Amostra</b>	<b>Buffer RLT (µl)</b>
< 20 mg	350 ou 600
20-30 mg	600

#### 3) Rompimento usando pilão:

Imediatamente coloque o tecido (fresco, congelado ou estabilizado com RNA later) em nitrogênio líquido e triture completamente com o “pilão” e pestle. Decante o pó do tecido e o nitrogênio dentro de Rnase-free em um tubo de microcentrífuga (2 ml). Permita o nitrogênio evaporar, mas não permita o tecido descongelar.

Obs.: fazer em gelo.

Adicione o volume apropriado do Buffer RLT , e homogenize o lisado passando por pelo menos 5 vezes através de uma seringa livre de RNase (pipeta).

4) Centrifuge por 3 minutos a rotação máxima. Remova cuidadosamente o sobrenadante por pipetagem e transfira para um novo tubo de microcentrífuga.

Obs.: use somente este sobrenadante nos passos seguintes.

5) Adicione 1 volume de etanol (400-500  $\mu$ l) 70% para clarear o lisado, e misture imediatamente por pipetagem. NÃO CENTRIFUGUE.

Obs.: o volume do lisado pode ser 350  $\mu$ l ou 600  $\mu$ l devido à perda durante a homogenização e centrifugação.

Obs.: O precipitado pode estar visível depois da adição do etanol. Este não afeta o procedimento.

6) Transferir 700  $\mu$ l da amostra, incluindo algum precipitado que possa ter formado, para um tubo de 2 ml. Feche a tampa e centrifugue por 15 segundos a 8000.g (>10000 rpm). Descarte o flow-through.

Obs.: Reuse o tubo coletor.

Obs.: Se o volume da amostra exceder 700  $\mu$ l, centrifugue sucessivas alíquotas no mesmo spin column. Descarte o flow-through.

7) Adicionar 700  $\mu$ l de buffer RW1 no Rneasy spin column. Feche e centrifugue por 15 segundos a 10000 rpm, para lavar a membrana do spin column. Descarte o flow-through.

Obs.: Reuse o tubo coletor.

Obs.: Após centrifugar, remova cuidadosamente o Rneasy spin column do tubo coletor para que não toque o flow-through.

8) Adicione 500  $\mu$ l buffer RPE no Rneasy spin column. Feche e centrifugue por 2 minutos a 10000 rpm para lavar a membrana spin column. Descarte o flow-through.

Obs.: Reuse o tubo coletor.

9) Adicione 500  $\mu$ l de buffer RPE no Rneasy spin column. Feche e centrifugue por 2 minutos a 10000 rpm para lavar a membrana do spin column.

10) (OPCIONAL) Coloque o Rneasy spin column em um tubo coletor de 2 ml e descarte o antigo com flow-through. Feche e centrifugue por 1 minuto em rotação máxima.

11) Coloque o Rneasy spin column em um novo tubo coletor de 1,5 ml. Adicione 30-50  $\mu$ l de água Rnase-free diretamente na membrana do spin column. Feche e centrifugue por 1 minuto (10000 rpm) para eluir o RNA.

12) Se o rendimento do RNA esperado é  $> 30$  mg, repetir o passo 11 usando outra alíquota de 30-50  $\mu$ l de Rnase-free.

**ANEXO 3 - PROTOCOLO: Kit DNase I (RNase-free).**

<b>Reagentes</b>	<b>1 reação (µl)</b>	<b>Concentração final</b>
DNase I (RNase -free) - 2000 u/ml	2	2 u/µl
DNase I Reaction Buffer - 10x	3	1x
RNA - 10µg	-	-
Nuclease H <sub>2</sub> O	-	
Total	30	

1. Incubar a 37°C por 10 min;
2. Adicionar 1µl de 0,5M EDTA (para uma concentração final de 5mM)
3. Aquecer a 75°C por 10 min.

**ANEXO 4 - PROTOCOLO:** Reação da transcriptase reversa PCR (RT-PCR).

*High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems)*

<b>Reagentes</b>	<b>1 reação (µl)</b>
RT Buffer (2x)	10
Enzyme Mix (20x)	1
RNA (1 µg)	-
Nuclease H <sub>2</sub> O	-
Total	20

1. Mantenha os componentes do kit no gelo;
2. Faça as alíquotas do mix para reação de RT em placas ou tubos;
3. Sele as placas ou os tubos com selos ou tampas apropriadas;
4. Centrifugue brevemente as placas ou tubos para eliminar bolhas de ar.
5. Mantenha as placas ou os tubos no gelo até o início da reação;
6. Incube os reagentes a 37°C por 60min, aqueça a 95°C por 5min e mantenha a 4°C. Podendo ser feita em termocicladores.
7. O cDNA está pronto para o uso em aplicações de PCR em tempo real. Estocar em freezer -15° a -25°C.

Termociclagem da reação de RT-PCR.

<b>Temperatura dos ciclos</b>	<b>Duração</b>
37° C	60'
95° C	5'
4° C	∞

