

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

MARIANA FERREIRA BIZZI

**EXPRESSÃO DE AMP-PROTEÍNA QUINASE ATIVADA
(pAMPK) EM CÉLULAS SOMATOTRÓFICAS DE
ADENOMAS HIPOFISÁRIOS REMOVIDOS
CIRURGICAMENTE DE PACIENTES COM ACROMEGALIA**

Belo Horizonte

2021

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

MARIANA FERREIRA BIZZI

**EXPRESSÃO DE AMP-PROTEÍNA QUINASE ATIVADA
(pAMPK) EM CÉLULAS SOMATOTRÓFICAS DE
ADENOMAS HIPOFISÁRIOS REMOVIDOS
CIRURGICAMENTE DE PACIENTES COM ACROMEGALIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais
como parte dos requisitos para a obtenção do título de
Doutorado em Neurociências

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior

Belo Horizonte

2021

043

Bizzi, Mariana Ferreira.

Expressão de AMP-proteína quinase ativada (pAMPK) em adenomas hipofisários removidos cirurgicamente de pacientes com acromegalia [manuscrito] / Mariana Ferreira Bizzi. – 2021.

88 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Proteínas Quinases Ativadas por AMP. 3. Somatotrofos. 4. Acromegalia. 5. Metformina. I. Oliveira Júnior, Antônio Ribeiro de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ATA DE DEFESA DE TESE DA ALUNA

MARIANA FERREIRA BIZZI

Realizou-se, no dia 05 de abril de 2021, às 14:00 horas, Sala Virtual, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 84ª defesa de tese, intitulada *EXPRESSÃO DE AMP-PROTEÍNA QUINASE ATIVADA (pAMPK) EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS REMOVIDOS CIRURGICAMENTE DE PACIENTES COM ACROMEGALIA*, apresentada por MARIANA FERREIRA BIZZI, número de registro 2016707040, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Antônio Ribeiro de Oliveira Junior - Orientador (UFMG), Prof(a). Beatriz Santana Soares Rocha (UFMG), Prof(a). Sérgio Veloso Brant Pinheiro (UFMG), Prof(a). Aline Silva de Miranda (UFMG), Prof(a). Paulo Augusto Carvalho Miranda (UniBH), Prof(a). Julio Zaki Abucham Filho (UNIFESP).

A Comissão considerou a tese: Aprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 05 de abril de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Carlos Magno Machado Dias - Secretário(a)

Prof(a). Antônio Ribeiro de Oliveira Junior (Doutor)

Prof(a). Beatriz Santana Soares Rocha (Doutora)

Prof(a). Sérgio Veloso Brant Pinheiro (Doutor)

Prof(a). Aline Silva de Miranda (Doutora)

Prof(a). Paulo Augusto Carvalho Miranda (Doutor)

Prof(a). Julio Zaki Abucham Filho (Doutor)



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Augusto Carvalho Miranda, Usuário Externo**, em 05/04/2021, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Beatriz Santana Soares Rocha, Membro de comissão**, em 06/04/2021, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antônio Ribeiro de Oliveira Junior, Professor do Magistério Superior**, em 07/04/2021, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Veloso Brant Pinheiro, Professor do Magistério Superior**, em 08/04/2021, às 14:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Silva de Miranda, Servidor(a)**, em 11/04/2021, às 21:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Julio Zaki Abucham Filho, Usuário Externo**, em 12/04/2021, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0638465** e o código CRC **C29D34F5**.

Reitora: Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-reitores de pós-graduação: Professor Fábio Alves da Silva Júnior e Professora
Sílvia Helena Paixão Alencar

Diretor do Instituto de Ciências Biológicas: Professor Carlos Augusto Rosa

Coordenador do curso de pós-graduação em Neurociências: Professor Hani Camille
Yehia

Local de realização: Laboratório de Pesquisa em Endocrinologia – Faculdade de
Medicina - UFMG

Orientador: Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior

Agências financiadoras: FAPEMIG, CNPq

AGRADECIMENTOS

Nunca acreditei que a vida fosse fácil e talvez por esse motivo não tenha reclamado de nada que passei porque acredito que tudo que passamos na vida é um aprendizado e nos fortalece.

Não poderia deixar de agradecer à minha mãe Marta, que me mostrou toda a força de uma mulher que se negou a desistir da vida quando se divorciou, lutou para criar seus filhos e mesmo com um diagnóstico de câncer nunca se entregou e hoje está curada.

Agradeço também à oportunidade que tive de estudar no Coltec, instituição que proporcionou a base para trilhar meu caminho e um estágio no laboratório do Hospital das Clínicas. Nesse estágio conheci muitas pessoas, mas especialmente o Walter, responsável por me apresentar a oportunidade de começar a trabalhar no laboratório de pesquisa em Endocrinologia do Professor Antônio Ribeiro de Oliveira Jr. Em 2008, quando comecei as minhas atividades de pesquisa dentro de uma universidade e a me apaixonar por esse trabalho, nem nos meus melhores e mais otimistas sonhos poderia imaginar que hoje estaria escrevendo os agradecimentos da minha tese de doutorado.

Dizer obrigada a você Toninho seria muito pouco. Sem o seu exemplo de ética e perseverança como pesquisador e profissional não teria a visão de pesquisa e de endocrinologia que tenho hoje. Para mim, você é mais que um orientador, é um amigo! Sua confiança ao me aceitar como aluna de mestrado e posteriormente de doutorado foi extremamente importante para que eu, que muitas vezes desconfiei da minha capacidade de desenvolvê-los, aumentasse minha autoestima e entendesse que, com perseverança e dedicação, podemos alcançar tudo que queremos. A você, o meu eterno agradecimento e admiração!

Agradeço ao Professor Sérgio Pinheiro por todo o ensinamento técnico e paciência na padronização dos anticorpos e leitura das imagens.

Ao Professor Eduardo Paulino, minha eterna gratidão pois sem a sua disponibilidade em ajudar, esse trabalho não seria possível, uma vez que não tínhamos amostras de hipófises normais.

À minha Tia Ana, ao meu Tio Fernando e ao meu irmão Gabriel agradeço o incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Não poderia me esquecer de agradecer à minha amiga e companheira de laboratório Júnia, que sempre esteve disponível para ensinar, discutir dados, procurar blocos de biópsia na anatomia patológica e fazer revisão de prontuário.

Às Professoras Juliana e Beatriz, a minha gratidão por todo o companheirismo e ajuda nas discussões para o desenvolvimento dessa tese.

E para finalizar, agradeço à Deus por ter colocado na minha vida o Thiago e minha filha Beatriz, seres abençoados com os quais aprendo e me torno um ser humano melhor a cada dia. AMO MUITO VOCÊS!!

RESUMO

Introdução: O AMPK (AMP-proteína quinase ativada) é uma enzima que atua como sensor metabólico sensível à alteração na relação ATP/AMP e encontra-se relacionado à modulação da proliferação celular. O objetivo principal desse trabalho foi estudar a expressão de pAMPK em células somatotróficas tumorais de pacientes portadores do diagnóstico de acromegalia submetidos à cirurgia transesfenoidal. Avaliamos também a expressão de pAMPK em células somatotróficas tumorais de pacientes com acromegalia com mutação do gene AIP e GNAS, além da correlação entre a expressão de pAMPK e os seguintes parâmetros clínicos: sexo; índice de massa corporal (IMC); padrão de expressão de citoqueratina (CAM5.2); uso de metformina antes da cirurgia; níveis de GH pré cirurgia e a necessidade do uso de terapia medicamentosa (análogo de somatostatina ou cabergolina) após a cirurgia. **Métodos:** Foram incluídos no estudo para avaliação da expressão de pAMPK por imunofluorescência, biópsias de pacientes com diagnóstico de acromegalia e submetidos à cirurgia para retirada do adenoma (n=16), hipófises normais sem alteração estrutural ou endócrina (n=5) e adenomas secretores de hormônio do crescimento (GH) com mutação AIP (Q164X, R304*, R304Q, E222* e F269_H275dup). As biópsias de pacientes com diagnóstico de acromegalia também foram submetidas ao estudo para determinação da presença de mutação GNAS. **Resultados:** A expressão de pAMPK foi significativamente maior nas amostras de pacientes com acromegalia em comparação às amostras hipófises normais ($p < 0.0001$). Os parâmetros clínicos dos pacientes com acromegalia: sexo, IMC, padrão de expressão de citoqueratina CAM5.2, uso de metformina antes da cirurgia, níveis de GH pré cirurgia e necessidade de terapia medicamentosa (análogo de somatostatina ou cabergolina) após a cirurgia não apresentaram correlação estatística com a expressão de pAMPK nas células somatotróficas dos adenomas de pacientes com acromegalia na amostra avaliada. A

mutação GNAS foi observada em apenas um paciente, cuja amostra apresentou expressão de pAMPK semelhante aos pacientes com acromegalia sem mutação GNAS. As amostras das mutações de AIP R304*, Q164X, e F269_H275dup apresentaram expressão de pAMPK iguais aos adenomas sem mutação desse gene. Já referente às mutações E222* e R304Q, a expressão de pAMPK apresentava-se significativamente aumentada em relação aos adenomas sem mutação neste gene ($p < 0.0001$). **Conclusão:** Nossos dados mostram um aumento da expressão de pAMPK em somatotropinomas esporádicos, independente do uso pré-operatório de metformina.

Palavras-Chave: acromegalia, expressão de pAMPK, metformina, GNAS, mutação do AIP.

ABSTRACT

Introduction: AMPK (AMP-activated protein kinase) is an enzyme that acts as a metabolic sensor by changing the ATP / AMP ratio and is related to the modulation of cell proliferation. The aim of this work was to study the expression of pAMPK in sporadic growth hormone-secreting pituitary adenomas (GH). We also evaluated the expression of pAMPK in tumor somatotrophic cells of patients with acromegaly with mutation of the AIP and GNAS gene, in addition to the correlation between the expression of pAMPK and the following clinical parameters: sex; body mass index (BMI); cytokeratin expression pattern (CAM5.2); use of metformin before surgery; preoperative GH levels and the need to use drug therapy (somatostatin analogue or cabergoline) after surgery.

Methods: We included to the study, biopsies of patients diagnosed with acromegaly and who underwent surgery to remove the adenoma (n = 16), normal pituitary glands without structural or endocrine alteration (n = 5) and growth hormone -secreting adenomas with AIP mutation (Q164X, R304 *, R304Q, E222 * and F269_H275dup). The biopsies of patients diagnosed with acromegaly were also submitted to the study to determine the presence of the GNAS mutation. **Results:** Expression of pAMPK was significantly higher in patients with acromegaly compared to normal pituitary glands (p <0.0001). The clinical parameters of patients with acromegaly: gender, BMI, expression pattern of cytokeratin CAM5.2, use of metformin before surgery, GH levels before surgery and need for drug therapy (somatostatin analogue or cabergoline) after surgery did not show statistical correlation with the expression of pAMPK in the somatotrophic cells of the adenomas of patients with acromegaly in the evaluated sample. The GNAS mutation was observed in only one patient, who showed pAMPK expression similar to patients with acromegaly without this mutation. The AIP R304 *, Q164X, and F269_H275dup mutations showed pAMPK expression equal to adenomas without mutation of this gene. Mutations E222 *

and R304Q, on the other hand, showed significantly increased pAMPK expression in comparison to adenomas without mutation in this gene ($p < 0.0001$). **Conclusion:** Our data show an increase in the expression of pAMPK in sporadic somatotropinomas, regardless of the preoperative use of metformin.

Keywords: acromegaly, pAMPK expression, metformin, GNAS, AIP mutation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	23
Figura 2	26
Figura 3	29
Figura 4	31
Figura 5	41
Figura 6	47
Figura 7	48
Figura 8	53
Figura 9	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mutações associadas à acromegalia / gigantismo, prevalência e aspectos clínicos	21
Tabela 2: Dados clínicos dos pacientes com acromegalia submetidos à cirurgia para retirada do adenoma avaliados no estudo	50
Tabela 3: Coeficiente de correlação e valor de p entre os dados clínicos dos pacientes com acromegalia submetidos à cirurgia para retirada do adenoma e a expressão de AMPK. 51	

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACC – Acetil CoA carboxilase
- ACNF – Adenoma clinicamente não funcionante
- ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
- AhR – Receptor aril hidrocarbono
- AIP – Proteína de interação com receptor aril hidrocarbono
- AKT / PKB – Proteína quinase B
- AMP – Adenosina monofosfato
- AMPK – AMP-proteína quinase ativada
- ATP – Adenosina trifosfato
- AVP – Arginina vasopressina
- BAX – Proteína X associada a Bcl-2
- Bcl-2 – *B cell lymphoma protein 2*
- CaMKK – Proteína quinase cálcio/calmodulina dependente
- cAMP – Segundo mensageiro AMP cíclico
- CDKN1B – Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B
- EF2 – Fator de alongamento eucariótico 2
- ERK – Quinase regulada por sinal extracelular
- FIPA – Adenomas hipofisários familiares isolados
- FSH – Hormônio folículo estimulante
- GH – Hormônio do crescimento
- GHRH – Hormônio liberador de hormônio do crescimento
- GNAS – *Guanine nucleotide-binding alpha-subunit*
- GPCR – Receptor acoplado à proteína G
- G α – Subunidade alfa da proteína G

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IMC – Índice de massa corporal

LH – Hormônio luteinizante

LKB1 – Cinase hepática B1 ou serina/treonina quinase

mTOR – Receptor da rapamicina em mamíferos

NEM – Neoplasias endócrinas múltiplas

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

pAMPK – AMP - Proteína quinase ativada fosforilada

PDE – Fosfodiesterase

PI3K – Fosfatidil inositol 3 quinase

PKA – Proteína Quinase A

PRKAR1A – Subunidade reguladora de proteína quinase tipo I-alfa dependente de cAMP

PRL – Prolactina

RPS6 – Proteína ribossômica S6

SDHx – Succinato desidrogenase (A, B, C ou D)

SIRT6 – Sirtuin 6

SRL – Ligantes dos receptores de somatostatina

SS-14 – Somatostatina 14

TAK1 – Proteína quinase 7 ativada por mitogênio

TKR – Receptor tirosina quinase

TSC – Complexo esclerose tuberosa

TOTG – Teste oral de tolerância à glicose

TSC1 – Hamartina

TSC2 – Tuberina

TSH – Hormônio tireo-estimulante

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 A Glândula Hipófise	19
2.2 Tumores Hipofisários.....	19
2.3 Acromegalia	21
2.3.1 Gene AIP.....	26
2.3.2 Novos marcadores imunohistoquímicos na Acromegalia	28
2.4 A Via do AMP cíclico – cAMP – na hipófise normal e em adenomas hipofisários	28
2.5 AMP proteína quinase (AMPK).....	31
2.6 Via de sinalização do AMPK e o eixo somatotrófico	34
2.7 AMPK em adenomas hipofisários.....	36
3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	40
4. OBJETIVOS.....	41
4.1 Objetivo Primário	41
4.2 Objetivos secundários.....	41
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
5.1 Considerações éticas	42
5.2 Participantes	42
5.2.1 Critérios de inclusão	42
5.2.2 Critérios de exclusão.....	42
5.3 Amostras hipofisárias	43
5.4 Análise de prontuários.....	44
5.5 Imunohistoquímica para determinação do padrão de citoqueratina - CAM5.2.....	44
5.6 Identificação de mutação da subunidade alfa da proteína G – GNAS.....	46
5.7 Imunofluorescência para marcação de AMPK ativada – pAMPK.....	47
5.8 Análise das Imagens	48

5.9 Análise Estatística	49
6. RESULTADOS	50
6.1 Expressão de pAMPK nos adenomas hipofisários de pacientes com acromegalia em comparação à hipófise normal	50
6.2 Expressão de pAMPK nos adenomas hipofisários de pacientes com acromegalia quanto ao padrão de expressão de CAM5.2	51
6.3 Dados clínicos dos pacientes com acromegalia incluídos no estudo	51
6.4 Correlação entre a expressão de pAMPK no adenoma hipofisário de pacientes com acromegalia versus parâmetros clínicos	54
6.5 Análise da interferência do uso de metformina na expressão de pAMPK nos adenomas hipofisários de pacientes com acromegalia	54
6.6 Expressão de pAMPK nos adenomas hipofisários de pacientes com acromegalia quanto à mutação GNAS	55
6.7 Expressão de pAMPK nos adenomas hipofisários secretores de GH com mutação do AIP	58
7. DISCUSSÃO	61
8. LIMITAÇÕES	67
9. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO I : Carta de Aprovação do Comitê de Ética.....	82
ANEXO II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	84
ANEXO III: Média de fluorescência de cada amostra.....	86
ANEXO IV: Publicações	87

1. INTRODUÇÃO

A acromegalia é uma doença crônica decorrente da produção excessiva de GH / IGF-1 e possui prevalência de 10 a 20% dentre os tumores hipofisários. Na maioria dos casos são adenomas benignos e ocorrem de forma esporádica e isolada, mas também podem estar associados à síndromes familiares tais como neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (NEM-1); mutações no gene supressor de tumor AIP (Proteína de interação com receptor aril hidrocarbono), FIPA (familiar isolated pituitary adenomas); síndrome de McCune-Albright, GPR101 (receptor acoplado à proteína G 101) e mutação GNAS (gene que codifica a porção α da proteína G) (1).

O AMPK é uma enzima responsável pela regulação da homeostase energética celular em todas as células eucarióticas. Sua ativação ocorre mediante redução da concentração de adenosina trifosfato (ATP) e conseqüente elevação da concentração de adenosina monofosfato (AMP). Sabe-se que em tumores malignos a ativação de AMPK é diminuída e que essa diminuição é prejudicial, uma vez que a ativação de AMPK atuaria nesses tumores a fim de limitar a síntese de ácido graxo e colesterol, que estão aumentadas em neoplasias malignas (2). Porém, em tumores benignos, ainda não existem dados concretos sobre a ativação de AMPK, apesar de um estudo relatar o aumento de ativação de AMPK em adenomas de colón benignos quando comparados ao câncer colorretal (3). Já em culturas celulares de hipófise, a eficácia de medicamentos ativadores de AMPK na diminuição da proliferação celular e produção hormonal de células hipofisárias é bem descrita (4-6).

Dessa forma, avaliar a expressão de AMPK ativada (pAMPK) em amostras de pacientes com acromegalia, bem como em amostras de hipófise humana normal mostra-se relevante para o melhor entendimento da expressão de pAMPK nesses adenomas

hipofisários e pode fornecer dados importantes para o melhor conhecimento e entendimento da tumorigênese hipofisária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Glândula Hipófise

A hipófise é considerada uma glândula de extrema importância por estar envolvida no controle de diversos processos do corpo humano, tais como: crescimento, desenvolvimento e reprodução do indivíduo, equilíbrio metabólico, entre outras funções. Essa glândula está localizada no osso esfenóide, mais precisamente na sela túrcica e é dividida em: adenohipófise – responsável pela produção e secreção de seis diferentes hormônios: hormônio de crescimento – GH (células hipofisárias do tipo somatotrófica), tireo-estimulante – TSH (tireotrófica), adrenocorticotrófico – ACTH (corticotrófica), prolactina – PRL (lactotrófica), luteinizante – LH e folículo estimulante – FSH (gonadotrófica); e neurohipófise - que não produz hormônios mas é responsável por armazenar e secretar oxitocina e arginina- vasopressina – AVP, hormônios esses sintetizados no hipotálamo (7).

A adenohipófise é constituída majoritariamente por células somatotróficas - 35 a 45%, que estão localizadas predominantemente nas asas laterais da hipófise anterior. As demais células da hipófise anterior são compostas por: 15 – 20% de células lactotróficas, cerca de 20% de células corticotróficas, em torno de 10 – 15% de células gonadotróficas e aproximadamente 5% de células tireotróficas (8).

2.2 Tumores Hipofisários

Os tumores hipofisários, em sua maioria, apresentam ocorrência esporádica. Em geral, são considerados raros e benignos, porém podem causar efeitos patológicos e sistêmicos devido à hipersecreção hormonal ou pelos efeitos de massa do tumor. A compressão mecânica de estruturas cranianas (lobo frontal inferior, assoalho do terceiro ventrículo, quiasma óptico e haste hipofisária) ocasionada pelo volume e direção de

crescimento do tumor podem causar danos temporários ou permanentes nessas estruturas e até mesmo comprometer suas funções (9-12). Além disso, quando tratam-se de tumores funcionantes, observa-se hipersecreção hormonal (13-15). Além dos danos físicos, podemos identificar também deficiências cognitivas (funções executivas e de memória) associadas aos adenomas hipofisários (16, 17).

Há também os tumores hipofisários familiares que são considerados ainda mais raros que os adenomas esporádicos e podem ocorrer associados à algumas síndromes envolvendo outras glândulas endócrinas, tais como neoplasias endócrinas múltiplas (NEM), complexo de Carney, síndrome de McCune-Albright, acrogigantismo ligado ao cromossomo X, 3PAs (adenoma hipofisário, feocromocitoma, paraganglioma), DICER1 e síndrome pleuropulmonar e Esclerose Tuberosa (TSC) (1, 18).

Os adenomas hipofisários são classificados conforme o hormônio secretado em excesso: adenomas secretores de GH (somatotropinomas), adenomas secretores de PRL (prolactinomas), adenomas secretores de ACTH (corticotropinomas), adenomas secretores de TSH (tireotropinomas), adenomas secretores de gonadotropinas (gonadotropinomas, LH ou FSH) e adenomas co-secretores (secretam mais de um hormônio). Há ainda os adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes (ACNFs), que são assim chamados por não apresentarem sintomas clínicos de hipersecreção hormonal. Porém, assim como nos adenomas que apresentam hipersecreção hormonal, a massa tumoral poder afetar outras estruturas ocasionando perda visual, cefaléia, compressão e danos ao tecido hipofisário normal. Podemos classificar os adenomas hipofisários quanto ao seu tamanho: microadenomas (< 1 cm) e macroadenomas (> 1 cm). A idade média de diagnóstico destes tumores é de 30-40 anos para tumores esporádicos mas, para pacientes que possuem herança familiar, esse diagnóstico tende a ser feito mais precocemente, abaixo dos 30 anos (19).

A prevalência geral dos tumores hipofisários sintomáticos é cerca de 1/1.000 (19), sendo que os prolactinomas são os os adenomas com maior prevalência (40 a 50%), seguidos pelos ACNFs (35%), somatotropinomas (acromegalia – 10 a 20%) e corticotropinomas (5 a 10%). Já os gonadotropinomas / tireotropinomas são considerados raros (20-22).

2.3 Acromegalia

A acromegalia, uma doença crônica decorrente da produção excessiva de GH e fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1) é, em 98% dos casos, decorrente de um adenoma hipofisário hipersecretor de GH, e em casos mais raros pode ser determinada pela hipersecreção eutópica ou ectópica do hormônio liberador do GH – GHRH – ou devido à secreção ectópica de GH (23). Dentre os tumores hipofisários que apresentam hipersecreção hormonal, adenoma hipersecretor de GH é o segundo mais prevalente (estimado em 125 – 295 casos por milhão), com incidência aproximada de 5 casos / milhão de população por ano (24, 25). Pode ser diagnosticada em qualquer idade, embora a maioria dos diagnósticos ocorram entre 40 – 50 anos (26, 27) e, mesmo em países desenvolvidos, o diagnóstico ainda apresenta atraso de 5 a 10 anos após o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas da acromegalia (28, 29). Estudos recentes sugerem que a acromegalia afeta mais as mulheres do que os homens (30).

A doença é caracterizada por sinais e sintomas decorrentes da exposição prolongada ao excesso de GH e/ou IGF-1 e, no caso de macroadenomas, de seu efeito compressivo em estruturas vizinhas. A hipersecreção do GH é responsável por inúmeras manifestações clínicas do paciente, tais como: alterações crânio-faciais, crescimento dos pés/mãos, hiperidrose, síndrome do túnel do carpo, artralgia, macroglossia, macrognatia, entre outras. Também há maior prevalência de doenças cardiovasculares associadas à

hipertrofia do ventrículo esquerdo e aterosclerose (31, 32), bem como presença de “acantosis nigricans” e efeitos anti-insulínicos do GH (33). Nos pacientes com acromegalia também são descritas alterações do metabolismo ósseo, tais como: hipercalcemia, hipercalciúria, hiperfosfatemia e maior risco de fratura, mesmo em casos cuja densitometria mineral óssea apresenta-se normal (34, 35).

Quanto à massa tumoral, dependendo do volume, localização e agressividade tumoral, o paciente pode manifestar cefaleia, alterações visuais, sinais e sintomas decorrentes de hipopituitarismo e de hiperprolactinemia não tumoral, e raramente pode afetar os pares de nervos cranianos III, IV e V, (26).

A confirmação do diagnóstico de acromegalia, a partir de uma suspeita clínica com base nos sintomas citados anteriormente, é realizada através de dosagens sanguíneas de GH e IGF-1. Nadir de GH após teste oral de tolerância à glicose (TOTG) 2 horas após ingestão de 75 gramas de dextrosol superiores à 0,4 ng/mL (particularmente ao se utilizar ensaios imunométricos mais sensíveis), juntamente à IGF-1 aumentado para a idade e sexo, confirmam o diagnóstico (36). Para casos nos quais haja discrepância entre GH e IGF-1, sugere-se a preferência pelo IGF-1 por ser mais confiável (37-39). Após a confirmação do diagnóstico laboratorial, a ressonância magnética da sela túrcica antes e após contraste com gadolínio é o exame de imagem de escolha para confirmação do tumor e caracterização quanto à localização e ao tamanho. Como o diagnóstico geralmente é tardio, na maioria das vezes a imagem é compatível com um macroadenoma (> 1cm), normalmente hipointenso em T1 e com realce pelo contraste menor ou mais tardio que o tecido hipofisário normal (40).

O tratamento padrão ouro para a acromegalia é cirúrgico, realizado geralmente pela via transesfenoidal, com o objetivo de retirar o adenoma hipofisário e preservar ao máximo o tecido normal da glândula. Porém, nos casos em que não há cura cirúrgica

(aproximadamente 50%) ou para os pacientes com contraindicação cirúrgica, opta-se pelo tratamento medicamentoso e, em casos específicos, a radioterapia (36, 41).

O tratamento medicamentoso de primeira escolha são os ligantes dos receptores de somatostatina (SRL) de primeira geração, tais como o lanreotide e o octreotide, capazes de reduzir a secreção de GH e conseqüentemente a de IGF-1, também podem reduzir o tamanho tumoral em micro e macroadenomas (36, 41). Porém, para os pacientes não responsivos aos SRLs de primeira geração, outras opções são o SRL de segunda geração (pasireotide) e o antagonista de receptor de GH (pegvisomanto). Para o caso de pacientes cuja combinação medicamentosa seja necessária, as seguintes opções devem ser consideradas: SRL de primeira geração em baixa dose (octreotida ou lanreotida) mais pegvisomanto semanal (42); ou a combinação de pasireotide e pegvisomanto que mostrou ser eficaz em melhorar o controle bioquímico em cerca de 70% dos pacientes, mesmo com baixa dose de pegvisomanto, apesar da adição de pegvisomanto ao tratamento não melhorar a hiperglicemia induzida pelo pasireotide (42). Outra opção de medicamento é a cabergolina, um agonista dopaminérgico com efeito relativamente modesto para o controle bioquímico e cuja escolha geralmente é restrita a pacientes com leves alterações de GH / IGF-1 no pós operatório (43). Seu uso pode ser útil como terapia complementar para pacientes nos quais não se alcançou o controle bioquímico com doses elevadas de SRL ou pegvisomanto (43).

Uma nova opção de tratamento, aprovada recentemente nos Estados Unidos, é a octreotida oral. Seu uso é recomendado principalmente para pacientes que demonstraram resposta bioquímica, completa ou parcial, à octreotida ou lanreotida injetáveis (42). Seu uso não é recomendado para pacientes com histórico de resistência à octreotida injetável e ainda não existem dados suficientes sobre o uso de octreotida oral como terapia primária em pacientes virgens de tratamento para acromegalia (42).

Para casos de tumores mais agressivos e sem resposta satisfatória à cirurgia e medicamentos, a radioterapia é uma opção terapêutica a ser considerada. Para a escolha desse tratamento, deve-se ponderar se sua eficácia no controle do crescimento tumoral (90% dos casos) e contribuição para o controle bioquímico da doença (cerca de 60% dos casos) é superada por seus efeitos colaterais a longo prazo: hipopituitarismo, doença cerebrovascular e malignidades (44, 45).

A acromegalia é associada ao maior risco de muitas comorbidades, tais como: doenças cardiovasculares e metabólicas, neoplasias, doenças respiratórias e, por isso, deve ser controlada. Porém, a redução dos níveis de GH circulantes para valores inferiores a 1 ng/dL e a normalização do IGF-1 para a idade são capazes de reduzir a taxa de mortalidade desses pacientes, tornando-as comparáveis às da população normal (32, 46). Sendo assim, um diagnóstico precoce e tratamento adequado da acromegalia são fatores capazes de diminuir a morbi-mortalidade destes pacientes.

Dentre as mutações gênicas associadas à acromegalia/gigantismo, a mutação GNAS (gene que codifica a porção α da proteína G) é a mais comum, com prevalência de 40% na acromegalia (47). Já a mutação do gene supressor de tumor AIP possui prevalência de 50% em FIPAs e 4% nos casos de acromegalia esporádicos, enquanto a mutação GPR101 0 a 4.4% em casos de acrogigantismo (47). Nesses casos, a acromegalia geralmente acomete indivíduos mais jovens e os tumores tendem a ser mais agressivos (47). (Tabela 1)

Tabela 1 – Mutações associadas à acromegalia / gigantismo, prevalência e aspectos clínicos. Adaptado de (47)

GENE OU ALTERAÇÃO GENÉTICA	LOCALIZAÇÃO	PREVALÊNCIA NA ACROMEGALIA	ASPECTOS CLÍNICOS
AIP	11q13.3	50% entre FIPAs 4% na acromegalia esporádica	Afeta pacientes mais jovens; tumores mais invasivos, pior resposta aos SRLs
NEM1	11q13.1	1,2%	Hiperparatireoidismo, adenomas hipofisários; tumor neuroendócrino pancreático (NEM1)
CDKN1B	12p13.1	Raro	Hiperparatireoidismo, adenomas hipofisários; tumor neuroendócrino pancreático (NEM4)
PRKAR1A	17q22-24	65% complexo de Carney	Acromegalia; mixomas cardíacos e cutâneos; PPNAD, lesões pigmentadas de pele e mucosa
SDHX	SDHA 5p15.33 SDHB 1p36.13 SDHC 1q23.3 SDHD 11q23.1	Raro	Acromegalia, paragangliomas, feocromocitoma (síndrome 3PAs)
GPR101	Xq26.3	0 a 4,4%	Acrogigantismo ligado ao X; gigantismo de início precoce
GNAS	20q13.3	40%	Acromegalia esporádica; síndrome de McCune-Albright

Legenda – AIP: proteína de interação com receptor aril hidrocarbono; FIPA (adenomas hipofisários familiares isolados); NEM-1: neoplasia endócrina múltipla tipo 1; CDKN1B: inibidor de quinase dependente de ciclina 1B; PRKAR1A: subunidade reguladora de proteína quinase tipo I-alfa dependente de cAMP; PPNAD: doença nodular pigmentada primária da adrenal; SDHx: genes da família succinato desidrogenase (A, B, C ou D); GPR101 (receptor acoplado à proteína G 101); GNAS: gene que codifica a porção α da proteína G.

2.3.1 Gene AIP

O gene AIP está inserido na lista de genes conhecidos e amplamente estudados na tentativa de elucidar a tumorigênese endócrina, principalmente por sua capacidade de interação específica com a fosfodiesterase 4A5 (PDE4A5) – proteína envolvida na via de sinalização do AMP cíclico (cAMP) (48) – e a descrição de que o AIP com mutação perde sua capacidade de interagir com PDE4A5 por possivelmente interferir na cascata intracelular de cAMP (49).

Atualmente, mais de 40 mutações diferentes de AIP já foram identificadas em pacientes com tumores hipofisários familiares isolados e temos também um número de amostras dessas mutações do AIP que perderam sua função se comparadas à proteína nativa (50, 51). Existem diferentes tipos de mutação do gene AIP descritas (Figura 1), são elas: *Missense* – essa mutação causa uma mudança em um par de bases, a qual resulta na alteração de um aminoácido e conseqüentemente na sequência proteica do AIP; *Nonsense* – nessa mutação é observada a inserção de um códon de parada, fazendo com que a proteína AIP seja muito mais curta do que deveria ser. Isto provoca um efeito importante sobre a função da proteína AIP; *Deleções/Inserções* – um ou mais códons inteiros são excluídos/inseridos, resultando assim na diminuição/aumento do comprimento da proteína AIP; *Mutações de leitura* – ocorre quando uma ou duas bases são excluídas/inseridos, fazendo com que toda a leitura do códon mude e, dessa forma, cada aminoácido seguinte à mutação; *Promoter* – mutação na região promotora que afeta a regulação do gene; *Grandes deleções* – nessa mutação grande segmento do gene é eliminado, o que resulta na proteína AIP sendo gravemente alterada; *Splice Site* – essa mutação afeta a montagem do gene e anomalias causadas por tal mutações no local de *splice* geralmente perturbam severamente a estrutura da proteína.

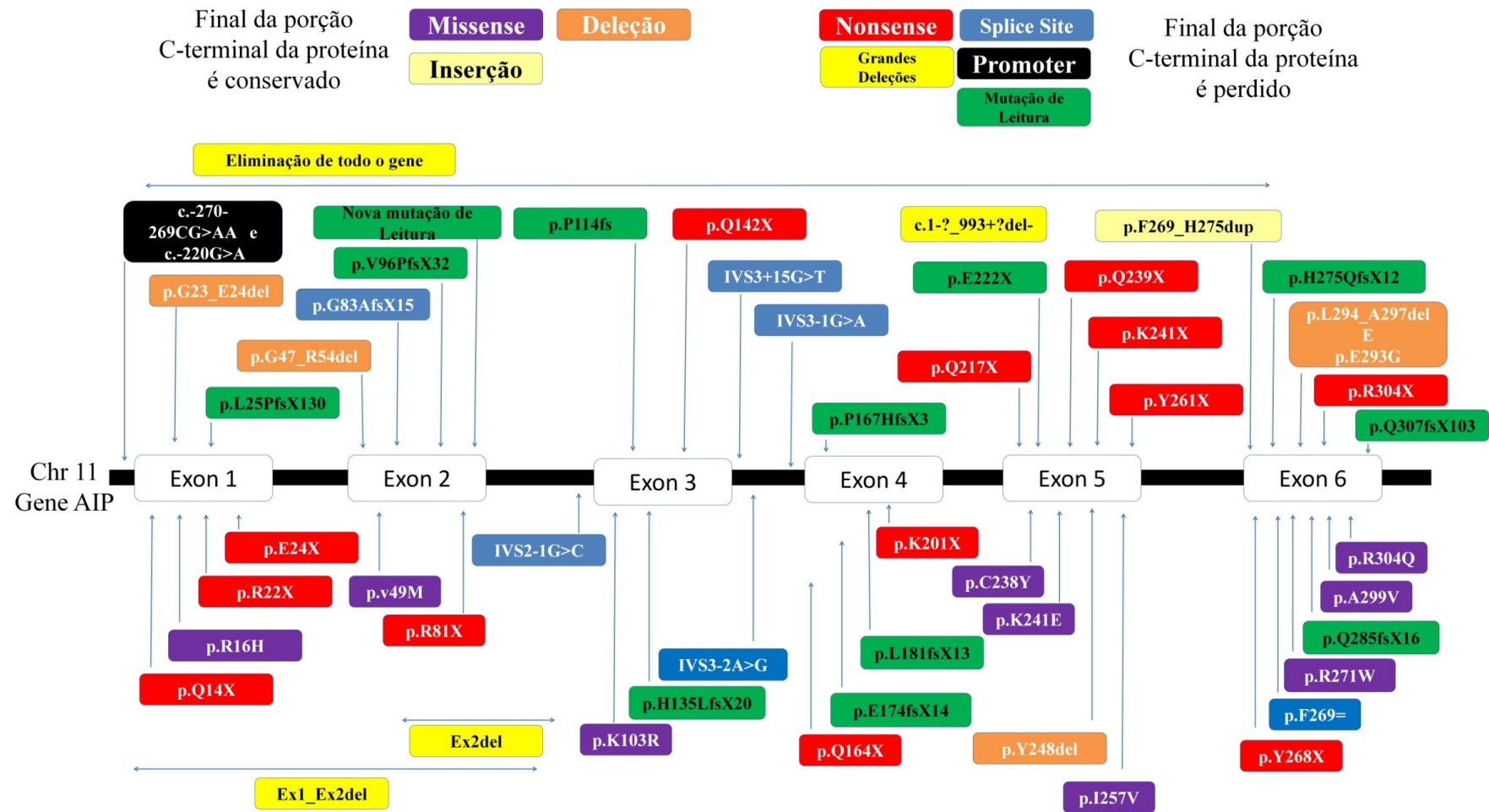


Figura 1 – Mutações da proteína de interação com receptor aril hidrocarbono (AIP) descritas na literatura. Adaptada de: <http://www.fipapatient.org/aip/>. Abreviaturas: Chr – cromossomo; AIP – proteína de interação com receptor aril hidrocarbono

2.3.2 Novos marcadores imunohistoquímicos na Acromegalia

Um marcador que vem sendo utilizado e pode até mesmo impactar na terapia médica é o CAM5.2. Esse marcador de citoqueratina permite a importante distinção entre o padrão densamente e esparsamente granulados no adenoma, já que a fisiopatologia destas lesões pode determinar sua resposta às terapias atuais que estão disponíveis: análogos da somatostatina versus antagonistas do GH e possivelmente agonistas da dopamina (52-54). O CAM5.2 também vem sendo descrito como marcador estrutural e funcional na acromegalia, visto que o padrão densamente granuloso é descrito como menos agressivo e com um desfecho clínico mais favorável (podendo ser micro ou macroadenoma) enquanto que o padrão esparsamente granuloso engloba macroadenomas mais agressivos e resultados terapêuticos mais difíceis ou até mesmo não alcançados (55).

2.4 A Via do AMP cíclico – cAMP – na hipófise normal e em adenomas hipofisários

Na hipófise, o mecanismo de transdução do sinal celular ocorre através da ligação do hormônio estimulante ao receptor acoplado à proteína G (GPCR) (56, 57). Após essa ligação, ocorre uma alteração conformacional nesse receptor de forma que a subunidade alfa da proteína G estimulatória (G_{α}) é liberada do complexo e liga-se a adenil-ciclase, responsável por catalisar a conversão de ATP no segundo mensageiro 3',5' monofosfato cíclico (cAMP). Essa molécula ativa uma cascata de outras enzimas, amplificando assim a reação celular (58).

O cAMP é o segundo mensageiro envolvido na regulação de diversas funções celulares relacionadas à fosforilação de proteínas através da ativação da Proteína quinase A (PKA) (56, 58). O aumento dos níveis intracelulares de cAMP ocasiona a dissociação da subunidade catalítica da subunidade reguladora da PKA. Quando ativada, essa proteína é capaz de fosforilar uma série de alvos que regulam enzimas efetoras, canais de íons e

ativa a transcrição de genes específicos que medeiam o crescimento e diferenciação celular. As fosfodiesterases (PDEs), por sua vez, regulam a via do cAMP através da hidrólise desse segundo mensageiro em sua forma inativa (5'-AMP), assegurando assim a adequada intensidade das ações dessa via (Figura 2A) (49). na hipófise, PDE1, PDE2, PDE4, e PDE11A são as fosfodiesterases mais expressas (49, 58, 59). No entanto, sabe-se que a família PDE4A possui importante papel fisiológico na interação com o gene AIP, gene supressor tumoral que pode estar mutado em grande parte dos casos de acromegalia familiar (60, 61).

Recentemente demonstramos o aumento da expressão intracelular de PDE4A4 e PDE4A8 em quatro diferentes subtipos de adenomas hipofisários esporádicos (secretores de GH, PRL, ACTH e ACNF FSH positivo) quando comparados às mesmas linhagens celulares na hipófise normal (62). Sendo assim, hipotetizamos que nesses adenomas o receptor acoplado à proteína G possa continuar sendo ativado pelo hormônio estimulador e, dentro da célula hipofisária neoplásica, possa ocorrer aumento da conversão de ATP em cAMP e consequente hiperativação da proteína quinase A. Dessa forma, ocorre a ativação da transcrição de genes especializados no crescimento e diferenciação celular, ocasionando um aumento da replicação celular adenomatosa. Como resposta compensatória, parece ocorrer o aumento de PDEs nos adenomas esporádicos na tentativa de inativar o excesso de cAMP (62) (Figura 2B).

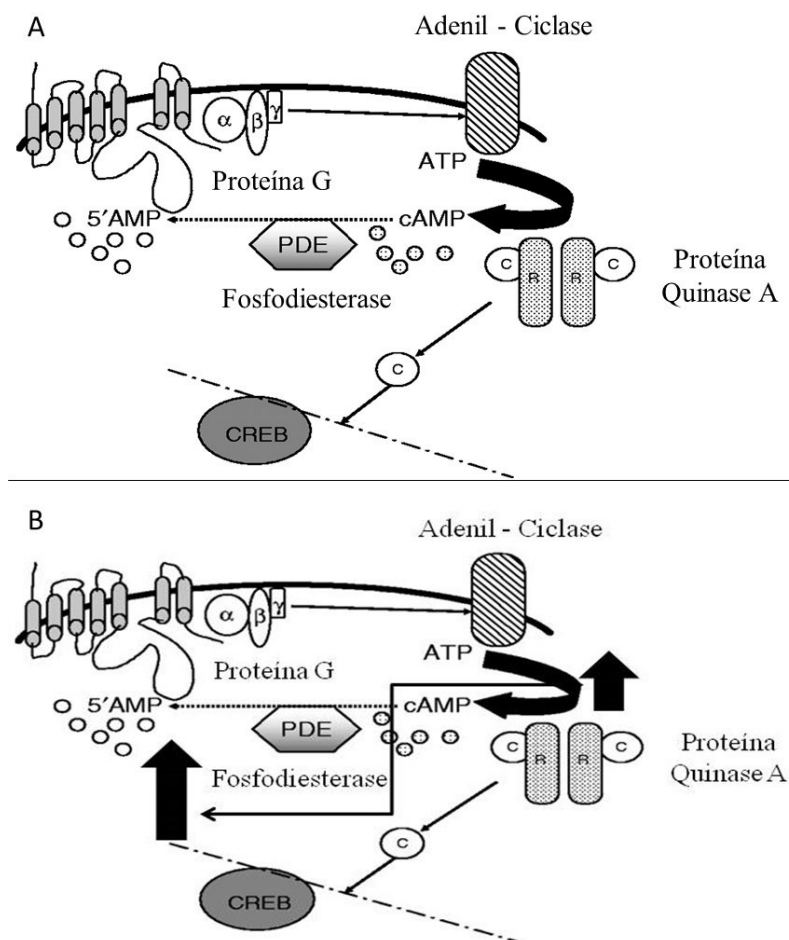


Figura 2 – O papel da fosfodiesterase na via do cAMP. Adaptado de (58). (A) Hipófise normal: ativação do receptor acoplado à proteína G por um hormônio estimulante (GHRH por exemplo), determina alteração conformacional do receptor na qual a subunidade G α se desprende do complexo e se liga à adenil-ciclase, que catalisa a conversão de ATP em cAMP. A aumento nos níveis de cAMP intracelular levam à dissociação da subunidade catalítica da subunidade regulatória da proteína quinase A. As PDEs são responsáveis pela regulação dessa via, uma vez que hidrolisam o cAMP para sua forma inativa, o 5'-AMP. (B) Adenomas hipofisários: o receptor acoplado à proteína G é ativado por um hormônio estimulante (GHRH por exemplo) e, dentro da célula hipofisária neoplásica, ocorreria aumento da conversão de ATP em cAMP e, conseqüentemente, hiperativação da proteína quinase A. Como resposta compensatória, ocorreria o aumento de PDEs nos adenomas esporádicos para tentar inativar o excesso de cAMP. Abreviaturas: CREB -

proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP; cAMP – adenosina monofosfato cíclico; 5'-AMP – 5' adenosina monofosfato.

O papel das fosfodiesterases na regulação dos níveis intracelulares de cAMP foi estudado em células da linhagem GH3, ou seja, células secretoras de GH e prolactina de ratos. Foi demonstrado que os níveis de cAMP e o grau de secreção de GH em células GH3 selvagens não foram alterados pela inibição geral de fosfodiesterases com IBMX ou pela inibição específica de PDE4 utilizando-se Rolipram (63).

Recentemente, outro estudo demonstrou elegantemente a interação entre as moléculas envolvidas na via de sinalização do cAMP supracitadas, ao avaliar o efeito da utilização do inibidor específico de PDE4, rolipram, em fígado e rim de camundongos (64). Nesse estudo, o uso do rolipram levou ao aumento da ativação de AMPK por aumentar a concentração de cAMP através da inibição da degradação de cAMP em AMP pelas fosfodiesterases (64). Através do aumento da fosforilação de AMPK e dos níveis de sirtuin 6 (SIRT6) no fígado e rim, além da redução da acetilação do fator nuclear kappa B (NF - κ B), houve redução da deposição adiposa e inflamação nos camundongos (64). Observou-se também nesse estudo que o aumento dos níveis de cAMP reduziram o excesso de deposição de gordura e melhoraram a distribuição adiposa nos camundongos pré-senis (64).

2.5 AMP proteína quinase (AMPK)

AMP-proteína quinase ativada (AMPK) é uma enzima que desempenha importante papel na regulação da homeostase energética celular em todas as células eucarióticas. Sua ativação ocorre mediante redução da concentração de ATP e consequente elevação da concentração de AMP (65). Portanto, a ativação do AMPK

acontece em resposta a uma variedade de estímulos associados a danos causados pelo estresse oxidativo, tais como: choque osmótico, hipóxia, e privação de glicose e outros nutrientes durante o jejum prolongado (66). Recentemente foi demonstrado por nosso grupo que o AMPK é estimulado pelo estresse de contenção e reduzido pela anestesia em ratos (67, 68).

Alguns hormônios como adiponectina e leptina, e estímulos fisiológicos como a contração muscular e exercícios físicos também podem ativar essa enzima (65). Assim, o AMPK é considerado o principal sensor do equilíbrio entre as concentrações de ATP e AMP (69), estando presente em todos os tecidos do corpo humano.

O aumento na relação AMP-ATP corresponde à uma redução do conteúdo energético da célula e favorece a ativação do AMPK (pAMPK). Uma vez ativado, seu efeito principal é inativar as vias metabólicas que consomem ATP, tais como as vias anabólicas da síntese de ácidos graxos e colesterol (Figura 3). De maneira inversa, o AMPK estimula as vias metabólicas que produzem ATP, como as vias catabólicas de oxidação de glicose e ácidos graxos (66). Como exemplo, podemos citar o glicogênio, um importante substrato para os músculos durante o exercício físico e para o fígado durante o jejum prolongado. Nessa via, o AMPK fosforila a enzima glicogênio sintase, causando a quebra do glicogênio, que aumenta a glicose no sangue e diminui a síntese de glicogênio (70). Quando os nutrientes não estão disponíveis, o que pode ocorrer durante o jejum prolongado, os lipídios passam a ser o substrato energético primário e o AMPK desempenha um papel importante na regulação desses substratos. O AMPK fosforila e inibe o Acetil-CoA carboxilase (ACC), uma enzima dependente de biotina que catalisa a carboxilação de acetil-CoA para produzir malonil-CoA através de duas enzimas catalíticas: biotina carboxilase e carboxiltransferase. A função mais importante do ACC

é gerar malonil-CoA, que é o substrato para a biossíntese de ácidos graxos e essa síntese é limitada pela ação do AMPK (71).

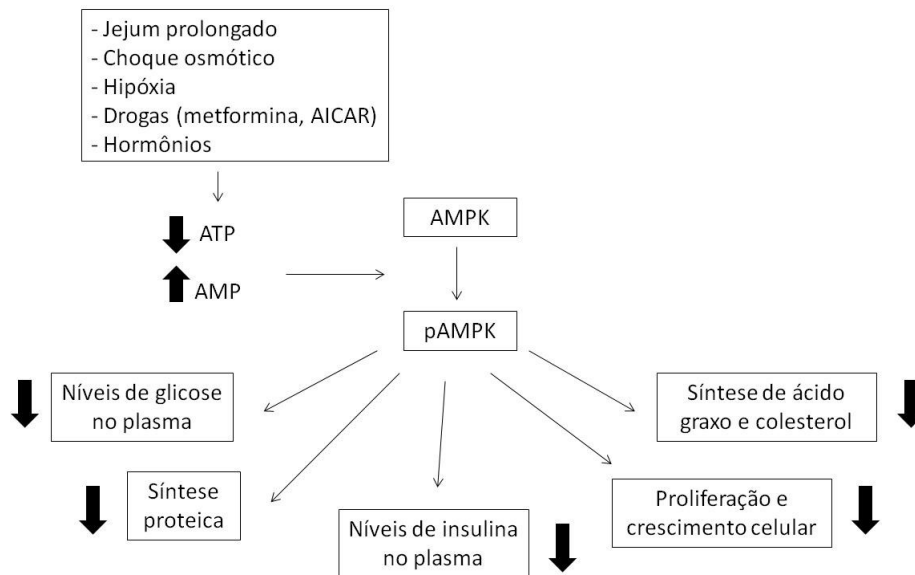


Figura 3 – Efeitos fisiológicos da ativação de AMPK mediante redução de ATP e aumento de AMP. Abreviaturas: AICAR: análogo de AMP capaz de estimular atividade de proteína quinase dependente de AMP; AMP: adenosina monofosfato; ATP: adenosina trifosfato; AMPK: AMP-proteína quinase ativada; pAMPK: AMP-proteína quinase ativada fosforilada;

A via do AMPK pode também ser ativada pela metformina, droga amplamente utilizada para o tratamento do diabetes tipo 2. A metformina inibe o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, o que reduz o ATP e conseqüentemente ativa o AMPK. Subseqüentemente, AMPK inibe o receptor da rapamicina em mamíferos (mTOR), (proteína responsável por controlar crescimento e metabolismo celular em resposta à alterações microambientais) levando à diminuição da síntese de proteínas e do crescimento celular (72).

A diminuição de AMPK é associada ao fenótipo maligno das células cancerosas, caracterizado por um aumento na produção de lipídios e aumento da síntese de proteínas e DNA, bem como proliferação e migração celulares. Alterações da via do AMPK estão associadas aos cânceres de mama e colorretal (2, 73-76) e parecem também estar envolvidas em diversos outros tipos de cânceres (77-79).

A metformina por sua vez, apresenta-se como potencial adjuvante no tratamento anticâncer uma vez que estudos em diferentes tipos de câncer mostram sua eficácia, ainda que limitada, na inibição do crescimento tumoral (4, 74, 78, 80-87). Quando ocorre a ativação do AMPK, o metabolismo energético das células cancerígenas é interrompido e a síntese de ácidos graxos é inibida, suprimindo assim o fenótipo de Warburg (glicólise aeróbica) mediado pela ação do fator induzível por hipóxia nas enzimas glicolíticas piruvato quinase e piruvato desidrogenase (88). Dentre os vários mecanismos de ação desse medicamento, podemos citar, além da ativação do AMPK, sua atuação através da redução da sinalização de insulina e IGF-1, sua capacidade de inibir o desenvolvimento tumoral e a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelo NF- κ B e a estimulação da resposta do sistema imunológico (células *natural killer* e células T) a células cancerígenas (88). É descrito que nas células cancerígenas a metformina tem efeitos diretos e mediados pelo AMPK. A metformina também é capaz de proteger contra danos ao DNA por inibição do complexo I e supressão da produção de espécies reativas ao oxigênio, entre outros (88).

2.6 Via de sinalização do AMPK e o eixo somatotrófico

A ligação de fatores de crescimento, tais como IGF-1 ou insulina, a receptores tirosina-quinase (TKRs) promove a ativação de vias de sinalização intracelular que regulam a síntese de proteínas e o crescimento celular (PI3K e ERK) - Figura 4. A

fosforilação de proteína quinase B (PKB/AKT) leva à ativação de mTOR, estimulando crescimento e proliferação celulares. O AMPK, por sua vez, exerce efeito inibitório sobre o crescimento celular e a síntese proteica, através da inibição de mTOR, por aumento da atividade do complexo TSC1-TSC2 (hamartina e tuberina, respectivamente) e da inibição do fator de alongamento 2 da tradução (EF2), respectivamente. O complexo PKB/AKT, por sua vez, pode fosforilar a unidade catalítica de AMPK em locais que não a treonina-172, antagonizando assim sua ativação desencadeada pela fosforilação da treonina-172.

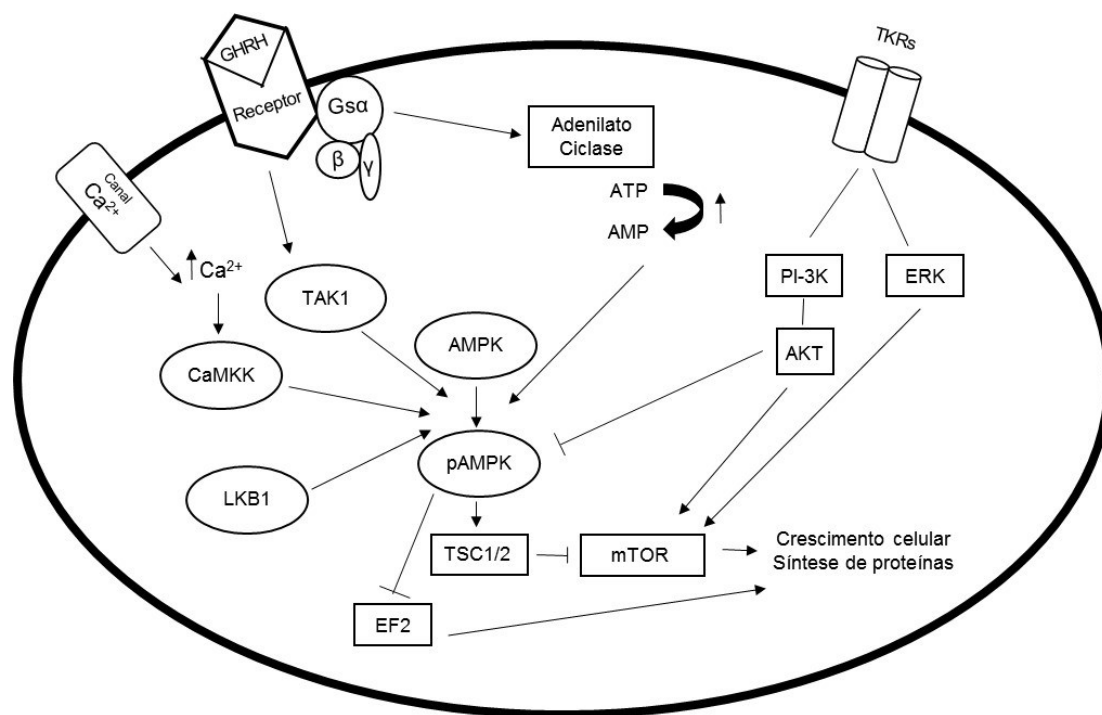


Figura 4 – Via de sinalização do AMPK na hipófise. Adaptado de (89). Abreviaturas: AKT – Proteína quinase B ou PKB; AMP – Adenosina monofosfato; AMPK – AMP-proteína quinase ativada; ATP – Adenosina trifosfato; Ca^{2+} - cálcio; CaMKK – Proteína quinase cálcio/calmodulina dependente; EF2 – Fator de alongamento eucariótico 2; ERK – Quinase regulada por sinal extracelular; GHRH – Hormônio liberador de hormônio do crescimento; LKB1 – Cinase hepática B1 ou serina/treonina quinase; mTOR – Receptor da rapamicina em mamíferos; pAMPK – Proteína ativada por AMP ativa; PI3K –

Fosfatidil inositol 3 quinase; TAK1 – Proteína quinase 7 ativada por mitogênio; TKR – Receptor tirosina quinase; TSC1 – Hamartina; TSC2 – Tuberina.

2.7 AMPK em adenomas hipofisários

Apesar de, na maioria dos casos, o adenoma hipofisário ser um tumor de característica benigna, a via do AMPK vem sendo investigada como um possível alvo terapêutico para o tratamento de somatotropinomas (4-6, 84), prolactinomas (85) e corticotropinomas (83), frente à observação da inibição do crescimento tumoral em culturas celulares.

Estudos *in vitro* evidenciaram que a atividade do AMPK participa da regulação funcional (homeostase) das células GH3 (6). O AICAR, substância química análoga ao AMP capaz de estimular a atividade de proteínas quinase dependentes de AMP, foi capaz de induzir clara e rapidamente a ativação *in vivo* de AMPK em células GH3 (6). Foi também demonstrado que a ativação de AMPK por AICAR nessas células induziu apoptose celular enquanto o Composto C, um inibidor de AMPK, foi capaz de efetivamente inibir a proliferação celular em células GH3 (6).

A redução da atividade da p70S6 quinase (enzima com importante papel no crescimento celular) pelo AICAR também foi demonstrada em células da linhagem GH3 (5). No entanto, a somatostatina 14 (SS-14), composto inibidor da secreção de GH via estimulação de proteína G inibitória e consequente redução dos níveis intracelulares de cAMP, não mostrou efeito significativo sobre a ativação de AMPK e a atividade da p70S6 quinase, apesar de ser capaz de aumentar o efeito inibitório do AICAR sobre os níveis da RPS6 (proteína ribossômica S6) fosforilada (5). O uso combinado de AICAR e SS-14 em linhagem celular humana de tumores secretores de GH, as quais não respondiam a essas

substâncias isoladamente, demonstrou eficácia superior ao uso isolado de SS-14 nesses tumores para diminuir a secreção hormonal (5).

Alguns estudos realizados em culturas celulares demonstraram a inibição de crescimento celular bem como a regulação da função celular utilizando-se drogas ativadoras do AMPK, como por exemplo a metformina (4-6, 83-85). Esta droga foi capaz de inibir a proliferação celular e até mesmo induzir apoptose através da ativação de AMPK e redução de mTOR em células da linhagem corticotrófica de rato (AtT20), além de inibir as vias de sinalização do receptor de IGF-1 e AKT (83). Observou-se também a diminuição na secreção de ACTH, porém não foi observado nenhum bloqueio do ciclo celular nessa linhagem (83). Acredita-se que a apoptose e a diminuição da secreção de ACTH induzida pelo uso da metformina possa estar relacionada ao aumento da atividade da caspase-3, diminuição de Bcl-2 (B cell lymphoma protein 2) e aumento de BAX (proteína X associada a Bcl-2), estando todas as citadas relacionadas à ação anti-apoptótica (83).

A metformina inibe significativamente a proliferação celular em células GH3 *in vitro*, porém o uso combinado de metformina e bromocriptina, agonista dopaminérgico com ação inibitória sobre a secreção de prolactina e GH, não alterou a secreção de prolactina por essa linhagem celular (85). No entanto, foi demonstrada baixa ativação de AMPK nos prolactinomas resistentes à tratamento com bromocriptina, apesar de alta expressão do receptor de dopamina D2 em alguns desses tumores (85). Esse estudo também incluiu mostras *xenograft*, as quais foram obtidas através do enxerto de células GH3 ou MMQ (células de rato que secretam prolactina e apresentam receptor de dopamina funcional) em camundongos saudáveis para induzir modelos de prolactinoma (85). Nessa amostra, demonstrou-se que o tratamento combinado de metformina e

bromocriptina foi capaz de diminuir o crescimento tumoral e a secreção de prolactina em ambos os modelos experimentais (85).

A inibição da via de sinalização mTOR-p70S6 constitui alvo importante do efeito supressor da metformina no crescimento tumoral hipofisário (4). Mesmo em células cujo aumento de cAMP foi induzido por forskolina, a metformina ainda foi capaz de induzir a ativação de AMPK e inibir o crescimento celular *in vitro* (4). An e colaboradores (84) demonstraram que a metformina foi capaz de inibir a proliferação e induzir apoptose em células da linhagem GH3. Os autores acreditam que a via apoptótica mediada por mitocôndrias esteja envolvida, já que observou-se diminuição do potencial da membrana mitocondrial associado ao aumento na expressão de proteínas pró apoptóticas (BAX e caspase 3) e diminuição na expressão da proteína anti apoptóticas Bcl-2 nas células GH3 tratadas com metformina (84).

Outro estudo observou que as biguanidas metformina, buformina e fenformina, reduziram a viabilidade celular em todas as amostras (sendo que a fenformina foi a biguanida mais eficaz) e aumentaram a apoptose em somatotropinomas. Além disso, buformina e fenformina reduziram a secreção de hormônio de uma maneira específica para o tipo de célula. Porém a terapia combinada de metformina / SRL não aumentou a eficácia da monoterapia com SRL. Os pesquisadores desse estudo acreditam que os efeitos das biguanidas nos tumores neuroendócrinos hipofisários podem envolver a modulação de proteína quinase-dependente ativada por AMP ([Ca²⁺]_i, PI3K / Akt) e outros mecanismos independentes (MAPK) (90).

A atividade de AMPK e a expressão de várias enzimas metabólicas já foram avaliadas no hipotálamo, fígado, tecido adiposo e coração de um modelo de excesso de glicocorticóide de rato, bem como em estudos *in vitro* usando culturas celulares primárias de tecido adiposo humano e células hipotálamo-hipotalâmicas de rato, e uma linhagem

celular humana de hepatocarcinoma tratado com dexametasona e metformina (91). Nesse estudo o tratamento com glicocorticoides inibiu a atividade da AMPK no tecido adiposo e no coração de ratos, ao mesmo tempo em que a estimulou no fígado e hipotálamo. Dados semelhantes foram observados *in vitro* nas células adiposas, hipotalâmicas e na linhagem de células do fígado. A metformina preveniu os efeitos induzidos no AMPK pelos corticosteroides em adipócitos humanos e neurônios hipotalâmicos de ratos (91). Esses dados sugerem que as alterações induzidas por glicocorticóides no AMPK constituem um novo mecanismo que poderia explicar o aumento do apetite, a deposição de lipídios no tecido adiposo visceral e hepático, bem como as alterações cardíacas que são todas características do excesso de glicocorticóides (91). Sugerem também que o tratamento com metformina pode ser eficaz na prevenção das complicações metabólicas do excesso crônico de glicocorticóides (91).

Um ensaio clínico randomizado duplo-cego, controlado por placebo, incluiu pacientes sem diabetes com um quadro inflamatório tratado com prednisolona contínua, os quais foram alocados aleatoriamente para qualquer um dos grupos (metformina ou placebo). Não observou-se nenhuma mudança significativa na proporção da área de gordura visceral – subcutânea entre os grupos de tratamento, porém no grupo tratado com metformina observou-se redução do apetite, gordura subcutânea troncular e facial, resistência à insulina, melhora da função de células β , glicemia, perfil lipídico, função hepática, fibrinólise, aterosclerose subclínica, metabolismo ósseo, risco de infecção, inflamação, atividade da doença e gravidade dos sintomas, bem como menos internações hospitalares.

Sabe-se que o aumento na produção de lipídios e aumento da síntese de proteínas e DNA, bem como proliferação e migração celulares, são características comuns ao fenótipo maligno das células cancerosas e que o AMPK regula todos esses eventos na

célula neoplásica (2, 81). A acromegalia, na maioria dos casos, são adenomas benignos, que ocorrem de forma esporádica e isolada, porém o padrão celular de citoqueratina CAM5.2 permite a importante distinção entre o padrão densamente e esparsamente granulados, o primeiro mostrando-se menos agressivo do que o segundo (55).

3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O papel do AMPK e sua expressão em células hipofisárias vem sendo estudado ao longo dos anos porém, até o presente momento, esses estudos foram realizados em ratos/camundongos ou culturas celulares. Apesar de serem protocolos validados, sabemos que a realização de experimentos em tecidos humanos é extremamente importante, visto que há diferenças fisiológicas entre humanos e outras espécies animais.

Em tumores hipofisários benignos, ainda não existem dados de como está a ativação de AMPK nas células apesar da demonstração da eficácia de medicamentos ativadores de AMPK *in vitro* na diminuição da proliferação celular e produção hormonal de células hipofisárias. Sendo assim, a realização do presente estudo mostra-se relevante para a compreensão da expressão da AMPK ativada em pacientes com adenoma hipofisário secretor de GH bem como em hipófise humana normal. O melhor entendimento da expressão de AMPK ativada nesses adenomas fornecerá dados importantes para o conhecimento da tumorigênese hipofisária.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Primário

O objetivo primário desse estudo é avaliar a expressão de AMPK ativada (pAMPK) em células somatotróficas de adenomas hipofisários esporádicos removidos cirurgicamente de pacientes com acromegalia comparando-as com as células somatotróficas de hipófises normais.

4.2 Objetivos secundários

Esse estudo tem como objetivos secundários:

1 - Avaliar se existe correlação entre a expressão de pAMPK em adenomas hipofisários esporádicos removidos cirurgicamente de pacientes com acromegalia e os seguintes parâmetros clínicos:

- a) sexo;
- b) índice de massa corporal (IMC);
- c) Padrão de expressão de citoqueratina (CAM5.2);
- d) uso de metformina antes da cirurgia;
- e) níveis de GH pré cirurgia;
- f) necessidade do uso de terapia medicamentosa (análogo de somatostatina ou cabergolina) após a cirurgia.

2 - Avaliar a expressão de pAMPK em adenomas hipofisários removidos cirurgicamente de pacientes com acromegalia e que sabidamente possuem as seguintes mutações gênicas:

- a) mutação GNAS;
- b) mutação do gene AIP.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Considerações éticas

Para a realização do presente estudo, o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação em Seres Humanos (COEP/UFMG): protocolo ETIC 0013.0.203.000-10 e CAAE 43738914.4.00005149 (anexo I). Os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo II).

5.2 Participantes

5.2.1 Critérios de inclusão

Os seguintes critérios de inclusão foram utilizados:

- a) Pacientes com acromegalia com ou sem mutação do gene AIP;
- b) Pacientes com biópsia cirúrgica disponível.

5.2.2 Critérios de exclusão

Os seguintes critérios de exclusão foram utilizados:

- a) Pacientes cuja biópsia cirúrgica não estivesse disponível ou cuja amostra fosse insuficiente;
- b) Pacientes que utilizaram medicamento para controle da acromegalia (octreotida, lanreotida, cabergolina) antes da cirurgia para retirada do adenoma;
- c) Pacientes que não aceitaram participar da pesquisa.
- d) Pacientes que utilizavam medicamentos que direta ou indiretamente ativam AMPK (exceto metformina): tiazolidinedionas, polifenóis, ginseng, ácido alfalipóico e aspirina.

5.3 Amostras hipofisárias

Os blocos de parafina, provenientes do material da biópsia pós cirúrgica, foram disponibilizadas pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina UFMG mediante prévia autorização dos pacientes. Foram selecionadas aleatoriamente no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina UFMG amostras de 22 pacientes com acromegalia e 6 amostras foram excluídas por material insuficiente (n = 16). As amostras obtidas possuíam caracterização anatomopatológica de adenoma hipofisário. O tipo tumoral foi determinado com base em resultados clínicos e bioquímicos anteriores à cirurgia e realização de determinação imuno-histoquímica do tumor cirurgicamente extraído. Todas as amostras apresentaram mais de 90% das células de tumor somatotrófico específico (confirmação realizada pela técnica de hematoxilina – eosina – HE) e análise imunohistoquímica positiva para GH. As hipófises normais brasileiras foram coletadas de autópsias no prazo máximo de 24-h pós morte de indivíduos que não apresentavam desordem endocrinológica e realizou-se a análise da reticulina no tecido a fim de que fosse excluída qualquer anormalidade tecidual (n = 5) Figura 5).

As amostras de adenomas secretores de hormônio do crescimento (GH) com mutação AIP foram disponibilizadas pela Professora Marta Korbonits (Queen Mary University of London) e, a fim de evitar a comparação de populações diferentes, também foram disponibilizadas 3 lâminas de diferentes hipófises normais provenientes da população inglesa que foram submetidas ao mesmo processo de coleta / parafinização das amostras com mutação do AIP (Figura 5).

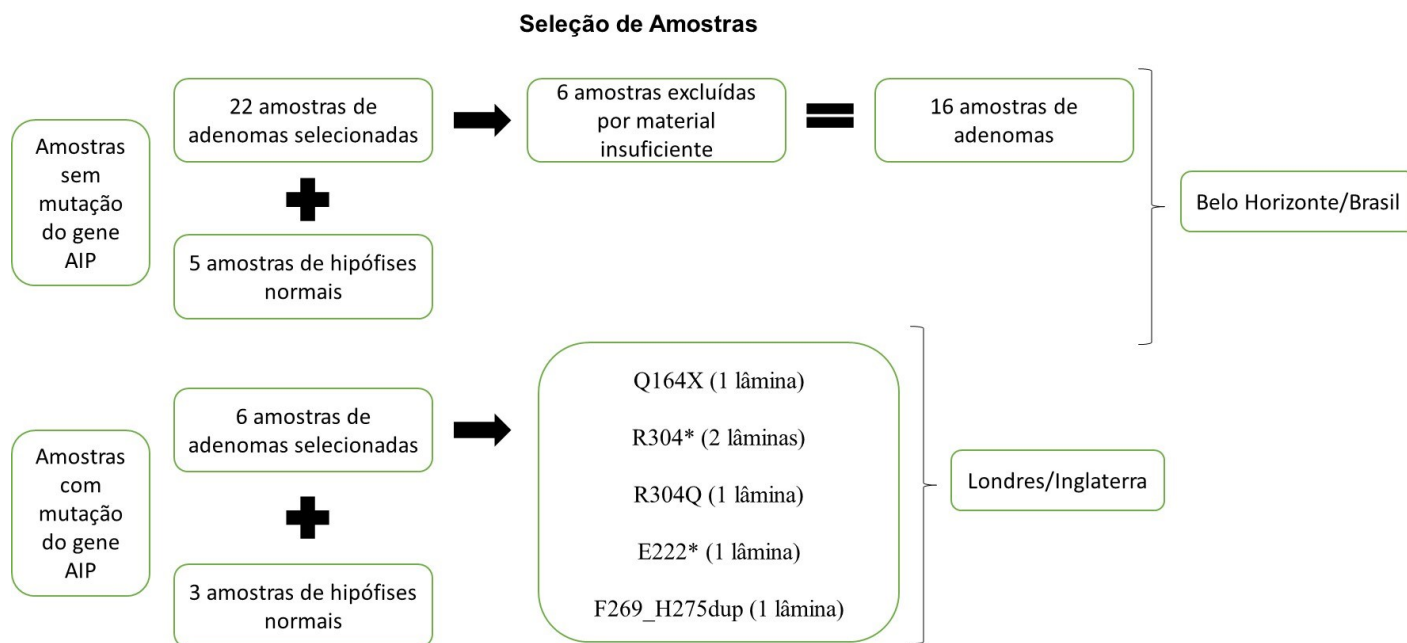


Figura 5 – Figura esquemática da seleção de amostras hipofisárias para o estudo

5.4 Análise de prontuários

A análise de prontuários foi realizada para caracterização da amostra e os seguintes dados foram obtidos: sexo, índice de massa corporal (IMC) pré cirurgia, idade ao diagnóstico, valores de GH e IGF-1 pré cirurgia, tamanho tumoral, invasão de seio cavernoso, uso de medicamento para acromegalia pós cirurgia e uso de metformina oral pré cirurgia.

5.5 Imunohistoquímica para determinação do padrão de citoqueratina - CAM5.2

A realização da imunohistoquímica para avaliação do padrão de citoqueratina CAM5.2 seguiu o protocolo já previamente padronizado no Laboratório de Anatomia Patológica da UFMG. Primeiramente, os cortes passaram pelo processo de desparafinação e hidratação com banhos sucessivos de: xilol (3 banhos de 5 minutos cada)

e álcool etílico 99,6%. Posteriormente, realizou-se o processo para bloqueio da peroxidase endógena adicionando-se solução de bloqueio da peroxidase (Spring – DHP-125) suficiente para cobrir todo o corte na lâmina (10 minutos) e posterior lavagem em PBS (2 vezes por 5 minutos cada). O bloqueio de proteínas foi constituído de adição da solução de bloqueio de proteínas (Spring – DPB-125) e após 10 minutos, lavagem em PBS (2 vezes por 5 minutos cada). Em seguida, cobriu-se o corte com o anticorpo primário Anti-Citoqueratina CAM5.2 (Becton, Dickinson and Company – REF 349205) e deixou-se as em incubação por 60 minutos, em câmara úmida e em temperatura ambiente. Esse anticorpo foi previamente testado e funcionou na concentração indicada pelo fabricante (25µg/ml). Após essa incubação, realizou-se a lavagem das lâminas no PBS (3 vezes por 5 minutos cada). O bloqueio pós primário é realizado pela adição da solução de bloqueio pós primário (Novolink) na lâmina; após 30 minutos, realizou-se a lavagem no PBS (2 vezes por 5 minutos cada). A reação do polímero (anticorpo secundário) teve as seguintes etapas: adição da solução de polímero (Novolink), incubação por 30 minutos em câmara úmida e em temperatura ambiente, seguida de lavagem no PBS (3 vezes por 5 minutos cada). O preparo e a reação de detecção foram feitos como a seguir: diluição de 50 µL do cromógeno DAB em 1 mL de solução tampão substrato do DAB. Depois, foi realizada a aplicação de 200 µL da solução cromógeno/substrato DAB, seguida de incubação por 5 minutos em câmara úmida e em temperatura ambiente. Na sequência, foi realizada lavagem em água corrente (3 vezes por 5 minutos cada, com leve agitação). A contra coloração incluiu as seguintes etapas: passagem das lâminas na hematoxilina por 30 a 60 segundos, seguida de lavagem em água corrente por 2 minutos; depois lavagem em xilol por 1 minuto, seguida de montagem da lâmina.

A leitura foi realizada por microscópio eletrônico. Para a avaliação da marcação da imunohistoquímica, foram considerados dois padrões já previamente descritos na literatura (92, 93): esparsamente granuloso e densamente granuloso. A análise de todas as lâminas foi realizada com ajuda de patologista experiente, sem variação inter-observador e de acordo com os seguintes padrões: 1) adenomas densamente granulados: presença de queratina perinuclear e 2) adenomas esparsamente granulados: presença de corpos fibrosos (92). Os adenomas que apresentaram ambos os padrões de citoqueratina (mistos) foram alocados conforme o padrão de citoqueratina majoritário (densamente granuloso).

5.6 Identificação de mutação da subunidade alfa da proteína G – GNAS

O sequenciamento de DNA foi realizado para detectar o status mutacional dos exons 8 e 9 do GNAS (códon 201 e 227). O DNA genômico foi extraído do tecido tumoral de cada uma das 16 amostras selecionadas para esse estudo usando o kit de isolamento de DNA FFPE de alta pureza (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha) de acordo com os protocolos do fabricante. As reações de PCR contendo 2,5 µl de tampão Taq 10X, 1,0 µl de dNTP 10 mM, 1,0 µl de primers direto e reverso (10 µM), 0,5 µl de Taq DNA polimerase e 1 µl de DNA (100 ng / µl) foram misturados com água deionizada, no volume total de 25 µl. As condições de PCR para amplificar os exons 8 e 9 do GNAS foram as seguintes: Desnaturação a 94° C durante 2 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 94° C durante 30 segundos, hibridação a 62° C durante 30 segundos, e extensão a 72° C durante 1 minuto; e uma extensão final a 72° C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram purificados pelo kit de purificação QIAquick PCR (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e enviados para sequenciamento à Eurofins Genomics (<http://www.eurofinsgenomics.com>).

5.7 Imunofluorescência para marcação de AMPK ativada – pAMPK

Primeiramente os cortes passaram pelo processo de desparafinização e hidratação: 3 banhos de xilol de 5 minutos cada, 2 banhos de etanol de 5 minutos cada, um banho de 3 minutos de cada um dos seguintes reagentes: etanol 95%, etanol 70%, etanol 50%, etanol 25% e água destilada. Após esses processos, as lâminas foram transferidas para um recipiente de vidro pré-aquecido em banho maria (temperatura 94°C - 96 °C) contendo 400 ml de solução tampão de citrato de sódio 10mM para reativação antigênica. Nesse reagente as amostras permanecem por 30 minutos dentro do próprio banho maria (temperatura 94°C - 96 °C) e posteriormente, ainda dentro da solução, permanecem por 20 minutos fora do banho maria. Hidratou-se os cortes com uma banho de 5 minutos de água destilada e um banho de 10 minutos de PBS 1x (tampão fosfato-salino).

As lâminas foram secadas com papel absovente e realizou-se um círculo em volta dos cortes com caneta Liquid Blocker. Os cortes foram então incubados em solução de bloqueio (1% de albumina bovina + 0,1% de Tween 20) à temperatura ambiente em câmara úmida durante 1 hora. Em seguida, a fim de colocalizar a pAMPK nas células específicas secretoras de GH, retirou-se a solução de bloqueio e, sobre cada corte, colocou-se uma solução contendo o tampão de incubação com os respectivos anticorpos primários: anti-GH (L20 - Santa Cruz Biotechnology, USA - 1:50) e pAMPK (10H2L20 - ThermoFisher Scientific, USA - 1:50). As lâminas foram deixadas *overnight* a 4°C em câmara úmida. Posteriormente foram lavadas em PBS 1x (4 banhos sucessivos de 3 minutos cada), secas com papel absorvente e então incubadas em camâra úmida escura por 1 hora em temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-cabra Alexa 546

(1:100, Invitrogen, EUA) e anti-coelho Alexa 488 (1:100, Invitrogen, USA). Posteriormente as lâminas foram lavadas em PBS 1x (4 banhos sucessivos de 3 minutos cada), secas com papel absorvente e os cortes foram montados com meio de montagem 90% de glicerol e lamínula.

5.8 Análise das Imagens

A leitura foi realizada em microscopia confocal, utilizada para aumentar o contraste da imagem microscópica e construir imagens tridimensionais através da utilização de um orifício de abertura, *pinhole*, que permite uma grande definição de imagem em amostras mais espessas que o plano focal.

As imagens foram capturadas através do microscópio confocal (Leica TCS SP5), objetiva 63X, 630X e ampliação original. Todas as configurações confocais foram determinadas no início da sessão de leitura das imagens e manteve-se inalterada durante todo o experimento. Para a análise quantitativa, as imagens foram capturadas em oito bits e analisadas em escala de cinza (94). Foram capturadas 4 a 8 imagens de cada amostra, com cerca de 10-20 células escolhidas aleatoriamente em cada corte.

Testes preliminares foram realizados antes dos experimentos finais, a fim de reduzir a variabilidade intra e interensaio, tanto na hipófise normal como nos adenomas e para controlar fatores que poderiam afetar a interpretação final da imagem obtida (parafina remanescente do processo de desparafinização, ligação inespecífica dos anticorpos, avaliação de excesso de material autofluorescente). Sendo assim, determinamos previamente as melhores condições para o ensaio de imunofluorescência, tais como: diluição dos anticorpos primários e secundários, solução de bloqueio, e tipo de solução de recuperação antigênica. Testes adicionais foram realizados no microscópio confocal para confirmar as melhores definições para a captura das imagens e definição

do número de imagens por área de cada amostra que fossem representativos de toda a amostra.

As imagens obtidas com as leituras das lâminas foram analisadas em um programa específico – ImageJ (NIH, Bethesda, EUA), utilizado para quantificar a intensidade de fluorescência e a área. A fluorescência de fundo foi então subtraída da região de interesse. A intensidade de fluorescência corresponde ao nível de cinza da imagem, variando de zero (preto) a 255 (branco), com uma média da área (soma dos valores de cinza de todos os pixels, dividido pelo número de pixels / área).

5.9 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa Prisma (GraphPad 8, La Jolla, CA, USA). Os grupos foram testados, para cada variável de estudo, quanto ao seu padrão de normalidade utilizando-se o teste de Shapiro – Wilk. Utilizamos o teste de Mann-Whitney para a comparação entre dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's para a comparação de mais de dois grupos. Os dados de pAMPK estão apresentados como mediana e a amplitude dos dados (mínimo e máximo). O valor de $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

O teste de correlação de Spearman foi realizado no programa SPSS Statistics 22.0 (IBM, USA) e o valor de $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Expressão de pAMPK nos adenomas hipofisários de pacientes com acromegalia em comparação à hipófise normal

Demonstramos na Figura 6 a expressão de pAMPK na célula somatotrófica de pacientes com acromegalia em comparação à célula somatotrófica da hipófise normal. A expressão de pAMPK foi significativamente maior nas células somatotróficas dos pacientes com acromegalia ($p < 0.0001$).

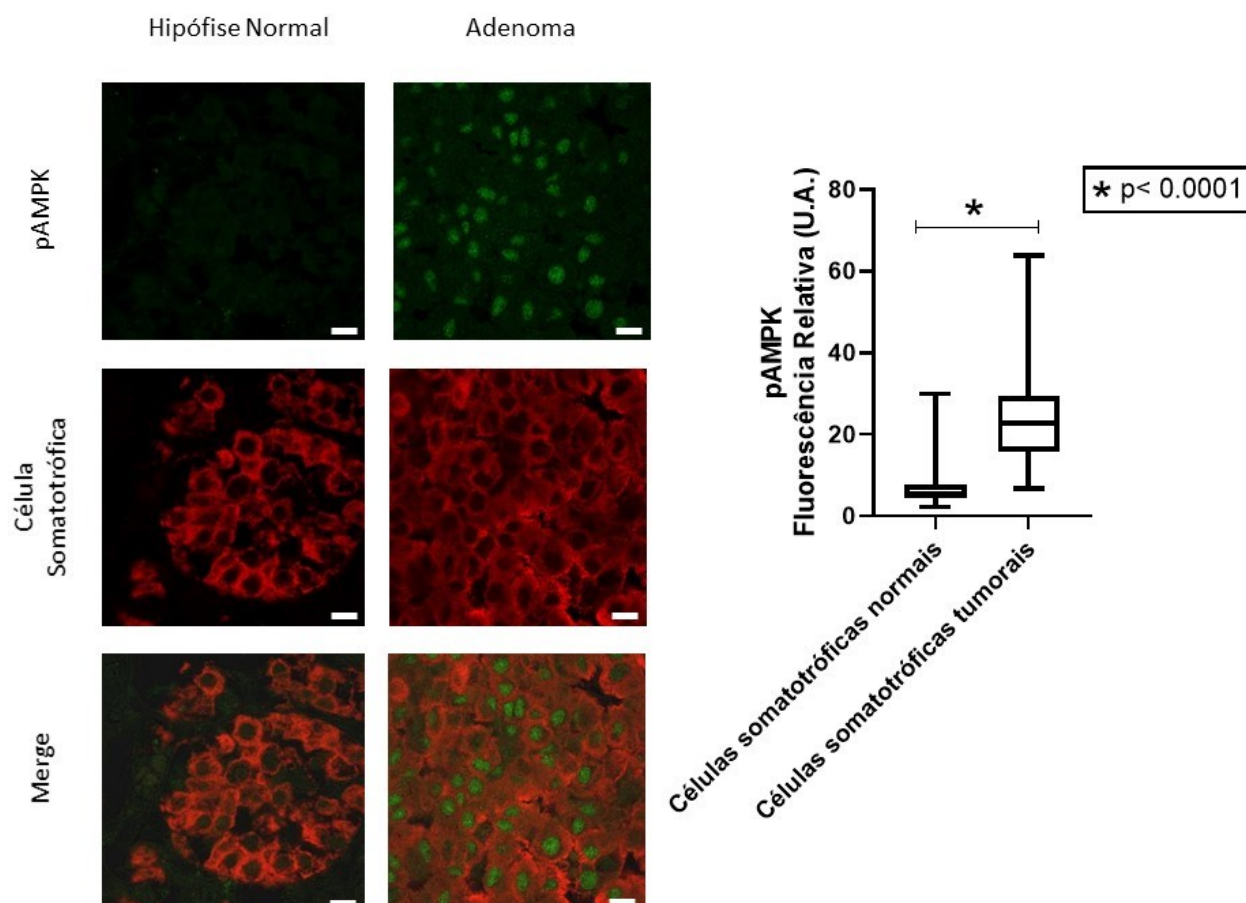


Figura 6 – Expressão de pAMPK em células somatotróficas de pacientes com acromegalia (n=16 / n° células = 363) e em células somatotróficas da hipófise normal

(n=5 / n° células = 241) (coloração verde). O gráfico demonstra a fluorescência relativa de pAMPK; barra de escala: 10 µm; UA, unidades arbitrárias; * p <0.0001.

6.2 Expressão de pAMPK nos adenomas hipofisários de pacientes com acromegalia quanto ao padrão de expressão de CAM5.2

O padrão de citoqueratina foi analisado em 16 pacientes, sendo classificados em: 6 adenomas (37,5%) esparsamente granulados e dez adenomas (62,5%) densamente granulados (8 densamente granulados e 2 formas mistas). Exemplos dos padrões de citoqueratina observados estão exemplificados na Figura 7: (A) densamente granulado e (B) esparsamente granulado.

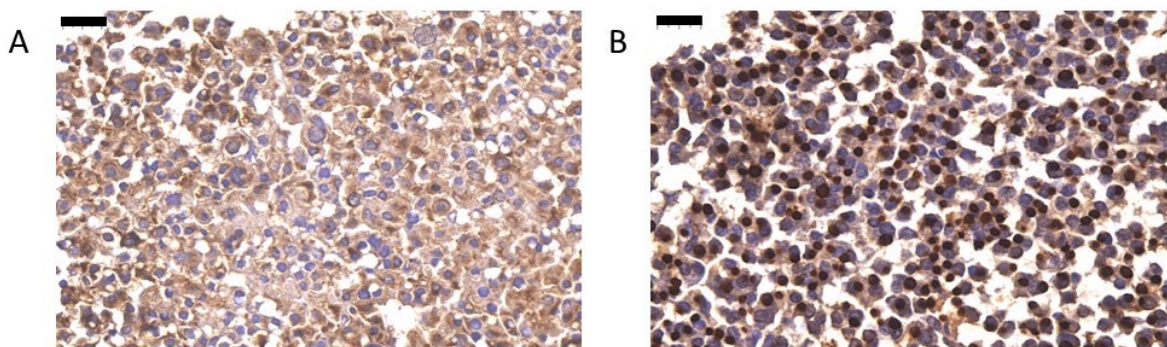


Figura 7 – Padrões de expressão de citoqueratina: (A) adenoma densamente granulado e (B) adenoma esparsamente granulado. Barra de escala: 20 µm.

6.3 Dados clínicos dos pacientes com acromegalia incluídos no estudo

Foram avaliados nesse estudo dezesseis pacientes diagnosticados com acromegalia, porém virgens de tratamento específico para acro, previamente submetidos à cirurgia transesfenoidal para ressecção do adenoma no Hospital das Clínicas da UFMG. Os dados clínicos dos pacientes incluídos nesse estudo estão demonstrados na Tabela 2.

O grupo amostral foi dividido igualmente entre o sexo feminino (n = 8 / 50%) e masculino. De acordo com os exames de ressonância magnética pré cirurgia: três pacientes (18,75%) apresentavam microadenomas e treze pacientes (81,25%) apresentavam macroadenomas; onze pacientes (68,75%) não apresentavam invasão do seio cavernoso enquanto cinco pacientes (31,25%) apresentavam invasão do seio cavernoso. A média de idade de diagnóstico da acromegalia foi de $45,2 \pm 7,9$ anos. Quanto ao índice de massa corporal (IMC) pré cirurgia, a média foi de $30,96 \pm 4,97$ kg/m². Cinco pacientes (31,25%) utilizavam metformina para tratamento de diabetes mellitus previamente à cirurgia enquanto onze pacientes (68,75%) não utilizavam.

No que se refere aos parâmetros bioquímicos da acromegalia, a média de GH e IGF-1 pré cirurgia dos pacientes foi de $11,50 \pm 10,56$ ng/mL e $3,97 \pm 1,42$ vezes o limite superior da normalidade, respectivamente. Metade dos pacientes necessitou de tratamento complementar para acromegalia pós cirurgia (análogo de somatostatina e/ou cabergolina).

Tabela 2 – Dados clínicos dos pacientes com acromegalia submetidos à cirurgia para retirada do adenoma avaliados no estudo

Amostra	Sexo	IMC pré cirurgia (kg/m ²)	Idade Diagnóstico (anos)	GH pré cirurgia (ng/mL)	IGF-1 pré cirurgia (ng/mL)	IGF-1 (ULN)	Tamanho Tumoral	Invasão de seio cavernoso	Uso de análogo de somatostatina pós cirurgia	Uso de cabergolina pós cirurgia	Uso de metformina oral antes da cirurgia
GH8	F	28,6	60	4,63	798	3,76	Micro	Não	Sim	Sim	Sim
GH9	M	30,3	43	7,32	927	3,47	Macro	Não	Não	Não	Não
GH10	F	27,5	37	N/D	N/D	N/D	Macro	Sim	Não	Não	Não
GH11	M	36,7	35	2,3	611	2,5	Micro	Não	Não	Não	Não
GH12	M	30,9	35	25,4	1231	5,42	Macro	Não	Sim	Não	Não
GH13	F	23,4	50	6,43	1227	5,87	Macro	Não	Não	Não	Não
GH15	M	23,9	47	8,18	1335	5,29	Macro	Não	Não	Não	Não
GH17	M	32,1	46	4,09	855	3,39	Macro	Não	Sim	Não	Sim
GH18	F	35,8	41	34,4	849	3,18	Macro	Sim	Sim	Sim	Não
GH20	M	28,1	44	27,6	613	2,29	Macro	Não	Sim	Sim	Sim
GH22	F	35,6	46	6,07	905	3,59	Macro	Sim	Sim	Não	Não
GH24	F	23	40	12,75	560	1,97	Macro	Sim	Sim	Não	Não
GH25	M	30,6	50	N/D	609	2,5	Micro	Não	Sim	Não	Sim
GH26	M	36,7	54	7,35	1473	6,19	Macro	Não	Não	Não	Não
GH27	F	34	59	3,02	992	4,41	Macro	Não	Não	Não	Sim
GH28	F	38,2	36	N/D	1302	5,74	Macro	Sim	Não	Não	Não

Legenda - IMC: índice de massa corporal; GH: hormônio do crescimento; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; N/D: não disponível; ULN: limite superior à normalidade.

6.4 Correlação entre a expressão de pAMPK no adenoma hipofisário de pacientes com acromegalia versus parâmetros clínicos

Na tabela 3 demonstramos os coeficientes de correlação e valor p entre os parâmetros clínicos dos pacientes com acromegalia: sexo, IMC, padrão de expressão de citoqueratina CAM5.2, uso de metformina antes da cirurgia, níveis de GH pré cirurgia e necessidade de terapia medicamentosa (análogo de somatostatina ou cabergolina) após a cirurgia. A expressão de pAMPK nas células somatotróficas dos adenomas de pacientes com acromegalia não possuem correlação estatística com os parâmetros clínicos avaliados nesse estudo.

Tabela 3 – Coeficiente de correlação Spearman e valor de p entre os dados clínicos dos pacientes com acromegalia submetidos à cirurgia para retirada do adenoma e a expressão de AMPK

Variáveis		Sexo	IMC	CAM5.2	Uso de metformina	GH pré cirurgia	Terapia medicamentosa após a cirurgia
pAMPK	Correlação	0,027	-0,174	0,420	0,102	0,312	0,434
	Valor p	0,9591	>0,9999	0,1179	0,7427	0,3301	0,3978

6.5 Análise da interferência do uso de metformina na expressão de pAMPK nos adenomas hipofisários de pacientes com acromegalia

Dentre as amostras selecionadas, o uso de metformina oral pré cirurgia foi relatado por 5 pacientes, na dose de 850 mg duas vezes ao dia, com média de tempo de uso de 4,8 \pm 2,2 anos.

A fim de avaliarmos a possível interferência do uso pré-operatório de metformina nos resultados apresentados, as análises comparativas foram refeitas após a exclusão das amostras dos pacientes que fizeram uso de metformina no pré-operatório. Os dados se mantiveram os mesmos e, por esse motivo, as análises com o grupo total (pacientes que utilizaram ou não metformina pré cirurgia) foram mantidas. No entanto, os pacientes que fizeram uso de metformina apresentaram valores de AMPK significativamente elevados, reforçando o papel elevador da metformina sobre o AMPK.

6.6 Expressão de pAMPK nos adenomas hipofisários de pacientes com acromegalia quanto à mutação GNAS

A análise genômica dos exons 8 e 9 (códon 201 e 227) demonstrou que, somente uma adenoma dentre os 16 incluídos nesse estudo, apresentava mutação GNAS (Figura 8).

O paciente GNAS positivo é do sexo masculino e foi diagnosticado em 2016 aos 54 anos de idade. Segundo relato do paciente, em 2015 procurou um endocrinologista para tratamento de excesso de peso e, após exames, foi diagnosticado com tumor de hipófise. Ao procurar uma segunda opinião em 2016, foi encaminhado ao ambulatório de neuroendocrinologia do HC-UFG. À época, relatou aumento de pés e mãos além do ganho de peso. Suas comorbidades ao diagnóstico eram: hipertensão, dislipidemia e glaucoma.

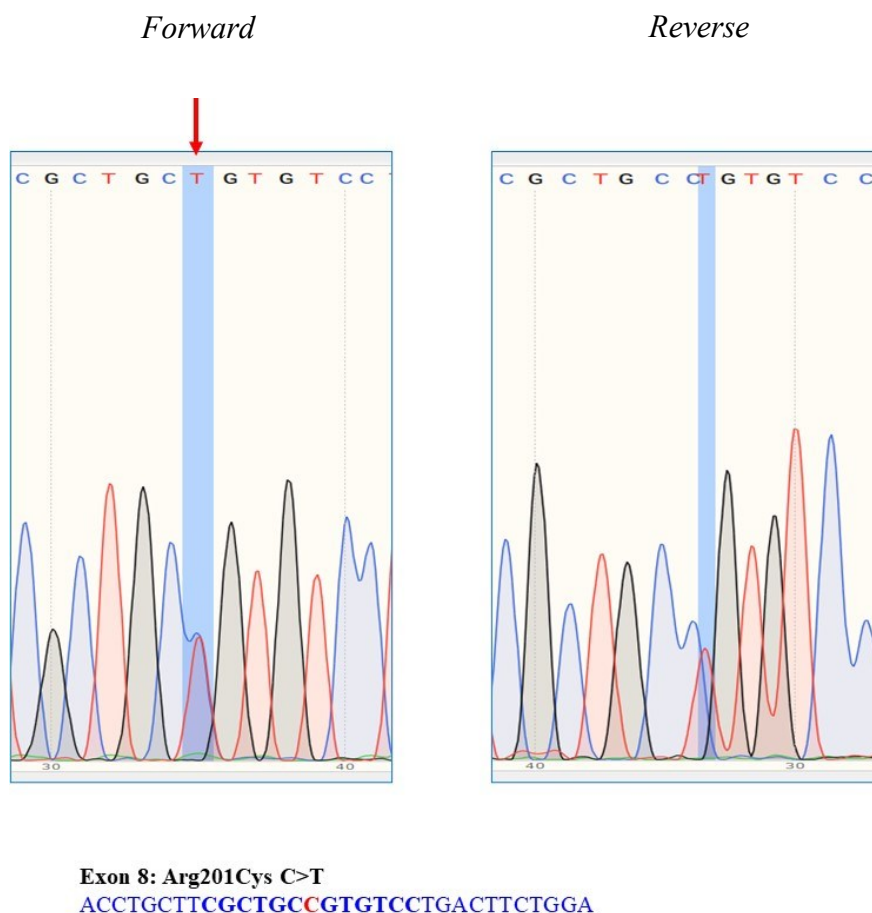


Figura 8 – Sequenciamento genômico do paciente GH26 demonstrando mutação GNAS Arg201Cys C>T no exon 8 do cromossomo 20.

A ressonância magnética de 2015 mostrou uma imagem ovalada de limites bem definidos e de contorno regulares no interior, de aspecto centrolateral direito da adenohipófise, com discreta assimetria no plano coronal havendo maior projeção cranial à direita abaulando o contorno glandular superior e condicionando discreto desvio contralateral da haste hipofisária, sem sinais de compressão e/ou desvio das vias ópticas. Tal lesão mediu cerca de 13mm x 11mm x 10mm (macroadenoma) e caracterizava-se por

hipossinal em T1 e por sinal heterogêneo hipointenso em T2, com realce não homogêneo inferior ao do restante da glândula pelo contraste, destacando-se área arredondada hiperintensa em T2 e hipointensa em T1 em sua intimidade sem realce pelo contraste, medindo 5mm x 4mm compatível com necrose/degeneração cística. Haste normal, tratos ópticos sem alterações.

Os exames laboratoriais mostravam IGF-1=1473 ng/mL (referência para a idade 87-238 ng/mL), GH basal=7,35 ng/mL, GH após TOTG 60 minutos=9,03 ng/mL, 90 minutos=11 ng/mL, 120 minutos=9,86 ng/mL. Já os demais exames do painel hormonal estavam normais.

Paciente foi submetido à ressecção transesfenoidal em novembro de 2016 sem nenhuma intercorrência. Não necessitou de tratamento medicamentoso para acromegalia após a cirurgia. Atualmente paciente realiza controle médico na neuroendocrinologia anualmente; a última ressonância magnética realizada em janeiro de 2018 mostrava alterações pós-cirúrgicas hipofisárias, sem sinais de lesão expansiva, hipófise com volume acentuadamente reduzido, aplainada no assoalho selar, impregnação homogênea e usual do meio de contraste pelo parênquima remanescente, haste centrada, cisterna livre, assoalho selar sem sinais de infradesnívelamento, quiasma com intensidade de sinal e configuração normais; última dosagem de IGF-1 (setembro/2018) 117 ng/mL (valor de referência para a idade 36 – 200 ng/mL); apresenta síndrome da apnéia do sono grave.

Esse participante não foi excluído de nenhuma das análises desse estudo uma vez que os resultados para a expressão de pAMPK (17.91 UA) apresentava-se semelhante aos demais participantes e os dados não modificam com sua exclusão. O padrão de citoqueratina CAM5.2 em sua amostra tumoral foi densamente granuloso.

6.7 Expressão de pAMPK nos adenomas hipofisários secretores de GH com mutação do AIP

Assim como demonstrado na imunofluorescência da hipófise normal e no adenoma hipofisário secretor de GH, avaliamos também a expressão de pAMPK nas células somatotróficas de adenomas hipofisários que sabidamente possuem mutação no gene AIP. Conforme demonstrado na Figura 9, persiste a baixa expressão de pAMPK nas células somatotróficas da hipófise normal e expressão significativamente elevada de pAMPK nas células somatotróficas do adenoma secretor de GH sem mutação no gene AIP. Quando observamos as amostras de 5 diferentes mutações do AIP, podemos notar diferentes expressões de pAMPK. Em relação às células somatotrófica da hipófise normal, podemos dizer que nas mutações R304*, Q164X e F269_H275dup a expressão de pAMPK é significativamente maior, porém semelhante à expressão de pAMPK nas células de adenomas secretores de GH que não possuem mutação no gene AIP. Já para as mutações E222* e R304Q, a expressão de pAMPK é significativamente aumentada quando comparadas com as células somatotróficas do adenoma secretor de GH sem mutação no gene AIP e células produtoras de GH na hipófise normal. Todas as comparações foram significativas com $P < 0.0001$.

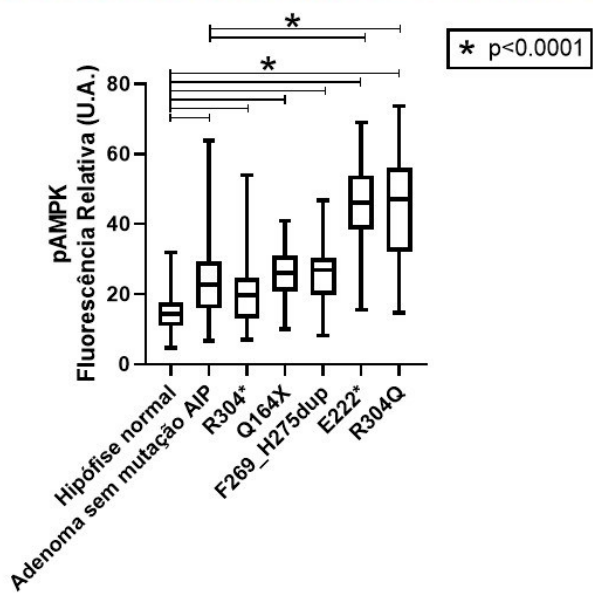
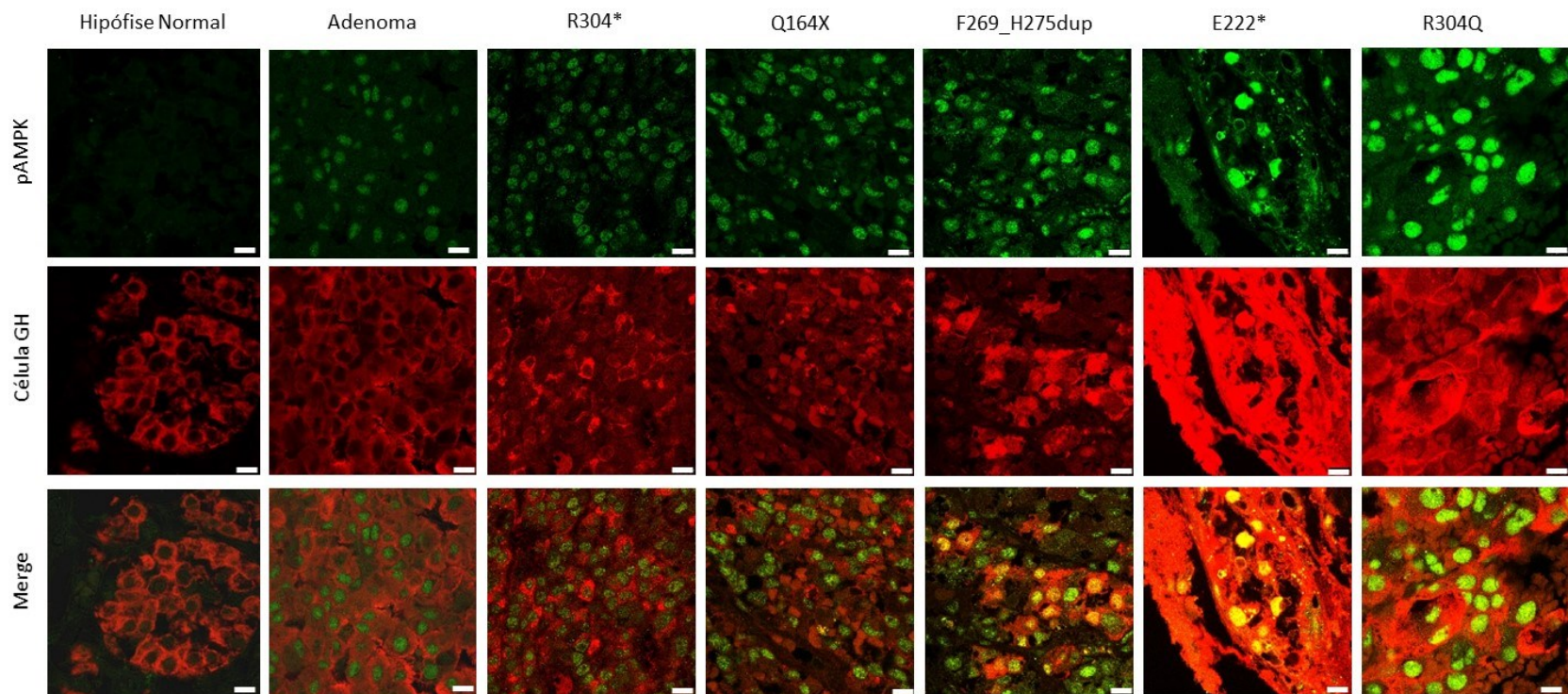


Figura 9 – Expressão de pAMPK (coloração verde) em células adenomas secretores de GH com e sem mutação AIP e na hipófise normal. O gráfico demonstra a fluorescência relativa de pAMPK nas células somatotróficas da hipófise normal (n=3 / n° células= 176), nas células somatotróficas dos adenomas hipofisários sem mutação (n=16 / n° células= 363) e diferentes mutações AIP (n° células R304*= 109; n° células Q164X=76; n° células F269_H275dup=54; n° células E222*= 28; n° células R304Q= 74). Barra de escala: 10 μ m; UA, unidades arbitrárias; * p <0.0001.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos pela primeira vez em células humanas a presença de expressão nuclear de pAMPK em células hipofisárias somatotróficas normais e tumorais. A expressão de pAMPK é significativamente aumentada nas células somatotróficas tumorais quando comparada à expressão de pAMPK nas células somatotróficas normais. Os parâmetros clínicos dos pacientes com acromegalia: sexo, IMC, padrão de expressão de citoqueratina CAM5.2, uso de metformina antes da cirurgia, níveis de GH pré cirurgia e necessidade de terapia medicamentosa (análogo de somatostatina ou cabergolina) após a cirurgia não apresentaram correlação estatística com a expressão de pAMPK nas células somatotróficas dos adenomas de pacientes com acromegalia na amostra avaliada. Quanto às mutações associadas à acromegalia avaliadas nesse estudo, a mutação GNAS foi identificada em apenas um paciente, o qual apresentou expressão de pAMPK semelhante aos demais pacientes com acromegalia. A expressão de pAMPK nas células somatotróficas dos pacientes com mutações do AIP são iguais e/ou superiores à expressão de pAMPK nas células somatotróficas normais.

O AMPK é uma molécula de resposta ao estresse. Sua ativação ocorre mediante redução da concentração de ATP e conseqüente elevação da concentração de AMP. Já foi demonstrado em ratos que o estresse de contenção aumenta a ativação de AMPK no tecido cardíaco, hipotalâmico e hepático, enquanto que nos ratos submetidos à estresse cirúrgico sob anestesia, não observou-se aumento de AMPK, o que sugere que a anestesia possa inibir as vias que regulam a atividade da AMPK (67, 68). Do ponto de vista fisiológico, a ativação do AMPK é importante, pois inibe a via de sinalização de mTOR, com conseqüente inibição da síntese proteica e crescimento celular, independentemente da via PI3K / AKT (5, 89). É importante salientar que a ativação da AMPK regula positivamente a ativação da p53, importante proteína supressora tumoral (71). Apesar de

cAMP e AMPK pertencerem a vias sinalizadoras distintas, é possível que a modulação da ativação de AMPK ocorra por essas duas vias (62, 64, 95).

O grupo de pacientes incluído nesse estudo foi composto igualmente por homens e mulheres com acromegalia descontrolada, os quais apresentavam expressão de pAMPK significativamente aumentada em relação às células somatotróficas das hipófises normais. O aumento da expressão de pAMPK no adenoma secretor de GH poderia representar uma resposta celular ao aumento das concentrações de cAMP, conforme evidências prévias (62, 64, 95). Recentemente observou-se que ao inibir especificamente a enzima PDE4, responsável pela inativação de cAMP em 5'AMP há elevação da concentração de cAMP em consequência à inibição da degradação de cAMP em 5'AMP, determinando aumento da ativação de AMPK (64). Por outro lado, não é possível excluir a participação de outras vias sinalizadoras na ativação de AMPK, podendo, inclusive, ser uma resposta compensatória à tumorigênese.

O CAM5.2 vem sendo utilizado e pode até mesmo impactar na terapia médica do paciente com acromegalia. Esse marcador de citoqueratina permite a importante distinção entre o padrão densamente e esparsamente granulados, já que a fisiopatologia destas lesões pode determinar sua resposta às terapias atuais que estão disponíveis: análogos da somatostatina versus antagonistas do GH e possivelmente agonistas da dopamina (52-54). Segundo o estudo de Ezzat *et al* (1995) o efeito inibitório do octreotida sob a secreção do GH é significativamente melhor nos pacientes cujo padrão de citoqueratina é o densamente granulado quando comparados aos esparsamente granulados (53). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Bhayana *et al* (2005), no qual uma análise multivariada confirmou que os adenomas densamente granulados são um forte preditor de resposta ao octreotida quando comparados com outras variáveis tais como: idade mais avançada ao diagnóstico e estágio tumoral (54).

Recentemente um estudo relacionou a agressividade dos adenomas somatotróficos ao desfecho clínico de seus pacientes (55). O artigo de Cuevas-Ramos *et al* divide sua amostra em tipo 1, 2 e 3, sendo que o tipo 1 englobou pacientes mais velhos, acompanhamento mais longo e os resultados mais favoráveis, caracterizado por microadenomas e macroadenomas não agressivos, densamente granulados. Já na ressonância, a imagem desses tumores se estendem ao seio esfenoidal com mais frequência do que a extensão suprasselar (imagem côncava do tumor) e expressam abundante p21 e receptor de somatostatina 2. Já o tipo 2 compreende macroadenomas não invasivos, densamente ou esparsamente granulados, sem extensão significativa (tumor plano na imagem), com resultado bioquímico intermediário. E o tipo 3 foi caracterizado unicamente por macroadenomas agressivos esparsamente granulados e compostos de pacientes com resultados terapêuticos adversos, apesar de receberem mais tratamentos (55).

Sendo assim, apesar de em nossa amostra não termos observado correlação entre a expressão de pAMPK e os diferentes padrões de expressão de citoqueratina, a utilização do marcador CAM5.2 pode ser importante para determinar o melhor tratamento medicamentoso complementar para acromegalia para o paciente e este estudo não objetivou avaliar desfecho clínico dos pacientes.

Esse estudo não observou correlação no grau de expressão de pAMPK na célula somatotrófica tumoral entre os sexos feminino e masculino. Tal achado requer confirmação por mais estudos, porém vale ressaltar que a acromegalia é uma doença que apresenta comportamento clínico e bioquímico semelhante em homens e mulheres (96, 97) apesar de atualmente ser descrito que a acromegalia é mais prevalente entre as mulheres (30).

Na acromegalia observamos que os pacientes possuem maior prevalência de doenças cardiovasculares (31, 32) e maior risco de desenvolvimento de diabetes mellitus decorrente dos efeitos anti-insulínicos do GH (33), caracterizando assim que esses pacientes possuem fatores relacionados à etiologia do que chamamos de síndrome metabólica. A adiponectina, um hormônio secretado pelo tecido adiposo, responsável pela sensibilidade à insulina modulado pela obesidade abdominal e capaz de ativar AMPK (65), apresenta-se aumentado em pacientes com acromegalia obesos e semelhante entre os pacientes com acromegalia eutróficos quando comparados aos pacientes controles normais (98). Sendo assim, podemos inferir que o IMC poderia aumentar a capacidade de ativação de AMPK já que os níveis de adiponectina apresentam-se elevados em pacientes com acromegalia apesar de nosso estudo não demonstrar correlação entre a ativação de AMPK e o IMC dos pacientes que participaram desse estudo.

A demonstração *in vivo* e *in vitro* da eficácia do uso de metformina na inibição da proliferação celular são decorrentes da crescente investigação para comprovação de sua eficácia como potencial adjuvante/ tratamento antitumoral (80). A dose de metformina usualmente utilizada nesses estudos (4, 84) foi o equivalente a 7g / dia para o tratamento de um indivíduo adulto, dose esta substancialmente superior à dose hipoglicemiante que os pacientes utilizavam nesse estudo e que pode justificar a ausência de correlação entre a expressão de pAMPK e o uso de metformina pré cirurgia em nossa amostra.

Na prática clínica observa-se que em adenomas secretores de GH a taxa de normalização bioquímica pós cirurgia transesfenoidal é dependente do volume tumoral e níveis plasmáticos de GH pré-operatórios (99) e que as maiores taxas de remissão foram alcançadas nos microadenomas com um valor de GH menor que 10 ng / mL (100). Em

nossa amostra, não observamos correlação entre a expressão de pAMPK e necessidade de tratamento medicamentoso complementar após a cirurgia.

Quanto à mutação do gene GNAS, responsável por codificar a fração α da proteína G, apesar de descrito na literatura que sua prevalência seria em torno de 40% em adenomas somatotróficos (101-105), somente um paciente de nossa amostra apresentou mutação GNAS Arg201Cys C>T no exon 8 e a expressão de pAMPK desse paciente foi semelhante ao demais. A presença da mutação somática GNAS é uma análise a ser considerada pois essa mutação inibe a atividade da GTPase de uma cadeia alfa da proteína G, α_s (106). Dessa forma, ocorre uma hiperativação da adenilil ciclase e consequentemente da via do cAMP. Sendo assim, identificar essa mutação foi um ponto importante pois, apesar de um tanto controverso, os adenomas somatotróficos com mutação do gene GNAS são descritos como mais responsivos ao tratamento com os ligantes dos receptores de somatostatina (octreotida) (107).

Nos últimos anos, o gene AIP vem sendo amplamente estudado visto que cerca de 30% das famílias com FIPA e 50% das acromegalias familiares possuem mutação no gene AIP (108). A interação de PDE4A4 (enzima responsável por inativar cAMP em 5'AMP) com AIP é de grande importância visto que o gene AIP é considerado um gene supressor de tumor e, dentre as diversas mutações descritas, há indícios que alterações na estrutura dos domínios TPR da molécula AIP podem ser preditores de adenomas hipofisários (50), já que essa porção da molécula é conhecida por proporcionar a interação PDE4A4 e AIP.

Recentemente demonstramos que tanto a expressão de PDE4A4 quanto a de PDE4A8 foi diminuída em amostras de adenomas secretores de GH com diferentes mutação do AIP (95) e, nesse atual estudo pudemos observar que, as diferentes mutações do AIP também demonstram diferentes expressões de pAMPK.

Nesse estudo, observou-se que a expressão de pAMPK é semelhante no grupo com mutação AIP R304* (*nonsense*), Q164X (*nonsense*) e F269_H275dup (mutação de inserção) quando comparadas ao grupo de adenomas secretores de GH sem mutação. As mutações *nonsense* R304* e Q164X causam um enfraquecimento da ligação AIP - PDE4A5 e também perturbam a ligação com o receptor ari hidrocarbono - AhR. Já a mutação de inserção F269_H275dup não mostra ruptura de ligação com PDE4A5 (60).

Já nas mutações E222* (*nonsense*) e R304Q (*missense*), a expressão de pAMPK é significativamente superior às aquelas observadas nas demais mutações do AIP citadas anteriormente. A mutação R304Q, atualmente questionada se é realmente uma mutação ou um polimorfismo (109), apesar de apresentar um enfraquecimento da ligação com PDE4A5 devido à extremidade C-terminal do domínio TPR ser seriamente interrompida, apresentou nesse estudo uma elevada ativação de AMPK similarmente ao observado na mutação *nonsense* E222*. Esses dados são sugestivos de que apesar das mutações afetarem a ligação AIP – PDE4A5, isso não afeta a ativação de AMPK, demonstrando que essa ativação acontece por uma via diferente / alternativa e não influenciada pela interrupção da interação AIP-PDE4A5.

Nossos dados sugerem que apesar de cAMP e AMPK pertencerem a vias sinalizadoras distintas, é possível que a modulação da ativação de AMPK ocorra por essas duas vias. Também podemos inferir que a hiperativação de AMPK nas células somatotróficas com ou sem mutação do AIP possam ser um efeito fisiológico em resposta ao aumento da conversão de ATP em cAMP nessas células.

É importante salientar também que nesse estudo trabalhamos com adenomas hipofisários secretores de GH que têm, por característica, serem benignos. A maioria dos dados na literatura apontam para uma diminuição de ativação de AMPK em tumores malignos, com aumento na produção de lipídios e aumento da síntese de proteínas e DNA,

bem como proliferação e migração celular (2, 73-79). No câncer de próstata, foi demonstrado que a inativação de AMPK aumenta o comportamento maligno das células cancerosas enquanto que sua ativação suprime o crescimento e proliferação celular (110). Já em tumores benignos, os dados da literatura demonstram aumento de expressão de pAMPK em adenomas de colón benignos quando comparados ao cancer colorretal (3), assim como observado em nossos pacientes com adenomas secretores de GH esporádicos e nas amostras com mutação do AIP. Sendo assim, sugerimos que os tumores hipofisários produtores de GH apresentam uma hiperativação de AMPK compensatória, como tentativa de supressão do crescimento e proliferação do adenoma.

8. LIMITAÇÕES

Esse trabalho foi realizado em pacientes com acromegalia, virgens de tratamento específico para doença e mutação GNAS negativa na sua maioria.

Devido ao número de amostras disponíveis, não foi possível avaliar a expressão de pAMPK quanto ao tamanho tumoral uma vez que a grande maioria dos pacientes incluídos apresentavam macroadenomas.

Houve dificuldade no recrutamento de pacientes visto que precisávamos da biópsia cirúrgica e alguns pacientes não haviam realizado a cirurgia no HC-UFG e dentre os que realizaram, houve dificuldade de encontrar o material na anatomia patológica e algumas biópsias possuíam material insuficiente para análise. Como esse é um estudo retrospectivo, alguns dados de exames e medidas corporais anteriores à cirurgia não foram possíveis de serem resgatados.

9. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou de forma inédita a expressão aumentada de pAMPK em pacientes com acromegalia descontrolada submetidos a cirurgia para retirada do adenoma, ao que parece, relacionado ao aumento da conversão de ATP em cAMP dentro da célula hipofisária neoplásica. Em nossa amostra os parâmetros clínicos tais como: sexo, IMC, os diferentes padrões de CAM5.2, uso de metformina antes da cirurgia, níveis de GH pré cirurgia e necessidade de terapia medicamentosa para acromegalia pós cirurgia, não apresentaram correlação com a expressão de AMPK. Apesar de sabermos que, por exemplo, o padrão esparsamente granuloso possui pior prognóstico e que a acromegalia parece acometer mais as mulheres do que os homens, esse parâmetros clínicos parecem não se correlacionar com o aumento / diminuição da ativação de AMPK.

A mutação GNAS no exon 8 identificada no paciente GH26 parece não interferir na expressão de pAMPK que foi semelhante aos demais pacientes com acromegalia. O aumento da expressão de pAMPK nas diferentes mutações do AIP pode representar uma resposta celular ao aumento intracelular de cAMP decorrente da diminuição da degradação de cAMP em 5' AMP, em resposta à diminuição de fosfodiesterase 4A4 e 4A8 demonstradas previamente.

Sendo assim, esse estudo fornece importantes dados sobre a expressão de pAMPK em adenomas hipofisários secretores de GH esporádicos quanto ao padrão de citoqueratina, sexo, IMC, níveis de GH pré cirurgia, necessidade de terapia medicamentosa complementar à cirurgia, mutação GNAS e em adenomas hipofisários secretores de GH com mutação do AIP. Porém estudos complementares para melhor entendimento das vias ativadoras de AMPK na hipófise devem ser considerados já que o AMPK vem sendo descrito como potencial modulador da proliferação e crescimento celular em células hipofisárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tatsi C, Stratakis CA. The Genetics of Pituitary Adenomas. *J Clin Med*. 2019;9(1).
2. Castro ACG, Bizzi, M.F., Ribeiro-de-Oliveira A., Jr. Amp- Proteína Quinase Ativada (AMPK): O Elo Proteico entre Metabolismo e Câncer. *Revista Médica de Minas Gerais*. 2020;30(e-30207):9.
3. Khabaz MN, Abdelrahman AS, Al-Maghrabi JA. Expression of p-AMPK in colorectal cancer revealed substantial diverse survival patterns. *Pak J Med Sci*. 2019;35(3):685-90.
4. Faggi L, Giustina A, Tulipano G. Effects of metformin on cell growth and AMPK activity in pituitary adenoma cell cultures, focusing on the interaction with adenylyl cyclase activating signals. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;470:60-74.
5. Tulipano G, Faggi L, Losa M, Mortini P, Spinello M, Sibilía V, et al. Effects of AMPK activation and combined treatment with AMPK activators and somatostatin on hormone secretion and cell growth in cultured GH-secreting pituitary tumor cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;365(2):197-206.
6. Tulipano G, Giovannini M, Spinello M, Sibilía V, Giustina A, Cocchi D. AMP-activated protein kinase regulates normal rat somatotroph cell function and growth of rat pituitary adenomatous cells. *Pituitary*. 2011;14(3):242-52.
7. Guyton A, Hall J. *Tratado de Fisiologia Médica*. 6a ed: Editora Elsevier; 2006.
8. Melmed S, Auchus R, Goldfine A, Koenig R, Rosen C. *Williams Textbook of Endocrinology*. 14th edition ed: Elsevier; 2020.
9. Yamamoto T, Sakakibara R, Uchiyama T, Liu Z, Ito T, Yamanishi T, et al. Lower urinary tract function in patients with pituitary adenoma compressing hypothalamus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(3):390-4.

10. Tachibana O, Yamaguchi N, Yamashima T, Yamashita J. Radiation necrosis of the optic chiasm, optic tract, hypothalamus, and upper pons after radiotherapy for pituitary adenoma, detected by gadolinium-enhanced, T1-weighted magnetic resonance imaging: case report. *Neurosurgery*. 1990;27(4):640-3.
11. Kleinschmidt-DeMasters BK, Winston KR, Rubinstein D, Samuels MH. Ectopic pituitary adenoma of the third ventricle. Case report. *J Neurosurg*. 1990;72(1):139-42.
12. Peker S, Sun I, Kurtkaya-Yapicier O, Elmaci I, Pamir MN. Ectopic pituitary adenoma located at the pituitary stalk. Case report. *J Neurosurg Sci*. 2005;49(1):25-9.
13. Mehta GU, Lonser RR. Management of hormone-secreting pituitary adenomas. *Neuro Oncol*. 2017;19(6):762-73.
14. Yamada S, Fukuhara N, Horiguchi K, Yamaguchi-Okada M, Nishioka H, Takeshita A, et al. Clinicopathological characteristics and therapeutic outcomes in thyrotropin-secreting pituitary adenomas: a single-center study of 90 cases. *J Neurosurg*. 2014;121(6):1462-73.
15. Donoho DA, Bose N, Zada G, Carmichael JD. Management of aggressive growth hormone secreting pituitary adenomas. *Pituitary*. 2017;20(1):169-78.
16. Pereira AM, Tiemensma J, Romijn JA, Biermasz NR. Cognitive impairment and psychopathology in patients with pituitary diseases. *Neth J Med*. 2012;70(6):255-60.
17. Psaras T, Milian M, Hattermann V, Gerlach C, Honegger J. Executive functions recover earlier than episodic memory after microsurgical transsphenoidal resection of pituitary tumors in adult patients--a longitudinal study. *J Clin Neurosci*. 2011;18(10):1340-5.
18. Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, et al. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science*. 2006;312(5777):1228-30.

19. Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ciccarelli A, Valdes-Socin H, Rohmer V, Tamburrano G, et al. Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(9):3316-23.
20. Arafah BM, Nasrallah MP. Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocr Relat Cancer.* 2001;8(4):287-305.
21. Gutenberg A, Larsen J, Lupi I, Rohde V, Caturegli P. A radiologic score to distinguish autoimmune hypophysitis from nonsecreting pituitary adenoma preoperatively. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009;30(9):1766-72.
22. Pekic S, Stojanovic M, Popovic V. Contemporary issues in the evaluation and management of pituitary adenomas. *Minerva Endocrinol.* 2015.
23. Ben-Shlomo A, Melmed S. Acromegaly. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(1):101-22, viii.
24. Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA, Beckers A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(12):4769-75.
25. Melmed S, Kleinberg DL, Bonert V, Fleseriu M. Acromegaly: assessing the disorder and navigating therapeutic options for treatment. *Endocr Pract.* 2014;20 Suppl 1:7-17; quiz 8-20.
26. Holdaway IM, Rajasoorya C. Epidemiology of acromegaly. *Pituitary.* 1999;2(1):29-41.
27. Melmed S. Medical progress: Acromegaly. *N Engl J Med.* 2006;355(24):2558-73.
28. Lavrentaki A, Paluzzi A, Wass JA, Karavitaki N. Epidemiology of acromegaly: review of population studies. *Pituitary.* 2017;20(1):4-9.

29. Dal J, Feldt-Rasmussen U, Andersen M, Kristensen LO, Laurberg P, Pedersen L, et al. Acromegaly incidence, prevalence, complications and long-term prognosis: a nationwide cohort study. *Eur J Endocrinol.* 2016;175(3):181-90.
30. Lenders NF, McCormack AI, Ho KKY. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Does gender matter in the management of acromegaly? *Eur J Endocrinol.* 2020;182(5):R67-R82.
31. Vitale G, Pivonello R, Lombardi G, Colao A. Cardiac abnormalities in acromegaly. Pathophysiology and implications for management. *Treat Endocrinol.* 2004;3(5):309-18.
32. Brevetti G, Marzullo P, Silvestro A, Pivonello R, Oliva G, di Somma C, et al. Early vascular alterations in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(7):3174-9.
33. Colao A, Ferone D, Marzullo P, Lombardi G. Systemic complications of acromegaly: epidemiology, pathogenesis, and management. *Endocr Rev.* 2004;25(1):102-52.
34. Wassenaar MJ, Biermasz NR, Hamdy NA, Zillikens MC, van Meurs JB, Rivadeneira F, et al. High prevalence of vertebral fractures despite normal bone mineral density in patients with long-term controlled acromegaly. *Eur J Endocrinol.* 2011;164(4):475-83.
35. Mazziotti G, Biagioli E, Maffezzoni F, Spinello M, Serra V, Maroldi R, et al. Bone turnover, bone mineral density, and fracture risk in acromegaly: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(2):384-94.
36. Melmed S, Bronstein MD, Chanson P, Klibanski A, Casanueva FF, Wass JAH, et al. A Consensus Statement on acromegaly therapeutic outcomes. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(9):552-61.

37. Freda PU. Monitoring of acromegaly: what should be performed when GH and IGF-1 levels are discrepant? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71(2):166-70.
38. Ribeiro-Oliveira A, Jr., Faje A, Barkan A. Postglucose growth hormone nadir and insulin-like growth factor-1 in naive-active acromegalic patients: do these parameters always correlate? *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011;55(7):494-7.
39. Ribeiro-Oliveira A, Jr., Faje AT, Barkan AL. Limited utility of oral glucose tolerance test in biochemically active acromegaly. *Eur J Endocrinol*. 2011;164(1):17-22.
40. Colao A, Grasso LFS, Giustina A, Melmed S, Chanson P, Pereira AM, et al. Acromegaly. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):20.
41. Katznelson L, Laws ER, Melmed S, Molitch ME, Murad MH, Utz A, et al. Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11):3933-51.
42. Fleseriu M, Biller BMK, Freda PU, Gadelha MR, Giustina A, Katznelson L, et al. A Pituitary Society update to acromegaly management guidelines. *Pituitary*. 2020.
43. Giustina A, Barkhoudarian G, Beckers A, Ben-Shlomo A, Biermasz N, Biller B, et al. Multidisciplinary management of acromegaly: A consensus. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020;21(4):667-78.
44. Minniti G, Traish D, Ashley S, Gonsalves A, Brada M. Risk of second brain tumor after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma: update after an additional 10 years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(2):800-4.
45. Abu Dabrh AM, Asi N, Farah WH, Mohammed K, Wang Z, Farah MH, et al. Radiotherapy Versus Radiosurgery in Treating Patients with Acromegaly: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Endocr Pract*. 2015;21(8):943-56.
46. Holdaway IM, Rajasoorya RC, Gamble GD. Factors influencing mortality in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(2):667-74.

47. Gadelha MR, Kasuki L, Korbonits M. The genetic background of acromegaly. *Pituitary*. 2017;20(1):10-21.
48. Bolger GB, Peden AH, Steele MR, MacKenzie C, McEwan DG, Wallace DA, et al. Attenuation of the activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 by interaction with the immunophilin XAP2. *J Biol Chem*. 2003;278(35):33351-63.
49. Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, et al. The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(6):2390-401.
50. Morgan RM, Hernández-Ramírez LC, Trivellin G, Zhou L, Roe SM, Korbonits M, et al. Structure of the TPR domain of AIP: lack of client protein interaction with the C-terminal α -7 helix of the TPR domain of AIP is sufficient for pituitary adenoma predisposition. *PLoS One*. 2012;7(12):e53339.
51. Beckers A, Aaltonen LA, Daly AF, Karhu A. Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. *Endocr Rev*. 2013;34(2):239-77.
52. Asa SL, Digiovanni R, Jiang J, Ward ML, Loesch K, Yamada S, et al. A growth hormone receptor mutation impairs growth hormone autocrine signaling in pituitary tumors. *Cancer Res*. 2007;67(15):7505-11.
53. Ezzat S, Kontogeorgos G, Redelmeier DA, Horvath E, Harris AG, Kovacs K. In vivo responsiveness of morphological variants of growth hormone-producing pituitary adenomas to octreotide. *Eur J Endocrinol*. 1995;133(6):686-90.
54. Bhayana S, Booth GL, Asa SL, Kovacs K, Ezzat S. The implication of somatotroph adenoma phenotype to somatostatin analog responsiveness in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6290-5.

55. Cuevas-Ramos D, Carmichael JD, Cooper O, Bonert VS, Gertych A, Mamelak AN, et al. A structural and functional acromegaly classification. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(1):122-31.
56. Lania A, Mantovani G, Spada A. cAMP pathway and pituitary tumorigenesis. *Ann Endocrinol (Paris).* 2012;73(2):73-5.
57. Peverelli E, Mantovani G, Lania AG, Spada A. cAMP in the pituitary: an old messenger for multiple signals. *J Mol Endocrinol.* 2014;52(1):R67-77.
58. Vezzosi D, Bertherat J. Phosphodiesterases in endocrine physiology and disease. *Eur J Endocrinol.* 2011;165(2):177-88.
59. Mackenzie KF, Topping EC, Bugaj-Gaweda B, Deng C, Cheung YF, Olsen AE, et al. Human PDE4A8, a novel brain-expressed PDE4 cAMP-specific phosphodiesterase that has undergone rapid evolutionary change. *Biochem J.* 2008;411(2):361-9.
60. Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, et al. Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Hum Mutat.* 2010;31(8):950-60.
61. Trivellin G, Korbonits M. AIP and its interacting partners. *J Endocrinol.* 2011;210(2):137-55.
62. Bolger GB, Bizzi MF, Pinheiro SV, Trivellin G, Smoot L, Accavitti MA, et al. cAMP-specific PDE4 phosphodiesterases and AIP in the pathogenesis of pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(5):419-31.
63. Formosa R, Xuereb-Anastasi A, Vassallo J. Aip regulates cAMP signalling and GH secretion in GH3 cells. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(4):495-505.
64. Wang Z, Liang Y, Zhang L, Zhang N, Liu Q. Phosphodiesterase 4 inhibitor activates AMPK-SIRT6 pathway to prevent aging-related adipose deposition induced by metabolic disorder. *Aging (Albany NY).* 2018;10(9):2394-406.

65. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 2003;546(1):113-20.
66. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 2005;1(1):15-25.
67. Marques MB, Ribeiro-Oliveira A, Guimarães J, Nascimento GF, Anjos AP, Vilas-Boas WW, et al. Modifications in basal and stress-induced hypothalamic AMP-activated protein kinase (AMPK) activity in rats chronically treated with an angiotensin II receptor blocker. *Stress.* 2012;15(5):554-61.
68. Ribeiro-Oliveira A, Marques MB, Vilas-Boas WW, Guimarães J, Coimbra CC, Anjos AP, et al. The effects of chronic candesartan treatment on cardiac and hepatic adenosine monophosphate-activated protein kinase in rats submitted to surgical stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015;16(3):481-7.
69. Pimentel GD, Ropelle ER, Rocha GZ, Carnevalheira JB. The role of neuronal AMPK as a mediator of nutritional regulation of food intake and energy homeostasis. *Metabolism.* 2013;62(2):171-8.
70. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 2007;100(3):328-41.
71. Luo Z, Zang M, Guo W. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncol.* 2010;6(3):457-70.
72. Jia W, Sanders AJ, Jia G, Liu X, Lu R, Jiang WG. Expression of the mTOR pathway regulators in human pituitary adenomas indicates the clinical course. *Anticancer Res.* 2013;33(8):3123-31.

73. Hadad SM, Baker L, Quinlan PR, Robertson KE, Bray SE, Thomson G, et al. Histological evaluation of AMPK signalling in primary breast cancer. *BMC Cancer*. 2009;9:307.
74. Ma J, Guo Y, Chen S, Zhong C, Xue Y, Zhang Y, et al. Metformin enhances tamoxifen-mediated tumor growth inhibition in ER-positive breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2014;14:172.
75. Zulato E, Bergamo F, De Paoli A, Griguolo G, Esposito G, De Salvo GL, et al. Prognostic significance of AMPK activation in advanced stage colorectal cancer treated with chemotherapy plus bevacizumab. *Br J Cancer*. 2014;111(1):25-32.
76. Su RY, Chao Y, Chen TY, Huang DY, Lin WW. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside sensitizes TRAIL- and TNF α -induced cytotoxicity in colon cancer cells through AMP-activated protein kinase signaling. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(5):1562-71.
77. Buckendahl AC, Budczies J, Fiehn O, Darb-Esfahani S, Kind T, Noske A, et al. Prognostic impact of AMP-activated protein kinase expression in ovarian carcinoma: correlation of protein expression and GC/TOF-MS-based metabolomics. *Oncol Rep*. 2011;25(4):1005-12.
78. Sadeghi N, Abbruzzese JL, Yeung SC, Hassan M, Li D. Metformin use is associated with better survival of diabetic patients with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(10):2905-12.
79. Kleinmann N, Duivenvoorden WC, Hopmans SN, Beatty LK, Qiao S, Gallino D, et al. Underactivation of the adiponectin-adiponectin receptor 1 axis in clear cell renal cell carcinoma: implications for progression. *Clin Exp Metastasis*. 2014;31(2):169-83.
80. Aljofan M, Riethmacher D. Anticancer activity of metformin: a systematic review of the literature. *Future Sci OA*. 2019;5(8):FSO410.

81. Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res.* 2007;67(14):6745-52.
82. Yue W, Yang CS, DiPaola RS, Tan XL. Repurposing of metformin and aspirin by targeting AMPK-mTOR and inflammation for pancreatic cancer prevention and treatment. *Cancer Prev Res (Phila).* 2014;7(4):388-97.
83. Jin K, Ruan L, Pu J, Zhong A, Wang F, Tan S, et al. Metformin suppresses growth and adrenocorticotrophic hormone secretion in mouse pituitary corticotroph tumor AtT20 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;478:53-61.
84. An J, Pei X, Zang Z, Zhou Z, Hu J, Zheng X, et al. Metformin inhibits proliferation and growth hormone secretion of GH3 pituitary adenoma cells. *Oncotarget.* 2017;8(23):37538-49.
85. Gao J, Liu Y, Han G, Deng K, Liu X, Bao X, et al. Metformin inhibits growth and prolactin secretion of pituitary prolactinoma cells and xenografts. *J Cell Mol Med.* 2018;22(12):6368-79.
86. Rocha GZ, Dias MM, Ropelle ER, Osório-Costa F, Rossato FA, Vercesi AE, et al. Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth. *Clin Cancer Res.* 2011;17(12):3993-4005.
87. Lee JH, Kim TI, Jeon SM, Hong SP, Cheon JH, Kim WH. The effects of metformin on the survival of colorectal cancer patients with diabetes mellitus. *Int J Cancer.* 2012;131(3):752-9.
88. Pryor R, Cabreiro F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem J.* 2015;471(3):307-22.

89. Tulipano G, Faggi L, Sibilio V, Giustina A. Points of integration between the intracellular energy sensor AMP-activated protein kinase (AMPK) activity and the somatotroph axis function. *Endocrine*. 2012;42(2):292-8.
90. Vazquez-Borrego MC, Fuentes-Fayos AC, Herrera-Martinez AD, F LL, Ibanez-Costa A, Moreno-Moreno P, et al. Biguanides Exert Antitumoral Actions in Pituitary Tumor Cells Through AMPK-Dependent and -Independent Mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(8):3501-13.
91. Christ-Crain M, Kola B, Lolli F, Fekete C, Seboek D, Wittmann G, et al. AMP-activated protein kinase mediates glucocorticoid-induced metabolic changes: a novel mechanism in Cushing's syndrome. *FASEB J*. 2008;22(6):1672-83.
92. Asa SL. Practical pituitary pathology: what does the pathologist need to know? *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(8):1231-40.
93. Kasuki L, Wildemberg LE, Neto LV, Marcondes J, Takiya CM, Gadelha MR. Ki-67 is a predictor of acromegaly control with octreotide LAR independent of SSTR2 status and relates to cytokeratin pattern. *Eur J Endocrinol*. 2013;169(2):217-23.
94. Ribeiro-Oliveira A, Franchi G, Kola B, Dalino P, Pinheiro SV, Salahuddin N, et al. Protein western array analysis in human pituitary tumours: insights and limitations. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(4):1099-114.
95. Bizzi MF, Pinheiro SVB, Bolger GB, Schweizer JROL, Giannetti AV, Dang MN, et al. Reduced protein expression of the phosphodiesterases PDE4A4 and PDE4A8 in AIP mutation positive somatotroph adenomas. *Mol Cell Endocrinol*. 2018.
96. Ezzat S, Forster MJ, Berchtold P, Redelmeier DA, Boerlin V, Harris AG. Acromegaly. Clinical and biochemical features in 500 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1994;73(5):233-40.

97. Capatina C, Wass JA. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: Acromegaly. *J Endocrinol.* 2015;226(2):T141-60.
98. Ronchi CL, Corbetta S, Cappiello V, Morpurgo PS, Giavoli C, Beck-Peccoz P, et al. Circulating adiponectin levels and cardiovascular risk factors in acromegalic patients. *Eur J Endocrinol.* 2004;150(5):663-9.
99. Fahlbusch R, Buchfelder M. Pituitary Surgery. *The Pituitary (Fourth Edition)*2017. p. 671-87.
100. Nomikos P, Buchfelder M, Fahlbusch R. The outcome of surgery in 668 patients with acromegaly using current criteria of biochemical 'cure'. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(3):379-87.
101. Fougner SL, Borota OC, Berg JP, Hald JK, Ramm-Petersen J, Bollerslev J. The clinical response to somatostatin analogues in acromegaly correlates to the somatostatin receptor subtype 2a protein expression of the adenoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68(3):458-65.
102. Landis CA, Harsh G, Lyons J, Davis RL, McCormick F, Bourne HR. Clinical characteristics of acromegalic patients whose pituitary tumors contain mutant Gs protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71(6):1416-20.
103. Yasufuku-Takano J, Takano K, Morita K, Takakura K, Teramoto A, Fujita T. Does the prevalence of gsp mutations in GH-secreting pituitary adenomas differ geographically or racially? Prevalence of gsp mutations in Japanese patients revisited. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;64(1):91-6.
104. Buchfelder M, Fahlbusch R, Merz T, Symowski H, Adams EF. Clinical correlates in acromegalic patients with pituitary tumors expressing GSP oncogenes. *Pituitary.* 1999;1(3-4):181-5.

105. Harris PE, Alexander JM, Bikkal HA, Hsu DW, Hedley-Whyte ET, Klibanski A, et al. Glycoprotein hormone alpha-subunit production in somatotroph adenomas with and without Gs alpha mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75(3):918-23.
106. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature.* 1989;340(6236):692-6.
107. Efstathiadou ZA, Bargiota A, Chrisoulidou A, Kanakis G, Papanastasiou L, Theodoropoulou A, et al. Impact of gsp mutations in somatotroph pituitary adenomas on growth hormone response to somatostatin analogs: a meta-analysis. *Pituitary.* 2015;18(6):861-7.
108. Chahal HS, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M. Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA). *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(7):419-27.
109. Mothojakan N, Ferrau F, Dang M, Barlier A, Chanson P, Occhi G. Polymorphism or mutation? - The role of the R304Q missense AIP mutation in the predisposition to pituitary adenoma. *Endocrine Abstracts: Bioscientifica: Brighton, UK; 2016.* p. P167.
110. Zhou J, Huang W, Tao R, Ibaragi S, Lan F, Ido Y, et al. Inactivation of AMPK alters gene expression and promotes growth of prostate cancer cells. *Oncogene.* 2009;28(18):1993-2002.

ANEXO I : Carta de Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0013.0.203.000-10

Interessado(a): Prof. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 20 de agosto de 2014, a emenda ao projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da evolução de 1000 pacientes operados de adenomas e outros tumores hiposários e neuroendócrinos com implantação de banco destes tumores**":

- o Inclusão de coleta de sangue para extração de DNA de todos os pacientes que consentirem;
- o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 43738914.4.0000.5149

Interessado(a): Prof. Antonio Ribeiro de Oliveira Junior
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 06 de maio de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "**O papel das fosfodiesterases e sua importância para interação com o receptor AIP (proteína com interação com receptor ARIL hidrocarbono) em tumores hipofisários**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Estudo: ESTUDO DA EVOLUÇÃO DE 1000 PACIENTES OPERADOS DE ADENOMAS E OUTROS TUMORES HIPOFISÁRIOS E NEUROENDÓCRINOS, COM IMPLANTAÇÃO DE BANCO DESTES TUMORES

1. Declaro que antes de assinar este documento para dar meu consentimento para participar deste projeto, fui informado (a) sobre as técnicas e métodos utilizados neste estudo, assim como sobre os possíveis desconfortos e os riscos decorrentes de minha participação.
2. Eu tive tempo suficiente para tomar minha decisão e me foi dada oportunidade de fazer perguntas, também recebi uma cópia com um resumo destas informações, assinada pelo investigador, para meu próprio arquivo.
3. Eu entendi que minha **participação é voluntária** e que tenho a liberdade de retirar meu consentimento em qualquer momento, sem dar explicação para isto sei que tal decisão não afetara meus direitos legais nem meu atendimento médico.
4. Compreendi que em qualquer local desse consentimento, onde aparece a palavra “tecido” eu posso substituí-la por qualquer outra amostra que eu decida doar.
5. Eu entendi que minha participação nesse estudo terminará assim que a amostra de tecido tiver sido obtida e toda documentação relevante tenha sido lida e assinada por mim ou pelo responsável legal pela minha participação. Entendo também que minha participação passiva nesse estudo irá durar indefinidamente porque os tecidos por mim doados poderão ser preservados por um grande período de tempo.
6. Meu médico (**o médico pesquisador**) respondeu minhas perguntas e esclareceu minhas dúvidas.
7. Eu permito que meus registros sejam vistos pela equipe da investigação autorizada pela Instituição, pelas Autoridades de Saúde nacionais ou pelo Comitê de Ética, sendo que esses registros serão mantidos com a maior confidencialidade possível. Por isso autorizo também a execução de fotocópias de meu histórico médico para salvarguardar as informações nele contidas, se necessário.
8. Autorizo o envio de amostras de tecidos e/ou exames a um pesquisador da Instituição para análise. Nesta transmissão, serão observados os princípios de proteção de dados.
9. Eu **aceito livremente e voluntariamente** participar nesta pesquisa e declaro que obedecerei às instruções do médico do estudo. Eu assino o presente documento mantendo uma cópia dele e das informações clínicas.
10. Mediante minha assinatura abaixo, eu consinto na doação de tecido retirado em procedimento cirúrgico indicado pelo meu médico assistente. E concordo com sua utilização futura uma vez avaliada e aprovada por um Comitê de Ética em Pesquisa.
 sim não

Assinatura do(a) Paciente: _____

11. Mediante minha assinatura abaixo, eu consinto na doação de blocos de parafina de tecido previamente retirado em procedimento cirúrgico indicado pelo meu médico assistente. E concordo com sua utilização futura em pesquisas avaliadas e aprovadas por um Comitê de Ética em Pesquisa.

sim não

Assinatura do(a) Paciente: _____

12. Mediante minha assinatura abaixo eu consinto na realização de exames de sangue para avaliação dos critérios de exclusão, a saber: Hepatite B, HCV, HIV 1, HIV 2, conforme descrito no folheto de informação.

sim não

Assinatura do(a) Paciente: _____

13. Mediante minha assinatura abaixo, eu consinto na realização de coleta de sangue para extração de DNA. E concordo com sua utilização futura em pesquisas avaliadas e aprovadas por um Comitê de Ética em Pesquisa

sim não

Assinatura do(a) Paciente: _____

14. Em relação a coleta de sangue e a extração do DNA, e o resultado genético (resultado do exame de DNA)

quero colaborar com a realização do exame, mas não quero saber o resultado genético

quero colaborar com a realização do exame e desejo ser informado do resultado genético

não quero colaborar com a realização do exame

Assinatura do(a) Paciente: _____

Nome completo do(a) paciente: _____

Data: _____

Nome completo do Representante Legal (se aplicável): _____

Assinatura do Representante Legal (se aplicável): _____

Data: _____

Nome completo da Testemunha: _____

Nome completo de quem obteve o consentimento: _____

Data: _____

ANEXO III: Média de fluorescência de cada amostra

Amostra	Média de Fluorescência para pAMPK (UA – unidades arbitrárias)	Padrão CAM5.2
GH8	43.06 UA	Esparsamente granulado
GH9	19.17 UA	Densamente granulado
GH10	22.65 UA	Esparsamente granulado
GH11	25.83 UA	Misto
GH12	16.53 UA	Esparsamente granulado
GH13	15.85 UA	Densamente granulado
GH15	18.82 UA	Densamente granulado
GH17	13.66 UA	Densamente granulado
GH18	28.93 UA	Densamente granulado
GH20	22.54 UA	Esparsamente granulado
GH22	19.97 UA	Esparsamente granulado
GH24	24.83 UA	Densamente granulado
GH25	31.11 UA	Esparsamente granulado
GH26	17.91 UA	Densamente granulado
GH27	11.66 UA	Misto
GH28	10.71 UA	Densamente granulado
R304*	19.68 UA	-
Q164X	26.06 UA	-
F269_H275dup	26.88 UA	-
E222*	46.08 UA	-
R304Q	47.16 UA	-



Phosphodiesterases and cAMP Pathway in Pituitary Diseases

Mariana Fornara Bizzol^{1*}, Graeme B. Bolger^{2,3,4*}, Márta Korbonits^{4†} and Antonio Ribarro-Oliviera Jr.^{1†*}

¹ Department of Internal Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, United States, ³ Department of Pharmacology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, United States, ⁴ Centre for Endocrinology, Barts and The London School of Medicine, William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London, London, United Kingdom

OPEN ACCESS

Edited by:

Xiangqun Zhen,
Central South University, China

Reviewed by:

Kjetil Tostøl,
Oslo University Hospital, Norway
Jozsef Vezalek,
University of Malta, Malta

*Correspondence:

Antonio Ribarro-Oliviera Jr.
aribarroj@gmail.com

†These authors have contributed
equally to this work

Present Address:

Graeme B. Bolger,
E2D Pharma LLC, Birmingham, AL,
United States

Specialty section:

This article was submitted to
Pituitary Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 02 October 2018

Accepted: 15 February 2019

Published: 19 March 2019

Citation:

Bizzol MF, Bolger GB, Korbonits M and
Ribarro-Oliviera A Jr (2019)
Phosphodiesterases and cAMP
Pathway in Pituitary Diseases.
Front. Endocrinol. 10:141.
doi: 10.3389/fendo.2019.00141

Human phosphodiesterases (PDEs) comprise a complex superfamily of enzymes derived from 24 genes separated into 11 PDE gene families (PDEs 1–11), expressed in different tissues and cells, including heart and brain. The isoforms PDE4, PDE7, and PDE8 are specific for the second messenger cAMP, which is responsible for mediating diverse physiological actions involving different hormones and neurotransmitters. The cAMP pathway plays an important role in the development and function of endocrine tissues while phosphodiesterases are responsible for ensuring the appropriate intensity of the actions of this pathway by hydrolyzing cAMP to its inactive form 5'-AMP. PDE1, PDE2, PDE4, and PDE11A are highly expressed in the pituitary, and overexpression of some PDE4 isoforms have been demonstrated in different pituitary adenoma subtypes. This observed over-expression in pituitary adenomas, although of unknown etiology, has been considered a compensatory response to tumorigenesis. PDE4A4/5 has a unique interaction with the co-chaperone aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP), a protein implicated in somatotroph tumorigenesis via germline loss-of-function mutations. Based on the association of low PDE4A4 expression with germline AIP-mutation-positive samples, the available data suggest that lack of AIP hinders the upregulation of PDE4A4 protein seen in sporadic somatotrophinomas. This unique disturbance of the cAMP-PDE pathway observed in the majority of AIP-mutation positive adenomas could contribute to their well-described poor response to somatostatin analogs and may support a role in tumorigenesis.

Keywords: phosphodiesterases, cAMP pathway, pituitary, AIP (Aryl hydrocarbon receptor interacting protein), acromegaly, gigantism

INTRODUCTION

Human phosphodiesterases (PDEs) comprise a complex superfamily of enzymes classified into 11 families, encoded by 24 genes representing over 100 different proteins. Many of these genes express several different mRNAs, and the resulting proteins vary widely in their distribution in various tissues and in various intracellular compartments (1).

Amp- Proteína Quinase Ativada (AMPK): O Elo Proteico entre Metabolismo e Câncer

Amp- Activated Protein Kinase (Ampk): The Protein Link Between Metabolism and Cancer

Ana Carolina Guimarães Castro¹, Mariana Ferreira Bizzi^{1*}, Antonio Ribeiro-de-Oliveira-Jr¹

RESUMO

A proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) atua como sensor metabólico e é ativada por aumentos na relação AMP / ATP. Esta proteína suprime a via de sinalização de mamíferos alvo da rapamicina (mTOR) que, quando ativada, estimula proliferação celular e proteção contra apoptose. A via de sinalização mTOR também é regulada pela via de sinalização PI3K / Akt. O adipócito é mediador central da resposta inflamatória em indivíduos obesos e age secretando hormônios como a adiponectina. Além disso, os adipócitos secretam fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e citocinas pró-inflamatórias, que são importantes na patogênese do câncer. Esses fatores aumentam a atividade da via de sinalização PI3K / Akt, estimulando proliferação celular. A relação entre obesidade, hiperinsulinemia, diabetes mellitus tipo 2 e aumento do risco de desenvolver diferentes tipos de câncer é bem conhecida. A adiponectina é essencial na regulação da sensibilidade à insulina e seus níveis circulantes estão inversamente associados à obesidade visceral. Estudos recentes in vitro mostraram correlação significativa entre baixos níveis plasmáticos de adiponectina e vários tipos de cânceres. A adiponectina ativa AMPK e, uma vez ativada, AMPK suprime o complexo mTOR 1 (mTORC1). Do ponto de vista terapêutico, existem drogas disponíveis cujos mecanismos de ação envolvem AMPK. Um desses medicamentos é a metformina, que atua inibindo a gliconeogênese por meio da ativação do AMPK no fígado. Esta revisão consiste numa análise da molécula de AMPK, vias de sinalização, regulação (mTORC1) e metformina, bem como a relação entre obesidade e vários tipos de cânceres.

Palavras-chave: AMPK; Câncer; Metabolismo; Obesidade; Adiponectina

¹ Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina - Belo Horizonte, MG - Brasil

Instituição:

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina - Belo Horizonte, MG - Brasil.

* Autor Correspondente:

Mariana Ferreira Bizzi
E-mail: marianabizzi@yahoo.com.br

Recebido em: 10/02/2020.

Aprovado em: 30/04/2020.