Thais de Paula Sickler

**Análise da expressão da filamina A nos tumores
hipofisários e suas implicações clínicas e terapêuticas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Glezer

Coorientadora: Profa. Dra. Ericka Barbosa Trarbach

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sickler, Thais de Paula

Análise da expressão da filamina A nos tumores
hipofisários e suas implicações clínicas e
terapêuticas / Thais de Paula Sickler. -- São
Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Andrea Glezer.

Coorientadora: Ericka Barbosa Trarbach.

Descritores: 1.Hipófise/patologia 2.Filamina A
3.Receptores de dopamina D2 4.Agonistas de dopamina
5.receptores de somatostatina 6.Octreotida
7.Cabergolina

USP/FM/DBD-503/17

Esse trabalho foi desenvolvido na Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; processo nº 162014/2013-9), bolsa de doutorado direto.

Dedicatória

Dedico esta tese:

Aos meus pais, Marilena e Luciano, pelo apoio incondicional, ajuda e exemplo de boas pessoas.

Aos meus filhos, Lucas e Rafael, por deixarem a vida doce, e repleta de alegrias em todos os seus momentos.

À minha irmã Bruna, por ser sempre sincera e amiga.

E principalmente ao Gabriel, pelo amor presente em cada dia que antecedeu a realização e finalização desse estudo; sem você, eu não conseguiria...

Agradecimentos

- Aos pacientes acompanhados no ambulatório da Unidade de Neuroendocrinologia, por serem gentis mesmo em momentos tão complicados e por contribuírem para esse aprendizado;
- Ao Prof. Dr. Marcello D. Bronstein, chefe da Unidade de Neuroendocrinologia, pelo estímulo e aprendizado constantes;
- À minha orientadora, Dra. Andrea Glezer, pelo ensinamento, paciência e empenho nesses anos de projeto e pelo seu exemplo de dedicação e comprometimento com os pacientes a que assiste;
- A todos os assistentes da Unidade de Neuroendocrinologia Dr. Márcio C. Machado, Dra. Raquel S. Jallad, Profa. Dra. Maria Candida B. V. Fragoso e Dr. Felipe Gaia;
- Às colegas pós-graduandas Ludmilla Malveira, Mariana Guzzo, Ane Caroline Thé B. Freire, Beatriz Sant'Anna, Paula Paes e Clarissa Gregório;
- À minha coorientadora Ericka Trarbach, pelo aprendizado de uma área que eu desconhecia e que passei a admirar;
- Ao LIM-25, especialmente pela ajuda dos amigos Paulo Vinícius Amorim, Amanda Shinzato e Isabella Pacetti;
- Aos assistentes da Unidade de Neurocirurgia Funcional, do Instituto de Psiquiatria, Dra. Nina Rosa Musolino, Dr. Malebranche Berardo Cunha Neto, Dr. Valter Cescato e Dr. Gilberto Ochman, pelo cuidado com que acolhem e assistem os pacientes que são submetidos a cirurgia;
- Às Professoras Titulares da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça e Profa. Dra. Ana Cláudia Latronico, pelo apoio para este projeto;

- Ao Dr. Ellison Fernando Cardoso, do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da FMUSP (INRAD), por ceder seu tempo e conhecimento para análise das ressonâncias magnéticas;
- Ao Departamento de Patologia, ao LIM-14 da FMUSP, ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, ao Dr. Juliano Dettoni e ao Dr. Fernando Frassetto, pela leitura das lâminas e à Sra. Alda Wakamatsu, pelo preparo das reações de imuno-histoquímica;
- À Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, pela ajuda na imuno-histoquímica ao ceder gentilmente o anticorpo da citoqueratina;
- Às secretárias da Endocrinologia e Metabologia, Maria Aparecida da Silva e Rosana Zamboni, e ao secretário Rubens José da Silva, pela atenção, colaboração e suporte em todos esses anos de trabalho;
- Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento à pesquisa e pela bolsa de doutorado direto CNPq- Processo: 162014/2013-9, e à Federic Foundation, pelo apoio financeiro para os experimentos de bancada deste projeto.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação: Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Filamina A.....	1
1.2	Tumores hipofisários	5
1.2.1	Prolactinomas	7
1.2.2	Somatotropinomas	10
1.2.3	Corticotropinomas	16
1.2.4	Adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes.....	20
1.3	Filamina A e resistência ao tratamento medicamentoso nos tumores hipofisários	24
2.	OBJETIVOS.....	26
3.	MÉTODOS.....	27
3.1	Considerações Éticas	27
3.2	População do estudo	27
3.2.1	CrITÉRIOS de inclusão e de exclusão	28
3.3	Análise clínica e laboratorial	28
3.4	Avaliação por exames de imagem.....	29
3.5	Análise histológica diagnóstica	30
3.6	Análise por imuno-histoquímica de FLNA, DRD2, SSTR2, SSTR5, e Ki-67	31
3.7	Avaliação do padrão de granulação de GH nos somatotropinomas	34
3.8	Análise Molecular	34
3.8.1	Extração do RNA de tecido hipofisário.....	35
3.8.2	Síntese do cDNA complementar	35
3.8.3	Estudo de expressão gênica da <i>FLNA</i> , <i>DRD2</i> , <i>SSTR2</i> e <i>SSTR5</i>	35

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1 População estudada.....	38
Características clínicas, laboratoriais e de imagem de cada subtipo tumoral	40
5.2 Resultados de imuno-histoquímica.....	45
5.2.1 Expressão da FLNA	46
5.2.2 Expressão do DRD2	48
5.2.3 Expressão do SSTR2 e SSTR5	50
5.2.4 Correlação entre a expressão de FLNA e os receptores DRD2, SSTR2 e SSTR5	52
5.2.5 Correlações entre a expressão da FLNA e resposta a cabergolina, e entre DRD2 e resposta à cabergolina	54
5.2.6 Correlação entre a expressão de FLNA e resposta aos ligantes de receptor de somatostatina no grupo somatotropinomas	56
5.2.7 Correlação entre expressão de FLNA e critérios de invasividade e agressividade tumorais.....	57
5.3 Resultados da expressão do RNAm e comparação com os resultados da expressão proteica.....	60
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	66
8. ANEXOS	67
9. REFERÊNCIAS	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%ULNR IGF-1	Percentual acima do limite superior do intervalo normal de IGF-1 para idade
ACNF	Adenoma clinicamente não funcionante
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AD	Agonista dopaminérgico
AMPc	AMP cíclico
BRC	Bromocriptina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAB	Cabergolina
cDNA	Fita complementar de DNA
C _T	<i>Cycle treshold</i>
DAP	Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DC	Doença de Cushing
DRD2	Receptor de dopamina subtipo 2
DP	Desvio padrão
<i>et al.</i>	e outros
F	Cortisol sérico

FLNA	Filamina A
Fsalivar	Cortisol salivar
FSH	Hormônio folículo estimulante
FU	Cortisol urinário
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio de liberação das gonadotropinas
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IHQ	Imuno-histoquímica
IRS	Escore de imunorretividade
kDa	Kilodaltons
Ki-67	Marcador de proliferação celular Ki67
LH	Hormônio luteinizante
LRS	Ligantes do receptor de somatostatina
mg	Miligramas
mcg/L	Micrograma por litro
ng/L	Nanograma por litro
ng/ml	Nanograma por mililitro
Oct	Octreotida
Oct-LAR	Octreotida de liberação prolongada

P	Probabilidade de significância
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação de cadeia da polimerase
<i>PPIE</i>	Gene da peptidil-prolil isomerase E
PRL	Prolactina
RDT	Radioterapia
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RQ	Quantificação relativa
RT	Transcrição reversa
siRNA	Pequeno RNA de interferência
SSTR2	Receptor do análogo da somatostatina subtipo 2
SSTR5	Receptor do análogo da somatostatina subtipo 5
TSH	Hormônio tireoestimulante
TTGO	Teste de tolerância à glicose oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação da homodimerização da FLNA, modificado de Nakamura et al ⁽⁴⁾	2
Figura 2 -	Ações da filamina A na expressão do receptor DRD2 e na via de sinalização do receptor SSTR2, em prolactinomas e somatotropinomas, respectivamente. Adaptada de Peverelli et al ⁽¹⁾	4
Figura 3 -	Frequência dos tumores de hipófise, classificados de acordo com secreção hormonal ⁽¹⁹⁾	5
Figura 4 -	Fluxograma após coleta de amostra tumoral, para análise de RNAm e de imuno-histoquímica.....	31
Figura 5 -	Gráfico de caixa IRS da Filamina A	47
Figura 6 -	Fotografia de lâminas de imuno-histoquímica da FLNA, sob microscopia óptica, em aumento de 400 vezes: A - Caso ACTH32; IRS FLNA=9; B - Caso ACTH10a, IRS FLNA=0; C - Controle positivo (hipófise normal)	48
Figura 7 -	Gráfico de caixa do IRS do DRD2.....	49
Figura 8 -	Fotografia de lâminas de imuno-histoquímica do DRD2, sob microscopia óptica, em aumento de 400 vezes: A - Caso ACNF11, IRS DRD2=9; B - Caso ACTH10a, IRS DRD2=0; C - Controle positivo (córtex adrenal).....	49
Figura 9 -	Gráfico de caixa IRS do SSTR2 e do SSTR5	50
Figura 10 -	Fotografia de lâminas de imuno-histoquímica do SSTR2 (A - Caso GH18, IRS SSTR2 = 9; B - Caso GH08, IRS SSTR2=0; C - Controle positivo: pâncreas), e do SSTR5 (D - GH21, IRS SSTR5 = 9; E - GH09, IRS SSTR5 = 0; F - Controle positivo: hipófise normal), sob microscopia óptica, em aumento de 400 vezes.....	51
Figura 11 -	Correlação entre IRS do DRD2 e da FLNA, no grupo ACNF	52
Figura 12 -	Gráfico de caixa IRS da FLNA e do DRD2, no grupo ACNF, categorizando os casos em resistentes e sensíveis ao tratamento com cabergolina	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos sobre expressão de SSTR2 em acromegalia e resposta aos ligantes do receptor de somatostatina	14
Tabela 2 - Séries de casos de pacientes portadores de Doença de Cushing em tratamento clínico com cabergolina	19
Tabela 3 - Séries de casos de pacientes portadores de adenoma clinicamente não funcionantes em tratamento clínico com cabergolina.....	22
Tabela 4 - Resistência medicamentosa nos tumores hipofisários	24
Tabela 5 - Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica da FLNA, DRD2, SSTR2, SSTR5 e Ki-67	32
Tabela 6 - Ensaio utilizado no estudo da expressão gênica por PCR em tempo real	36
Tabela 7 - Características quanto à idade, tamanho tumoral, cirurgias e radioterapia dos pacientes, classificados em grupos de acordo com os subtipos tumorais.....	39
Tabela 8 - Expressão, segundo o IRS, de FLNA, DRD2, SSTR2, SSTR5 nas amostras de hipófises normais	46
Tabela 9 - Expressão da FLNA e do DRD2 e correlação com resposta à cabergolina.....	55
Tabela 10 - Expressão da FLNA, SSTR2 e SSTR5 e correlação com resposta hormonal aos ligantes de receptor de somatostatina em somatotropinomas, incluindo pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico primário.....	56
Tabela 11 - Correlação entre a expressão da FLNA e tamanho tumoral, invasão tumoral (infrasselar e parasselar), número de cirurgias, radioterapia, e expressão de Ki-67	58
Tabela 12 - Correlação entre a expressão da FLNA e invasão tumoral (infrasselar e parasselar) nos corticotropinomas.....	59
Tabela 13 - Correlação entre a expressão do RNAm dos SSTR2 e SSTR5 e a resposta ao uso de ligantes do receptor de somatostatina nos somatotropinomas.....	61

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido, aplicado aos pacientes incluídos no estudo	67
Anexo B - Aprovação da comissão de ética para análise de projetos de pesquisa	70
Anexo C - Procedimento de imuno-histoquímica dos hormônios hipofisários na rotina diagnóstica dos tumores hipofisários.....	72
Anexo D - Procedimentos de imunoperoxidase utilizados para imuno-histoquímica da Filamina A, DRD2, SSTR2, SSTR5 e Ki-67	74
Anexo E - Procedimentos de imunoperoxidase utilizados para imuno-histoquímica do padrão de granulação dos somatotropinomas	76
Anexo F - Características clínicas, laboratoriais e de imagem ao diagnóstico ...	78
Anexo G - Tratamento primário, imuno-histoquímica diagnóstica, número de cirurgias, resposta ao tratamento clínico (CAB e/ou LRS) e necessidade de radioterapia	80
Anexo H - Fluxograma de tratamento cirúrgico e medicamentoso dos pacientes portadores de somatotropinomas.....	85
Anexo I - IRS da FLNA, DRD2, SSTR2, SSTR5 e resultado de Ki-67.....	87
Anexo J - Correlação entre a expressão da filamina A e características de invasividade e agressividade tumorais	91
Anexo K - Expressão gênica (RQ) de <i>FLNA</i> , <i>DRD2</i> , <i>SSTR2</i> e <i>SSTR5</i> nas amostras tumorais de somatotropinomas e de ACNF	94

Resumo

Sickler TP. *Análise da expressão da filamina A nos tumores hipofisários e suas implicações clínicas e terapêuticas* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A filamina A (FLNA) é uma proteína de citoesqueleto com diversas funções, dentre as quais estão motilidade celular e ancoragem de receptores de membrana. A alteração de sua expressão foi anteriormente descrita em diversos tipos de neoplasia. Em tumores hipofisários, demonstrou-se que sua expressão se correlacionou à expressão de receptores de dopamina tipo 2 (DRD2) em prolactinomas, e com a sinalização intracelular do receptor de somatostatina tipo 2 (SSTR2) após ativação por agonista, em somatotropinomas. Neste estudo, avaliaram-se a expressão da FLNA, DRD2, SSTR2 e SSTR5 em diversos tumores hipofisários: prolactinomas, somatotropinomas, corticotropinomas e adenomas clinicamente não funcionantes (ACNF). Avaliou-se também a correlação entre a expressão da FLNA e resposta aos tratamentos medicamentosos, com agonista dopaminérgico (AD) ou com ligantes do receptor de somatostatina (LRS), e entre FLNA e as características de invasividade e/ou agressividade tumorais. Houve correlação entre a expressão de FLNA e a expressão de DRD2 e, entre FLNA e a resposta ao AD, nos ACNFs. Nos corticotropinomas, houve correlação entre a expressão da FLNA e critérios de invasividade tumoral. Portanto, o papel da FLNA nos tumores hipofisários pode depender do tipo celular implicado. Além disso, o envolvimento da FLNA nos mecanismos de resistência aos medicamentos utilizados nos tumores hipofisários, AD ou LRS, não deve estar relacionado apenas à sua ação na ancoragem e reciclagem dos receptores DRD2 e SSTRs, mas também à sua ação na motilidade celular, propiciando características de invasividade.

Descritores: hipófise/patologia; filamina A; receptores de dopamina D2; agonistas de dopamina; receptores de somatostatina; octreotida; cabergolina.

Summary

Sickler TP. *Analysis of filamin A expression in pituitary tumors and its clinical and therapeutic correlations* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Filamin A (FLNA) is a cytoskeletal protein with a variety of functions, including cell motility and membrane receptor anchorage. Changes in FLNA expression has already been described in several types of neoplasia. In pituitary tumors, its expression has been shown to correlate with the expression of dopamine type 2 receptors (DRD2) in prolactinomas and with intracellular somatostatin type 2 receptor (SSTR2) signaling after agonist activation in somatotropinomas. The expression of FLNA, DRD2, SSTR2 and SSTR5 in different pituitary tumors: prolactinomas, somatotrophinomas, corticotrophinomas and clinically nonfunctioning adenomas (CNFA) were evaluated. We also correlate FLNA expression to sensibility to drug treatments with dopamin agonists (DA) or somatostatin receptor ligands (SRL), and to tumor invasiveness and/or aggressiveness. Positive correlation between FLNA expression and DRD2 expression and between FLNA and DA response were found in CNFA. In corticotrophinomas, there was correlation between FLNA expression and tumor invasiveness. Therefore, the role of FLNA in pituitary tumors seems to depend on the cell type involved. Additionally, FLNA involvement in the mechanisms of drug (DA or SRL) resistance in pituitary tumors could not be related only to its action in the anchoring and recycling of DRD2 and SSTR receptors, but also to its action on cellular motility and invasiveness.

Descriptors: pituitary gland/pathology; filamin A; receptors, dopamine D2; dopamine agonists; receptors, somatostatin; octreotide; cabergoline.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Filamina A

O citoesqueleto celular é estrutura importante para localização de organelas, morfologia, migração, adesão e divisão celular. Adicionalmente, participa da transdução do sinal extracelular e da regulação da atividade de receptores. Os três principais componentes estruturais do citoesqueleto são os microtúbulos, os filamentos intermediários e os microfilamentos. Estes últimos derivam da polimerização da actina globular monomérica. A regulação da polimerização, despolimerização e o processo de reticulação da actina formando “pacotes” e redes depende da presença de proteínas ligadoras à actina, como as filaminas ⁽¹⁾.

A filamina A (FLNA), juntamente com as filaminas B e C, faz parte da família das actinas, cujos produtos advêm de diferentes genes ⁽²⁾. O gene da FLNA localiza-se no cromossomo X região q28, tem 48 éxons e codifica uma proteína de 280 kDa ^(3, 4). A função primária da FLNA é garantir a morfologia celular ^(4, 5), além de coordenar interações entre receptores transmembrânicos e o citoesqueleto ^(6, 7). A FLNA forma dímeros em forma de “V”, por meio de sua porção carboxiterminal, estando a porção N terminal livre para ligação com actina, e os segmentos Rod 1 e Rod 2 disponíveis para ligação com outras proteínas, conforme ilustração da Figura 1 ^(4, 8).

Figura 1 - Representação da homodimerização da FLNA, modificado de Nakamura et al ⁽⁴⁾

Mutações no gene *FLNA* resultam em anomalias em diversos tipos celulares e tecidos, como heterotopia periventricular cerebral e má formação do córtex cerebral ^(9, 10); além de doenças cardíacas valvares como a distrofia valvular mixomatosa ⁽¹¹⁾ e a síndrome de Ehlers-Danlos ⁽¹⁰⁾. Mutações letais são mais frequentes em indivíduos do gênero masculino ⁽¹⁰⁾.

Adicionalmente, alterações na expressão da FLNA têm sido implicadas em diversas neoplasias ⁽¹²⁾. Em câncer de cólon, neuroblastoma e pâncreas, por exemplo, há descrição de aumento da expressão, enquanto que sua redução foi descrita em câncer de nasofaringe, estômago e de rins ^(12, 13). Em câncer de mama e melanoma, tanto o aumento como a redução da expressão da FLNA foram implicados com progressão tumoral ^(12, 13). Alguns autores

discutem que essa diferença na expressão pode ser explicada pelo tipo celular envolvido, proteínas que ligam-se à FLNA, bem como localização celular da FLNA ⁽¹²⁾.

Em melanomas, autores apontaram para a importância da FLNA na estabilidade do receptor de dopamina subtipo 2 (DRD2) na membrana celular ⁽¹⁴⁾. Em seguida, Lania *et al.* ⁽¹⁵⁾ avaliaram a influência da FLNA na expressão de DRD2 em lactotrofos, em cultura primária de prolactinomas, sensíveis e resistentes aos agonistas dopaminérgicos (AD), bem como em culturas de linhagens imortalizadas tumorais de células MMQ e GH3. As células MMQ secretam prolactina (PRL) e expressam DRD2, enquanto que as células GH3 secretam PRL e hormônio de crescimento (GH) e não expressam DRD2. Houve correlação entre a expressão da FLNA e de DRD2 ($p < 0,05$) na imunohistoquímica, sendo maior em prolactinomas sensíveis quando comparados aos tumores resistentes aos AD. O silenciamento da FLNA, com o uso de siRNA em células MMQ e em cultura de prolactinomas sensíveis aos AD, promoveu redução dos níveis de DRD2 em 60%, enquanto que a transfecção de FLNA nas culturas de prolactinomas resistentes aos AD aumentou a expressão de DRD2. Por meio de estudos de imunofluorescência, Lania *et al.* verificaram que na ausência de FLNA, os receptores DRD2 localizaram-se preferencialmente nas vesículas citoplasmáticas, enquanto que, nas células que expressaram FLNA, os receptores DRD2 localizaram-se preferencialmente na membrana celular ⁽¹⁵⁾. Portanto, a presença da FLNA foi fundamental para que, no ciclo do DRD2, os receptores retornassem preferencialmente à membrana celular em vez de serem degradados nos lisossomos. Por sua vez, a expressão de DRD2 na superfície celular foi associada à redução da secreção de PRL e da proliferação celular, em

culturas primárias de células de prolactinomas e de células MMQ, com o tratamento com AD. O mesmo grupo de pesquisadores avaliou a expressão da FLNA em somatotropinomas humanos e em cultura de células, e não houve correlação entre a FLNA e a expressão do receptor de somatostatina do subtipo 2 (SSTR2) ⁽¹⁶⁾. No entanto, a FLNA parece ser importante na estabilização e nas vias de sinalização do SSTR2 ⁽¹⁶⁾, o que poderia influenciar a responsividade de pacientes com acromegalia ao tratamento farmacológico com os ligantes de receptor de somatostatina (LRS).

O papel da FLNA na expressão do DRD2 em prolactinomas e na via de sinalização do SSTR2 em somatotropinomas proposto por Peverelli *et al.* ⁽¹⁾ está esquematizado na Figura 2, a seguir:

Figura 2 - Ações da filamina A na expressão do receptor DRD2 e na via de sinalização do receptor SSTR2, em prolactinomas e somatotropinomas, respectivamente. Adaptada de Peverelli et al ⁽¹⁾

No entanto, a influência da FLNA na expressão de DRD2 em prolactinomas e na expressão e ação do SSTR2 em somatotropinomas, bem como seu papel em outros tumores hipofisários, precisa ser confirmada ⁽¹⁵⁾.

1.2 Tumores hipofisários

Os tumores hipofisários representam 15% dos tumores intracranianos ⁽¹⁷⁾ e mais de 90% das lesões selares ⁽¹⁸⁾. Em sua grande maioria, são adenomas e raramente apresentam metástases, o que definiria o carcinoma de hipófise ⁽¹⁷⁾.

Os tumores hipofisários podem ser classificados de acordo com sua secreção hormonal em prolactinomas, que representam 50% dos casos; adenomas clinicamente não funcionantes (ACNF) que perfazem 30% dos casos; somatotropinomas, de 15% a 20%; corticotropinomas, de 5% a 10%, sendo mais raros os gonadotropinomas e tireotropinomas ⁽¹⁹⁾. A Figura 3 ilustra a frequência dos tipos de tumores de hipófise, classificados de acordo com a secreção hormonal.

ACNF: adenoma clinicamente não funcionante

Figura 3 - Frequência dos tumores de hipófise, classificados de acordo com secreção hormonal ⁽¹⁹⁾

Adicionalmente, os tumores hipofisários podem ser classificados de acordo com as dimensões do maior diâmetro em microadenomas (menores que 1 cm), macroadenomas (maiores ou iguais a 1 cm) ou ainda, tumores gigantes, cujo o maior diâmetro mede mais de 4 cm ⁽²⁰⁾.

O quadro clínico do paciente portador de tumor hipofisário pode compreender sinais e sintomas decorrentes da hipersecreção hormonal, bem como de efeito de massa, nos macroadenomas, com sintomas neurológicos (cefaléia, perda visual, compressão de nervos cranianos) e/ou de disfunção hipofisária por compressão da hipófise anterior ou da haste hipofisária ⁽¹⁸⁾.

Apesar de os tumores hipofisários serem na sua maioria benignos, 25% a 55% apresentam invasão local ⁽²¹⁾, fato que dificulta a remissão com o tratamento cirúrgico. O critério de invasão pode ser avaliado por meio de exames de imagem, como a ressonância magnética, possibilitando estudar a relação entre a massa tumoral e estruturas vizinhas, como seios cavernosos, seio esfenoidal e quiasma óptico. Por meio desses exames, pode-se utilizar a classificação de Hardy modificada, que avalia a invasão infrasselar e suprasselar ⁽²⁰⁾, bem como a classificação de Knosp, que avalia o grau de invasão parasselar, em provável no grau 3 (extensão tumoral ultrapassa linha intercarotídea lateral) e confirmada no grau 4 (lesão engloba totalmente os segmentos intracavernosos da artéria carótida) ⁽²²⁾. De forma mais precisa, as invasões tumorais óssea (clivus ou esfenóide), de dura-máter e de seio cavernoso podem ser confirmadas pelo neurocirurgião, no intra-operatório ^(20, 23).

A invasividade pode ser uma das características de agressividade tumoral ⁽²⁴⁾. Em geral, tumores hipofisários agressivos são definidos pela dificuldade no manejo devido ao seu tamanho, invasividade, rápido crescimento, recorrência e múltiplas modalidades terapêuticas ⁽²⁰⁾.

Até meados de 2017, a classificação dos tumores hipofisários vigente foi a terceira edição da Organização Mundial de Saúde (OMS), de 2004, que os divide em típicos, atípicos e carcinomas, de acordo com a presença de marcadores de proliferação celular (Ki-67 e índice mitótico) e positividade nuclear para o *TP53*. Por essa classificação, os adenomas atípicos, (caracterizados por ao menos dois dos seguintes marcadores: elevado índice mitóticos >2 mitoses por campo, Ki-67 acima de 3% e intensa positividade para o *TP53*) apresentam maior potencial de agressividade, quando comparados aos adenomas típicos. No entanto, considera-se atualmente que a combinação de sinais de invasividade em exames de imagem, especialmente parasselar, com marcadores de proliferação celular presentes, como o Ki-67, seriam mais específicos e sensíveis na predição de agressividade tumoral e a necessidade de terapêutica multimodal ⁽²⁵⁾. Recentemente, a OMS elaborou a quarta edição da classificação de tumores endócrinos da hipófise anterior, eliminando o termo “adenoma atípico”. No entanto, a avaliação do potencial de proliferação tumoral pela histopatologia, como a utilização do índice mitótico e do Ki-67, para identificação de casos mais agressivos, foi mantida ⁽²⁶⁾.

Portanto, avaliar os mecanismos envolvidos na invasidade e agressividade dos tumores hipofisários é importante para melhor abordagem terapêutica.

1.2.1 Prolactinomas

Os prolactinomas apresentam prevalência de 100 casos por milhão ⁽²⁷⁾, acometendo mais comumente mulheres, entre a segunda e a quinta décadas de vida, sendo os microadenomas mais frequentes ⁽²⁸⁾. O quadro clínico

característico da hiperprolactinemia pode compreender a galactorréia e o hipogonadismo hipogonadotrófico (alterações menstruais, disfunção erétil, infertilidade e redução da libido) ⁽²⁹⁾.

Os AD são o tratamento de escolha, por promoverem normalização dos níveis de PRL e redução tumoral em cerca de 80% dos casos ⁽³⁰⁾. Em nosso meio, os AD disponíveis são a bromocriptina (BRC) e a cabergolina (CAB). A utilização de BRC pode promover normalização dos valores de PRL sérica em 80% de microprolactinomas e em 70% dos macroprolactinomas, enquanto que com a CAB, esse objetivo é alcançado em 85% dos pacientes ⁽³¹⁾. Colao *et al.* mostraram que, com o uso da CAB, houve redução tumoral significativa em macroprolactinomas (maior que 20% do volume) em mais de 80% dos casos tratados, por 12 a 24 meses, além do desaparecimento da massa tumoral em 26% a 36% deles ^(32, 33). Dessa forma, a sensibilidade aos AD é caracterizada pela normalização dos níveis séricos de PRL e/ou redução das dimensões tumorais ⁽³⁴⁾. Vale lembrar que, quando há intolerância aos AD, o tratamento clínico pode não ser possível ⁽³⁵⁾.

Não há uniformidade na literatura quanto à definição de resistência aos AD: alguns autores consideram a não normalização dos níveis de PRL, outros a ausência de restauração de ovulação ou, ainda, a não redução da hiperprolactinemia em ao menos 50% do valor inicial ^(36, 37). Outros autores ainda incluem o critério de não redução tumoral na definição de resistência ⁽³⁸⁾. Em geral, com o uso de AD, a normalização dos níveis de PRL é acompanhada por substancial redução do tamanho tumoral. No entanto, em algumas situações de seletiva resistência, há discordância entre as respostas de redução de PRL e da massa tumoral ⁽³⁸⁾. Outro ponto de discussão na literatura é a dose de CAB

para definição de resistência. Alguns autores a definem na ausência de normalização dos níveis de prolactina com 2 mg semanais, dose máxima na bula da medicação ^(39, 40). Já Delgrange *et al.* estratificaram os pacientes em portadores de resistência completa, na ausência de normalização dos níveis de PRL com o uso de CAB 3,5 mg semanais por um ano e, em parcialmente resistentes, quando da normalização da PRL sérica em dose maior que 2 mg semanais de CAB ⁽⁴¹⁾. Nos casos de resistência parcial, além de estratégias como o aumento da dose de CAB ⁽⁴²⁾, a remoção parcial de massa tumoral por cirurgia (*debulking*) pode ser adotada ⁽⁴³⁾. Diversos são os mecanismos implicados na resistência ao AD, sendo o mais importante a redução de expressão do DRD2 ⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾.

O gene *DRD2* localiza-se no cromossomo 11q23 e apresenta apenas um éxon, com 87 pares de bases ⁽⁴⁸⁾. O DRD2 é o único subtipo de receptor de dopamina expresso na hipófise ⁽⁴⁹⁾ e apresenta duas variantes, a forma curta (DRD2C) e a forma longa (DRD2L), geradas por *splicing* alternativo ^(50, 51). Os AD acoplam-se aos DRD2, promovendo a redução da síntese e da secreção hormonal, decorrentes da redução dos níveis de AMP cíclico (AMPC) e de cálcio intracelulares, além da diminuição da proliferação celular e aumento da apoptose ^(52, 53).

A expressão do DRD2 parece ser fundamental, mas não suficiente, para a resposta aos AD ^(54, 55). Ademais, alguns autores demonstraram que mecanismos pós-receptor podem estar implicados na resistência, como o encontro de menores níveis de proteína G inibitória em prolactinomas resistentes à BRC ⁽⁵⁶⁾. Em estudos *in vitro* de amostras de prolactinomas que apresentaram crescimento tumoral na vigência de tratamento com AD, a ligação com um agonista

dopaminérgico levou ao aumento paradoxal da atividade da adenilato ciclase ⁽⁴⁵⁾. Outros mecanismos implicados na resistência aos AD, ainda que com resultados conflitantes são: expressão predominante de isoforma longa de DRD2 ^(46, 57) e polimorfismos do *DRD2* ^(58, 59).

O tratamento cirúrgico em prolactinomas está indicado nos casos de resistência parcial ou completa aos AD, intolerância persistente aos AD, apoplexia, fístula liquórica ou tração do quiasma óptico por redução tumoral rápida e intensa em casos sensíveis, ou ainda, microadenoma circunscrito em paciente que opta por intervenção cirúrgica ^(30, 38, 60).

Gillam *et al.* analisaram séries cirúrgicas e encontraram taxa média de remissão de 74,7% e de recorrência de 18,2% nos microprolactinomas e taxa média de remissão de 33,9%, com recorrência de 22,8%, nos macroprolactinomas ⁽³⁸⁾.

A radioterapia é raramente indicada nos prolactinomas, limitando-se a casos invasivos e/ou agressivos, com falha nas terapêuticas clínica e cirúrgica, objetivando parada de crescimento tumoral. A normoprolactinemia é obtida em cerca de 30% dos casos ^(38, 61, 62).

1.2.2 Somatotropinomas

Os somatotropinomas, tumores que secretam autonomamente hormônio de crescimento (GH), são a principal causa de gigantismo e de acromegalia, com prevalência de 38 a 69 casos por milhão de indivíduos e incidência de três a quatro casos por milhão por ano. A acromegalia, muito mais frequente que o gigantismo, ocorre com igual frequência em homens e em mulheres, comumente entre a quarta e a quinta décadas de vida ^(63, 64), sendo macroadenomas em mais de 75% dos casos ⁽⁶⁵⁾.

Os somatotropinomas podem ser classificados de acordo com a presença de grânulos de GH, por microscopia eletrônica ou imunohistoquímica, em esparsamente ou densamente granulados. Cerca de 25% dos adenomas secretores de GH secretam também prolactina ⁽⁶⁵⁾.

O diagnóstico de acromegalia é confirmado pela dosagem de GH basal e durante o teste de tolerância à glicose oral (TTGO), além da dosagem de fator de crescimento insulina-símile tipo 1 (IGF-1). A dosagem basal de GH menor do que 0,4 ng/mL, associada à dosagem de IGF-1 normal para idade, excluem o diagnóstico de acromegalia, enquanto que, níveis de GH acima de 0,4 ng/mL no basal e que não suprimem para valores menores que 0,4 ng/mL no TTGO, associados a níveis elevados de IGF-1, confirmam a condição ⁽⁶⁶⁾.

Os objetivos do tratamento são o controle hormonal e a redução tumoral. O controle hormonal é caracterizado por níveis de GH randômicos menores do que 1 ng/mL e níveis normais de IGF-1 para idade ^(66, 67).

A cirurgia é o tratamento de primeira escolha para acromegalia ⁽⁶⁵⁾, exceto em casos de macroadenomas invasivos sem comprometimento visual e com baixa chance de remissão cirúrgica, pacientes sem condições clínicas para serem submetidos ao procedimento, ou, ainda, recusa do paciente a esse procedimento. Nesses casos, e naqueles em que não houve remissão após a cirurgia, o tratamento clínico está indicado ⁽⁶⁸⁾. Após a cirurgia, a normalização dos níveis séricos de IGF-1 é obtida em 80% dos pacientes com microadenomas e em 50% daqueles com macroadenomas ^(69, 70). A eficácia do tratamento cirúrgico se correlaciona inversamente com as dimensões tumorais e com os níveis pré-operatórios de GH e de IGF-I ⁽⁶⁵⁾.

Opções terapêuticas farmacológicas são os ligantes de receptor de somatostatina (LRS), AD e antagonista do receptor do GH.

Em pacientes com pequenas elevações séricas de IGF-1 e sinais e sintomas leves de acromegalia, pode-se considerar a CAB como terapia inicial ⁽⁷¹⁾. Em metanálise sobre tratamento primário ou adjuvante com CAB, evidenciou-se controle da secreção de GH em cerca de um terço dos pacientes ⁽⁷²⁾. A expressão do DRD2 em somatotropinomas foi avaliada apenas por Ferone *et al.* ⁽⁷³⁾, que observaram associação entre a expressão do receptor e redução dos níveis de GH com o AD quinagolida *in vitro*, porém não *in vivo*.

Com relação à eficácia dos LRS, Melmed *et al.* realizaram metanálise incluindo 4.464 pacientes e evidenciaram normalização do IGF-1 e controle do GH, em níveis abaixo de 2,5 ng/ml, em mais de 50% dos pacientes ⁽⁷⁴⁾. Nos pacientes parcialmente controlados com os LRS de primeira geração, o controle hormonal pode ser obtido após associação à CAB. Dados publicados anteriormente pelo nosso grupo mostraram controle hormonal (GH <2,5 ng/mL e IGF-1 normal) em 41% dos pacientes com LRS, com tratamento primário e/ou secundário ⁽⁷⁵⁾, e normalização dos níveis de IGF-1 em 56% e de GH (<2,5 ng/ml) em 71% dos casos em LRS com doença ativa, após a adição de CAB ⁽⁷⁶⁾. Considerando os LRS como primeira linha de tratamento clínico na acromegalia, identificar os mecanismos associados à sua resistência são de suma importância. Define-se resistência aos LRS, a ausência de controle bioquímico e de redução tumoral (em mais de 20% do volume inicial), com doses habituais das medicações (OCT-LAR 20 mg a 30 mg mensal), por pelo menos 12 meses ^(77, 78).

Dentre os fatores relacionados à resistência, vale ressaltar parâmetros clínicos (gênero masculino ⁽⁷⁹⁾, idade mais jovem ⁽⁸⁰⁾, maior tamanho e invasividade tumoral ^(81, 82), hipersinal nas aquisições em T2 na ressonância selar ⁽⁸³⁾) e histopatológicos (menor expressão SSTR2 ^(73, 84-86), menor relação SSTR2/SSTR5 ⁽⁸⁴⁾ e padrão esparsamente granulado ⁽⁸⁷⁾).

A expressão predominante de SSTR2 e de SSTR5 nos somatotropinomas já foi demonstrada em estudos de expressão molecular ⁽⁸⁸⁾ e proteico ⁽⁸⁹⁾. O gene *SSTR2* localiza-se no cromossomo 17q25.1 ⁽⁹⁰⁾ e apresenta um éxon e um íntron que, por *splicing* alternativo, gera duas variantes do receptor: a isoforma longa (SSTR2A), dominante, e a isoforma curta (SSTR2B) ^(91, 92). O gene *SSTR5* localiza-se no cromossomo 16p13.3 ^(92, 93). Alguns autores demonstraram que, nos somatotropinomas, o subtipo mais expresso foi o SSTR2 (95%), seguido do SSTR5 (85%), enquanto que SSTR1 e SSTR3 são encontrados em menor número de casos ⁽⁸⁸⁾. Outros autores identificaram o SSTR5 como o subtipo mais abundante, seguido pelo SSTR2 ⁽⁹⁴⁾. Os adenomas secretores de GH e de PRL apresentam maior expressão de SSTR5 ⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾. A ativação do SSTR2 e do SSTR5 promove redução da secreção de GH, bem como das dimensões tumorais, por ações antiproliferativas e pró-apoptóticas, respectivamente ^(98, 99).

Os LRS de primeira geração (octreotida e lanreotida) apresentam maior afinidade ao SSTR2 e sabe-se que a expressão tumoral desse receptor é um dos principais fatores determinantes na resposta a essas drogas. Há sete estudos que avaliaram a expressão de SSTR2 em portadores de acromegalia e sua relação com a resposta aos LRS, sendo positiva em seis deles ^(84-86, 100-102), e negativa em um único estudo ⁽¹⁰³⁾. Em um dos estudos, houve maior expressão de SSTR2 nos subtipos tumorais densamente granulados, corroborando para descrição prévia que esse padrão de granulação associa-se à melhor resposta aos LRS ⁽¹⁰²⁾. Vale ressaltar que os estudos não são uniformes quanto à inclusão de pacientes tratados com LRS previamente à cirurgia; os critérios hormonais utilizados para definição de resposta, o tipo de avaliação da expressão de SSTR2 (molecular vs proteica), e, por fim, o tipo de anticorpo anti-SSTR2 utilizado na imuno-histoquímica (IHQ). A Tabela 1, a seguir, compila os estudos sobre expressão do SSTR2 e resposta ao LRS de primeira geração.

Tabela 1 - Estudos sobre expressão de SSTR2 em acromegalia e resposta aos ligantes do receptor de somatostatina

Autor, ano	Nº casos	Nº casos cirurgia/ LRS como tratamento primário	Expressão SSTR2	Critérios de resposta hormonal	Resultados
Taboada <i>et al.</i> 2008 ⁽⁸⁴⁾	22	22/-	PCR	GH < 2,5ng/mL e IGF-1 nl	- Correlação inversa entre SSTR5 e redução do GH com LRS - Correlação positiva entre resposta LRS e SSTR2/SSTR5
Casarini <i>et al.</i> 2009 ⁽¹⁰¹⁾	19	6/13	PCR e IHQ	GH < 2,5 ng/mL e IGF-1 nl	- SSTR5 foi o mais frequente - Correlação SSTR2 e resposta aos LRS
Wildenberg <i>et al.</i> 2013 ⁽⁸⁵⁾	88	30/58	IHQ	GH < 1,0 ng/mL	- Correlação entre redução de SSTR2 e resistência aos LRS
Casar-Borota <i>et al.</i> 2013 ⁽¹⁰⁰⁾	65	37/28	IHQ	IGF-1 nl	- Correlação entre SSTR2 e resposta ao LRS; - Expressão do SSTR2 reduzido após uso de LRS.
Brzana <i>et al.</i> 2013 ⁽¹⁰²⁾	52	70/-	IHQ	IGF1 nl e GH <1,0 ng/mL	- Expressão SSTR2 depende do subtipo tumoral :100% DG, 50% EG, 95% mistos PRL - Correlação entre ausência do SSTR2 e reabordagem cirúrgica
Gatto <i>et al.</i> 2013 ⁽⁸⁶⁾	36	25/11	PCR em 25 IHQ em 25	IGF-1 nl	- Correlação positiva entre SSTR2 e resposta ao LRS
Gonzalez <i>et al.</i> 2014 ⁽¹⁰³⁾	60	24/36	PCR em 23 IHQ em 24	GH<2,5 ng/mL e IGF-1 nl	- Sem correlação entre RNAm SSTR2, SSTR5 e resposta ao LRS

DG: densamente granulados; EG: esparsamente granulado; IHQ: imuno-histoquímica; LRS: ligante do receptor de somatostatina; nl: normal; PRL: prolactina; PCR: reação em cadeia da polimerase.

Através de análise por IHQ, demonstrou-se que a localização do SSTR2 e do SSTR5 é predominantemente citoplasmática ⁽¹⁰³⁾. No entanto, há autores preconizando que somente a presença dos receptores na membrana deva ser analisada, com a justificativa de que apenas esses refletem o seu estado funcional ^(104, 105), enquanto que a localização preferencialmente citoplasmática poderia estar associada à internalização dos receptores, implicando em resistência e taquifilaxia ^(100, 106).

Além da expressão de SSTR2, o balanço entre essa e a expressão de SSTR5 parece estar implicado na resposta aos LRS. A baixa expressão de SSTR2 e predominância de SSTR5 são encontrados em casos parcialmente responsivos ^(102, 107, 108), e alguns autores demonstraram associação entre a relação SSTR2/SSTR5 e resposta aos LRS ⁽¹⁰⁹⁾. Taboada *et al.* ⁽⁸⁴⁾ mostraram correlação negativa entre o RNAm do SSTR5 e a porcentagem de redução dos níveis de GH, com tratamento com octreotida LAR. Além disso, observaram que a relação de 1,3 entre SSTR2/SSTR5 foi fator preditor de controle hormonal. Adicionalmente, há mecanismos pós-receptor SSTR2 envolvidos na resistência aos LRS ⁽¹¹⁰⁾. Proteínas, como as β -arrestinas 1 e 2, formam complexos com receptores acoplados à proteína G, como o SSTR2, conduzindo-os à internalização. Após a desfosforilação do receptor e a dissociação com β -arrestina, o SSTR2 pode retornar à superfície celular para ligar-se ao LRS ⁽¹¹¹⁾.

O LRS de nova geração, pasireotida, liga-se preferencialmente ao SSTR5, podendo ser indicado nos casos de resistência aos LRS de primeira geração, que apresentam maior afinidade ao SSTR2. Em estudo de fase III, 17,3% dos pacientes que tiveram controle bioquímico inadequado, após 12 meses de tratamento com octreotida LAR, alcançaram o controle após a mudança de tratamento para pasireotida LAR ⁽¹¹²⁾.

Outra opção terapêutica na acromegalia é o pegvisomanto, antagonista seletivo do receptor do GH, capaz de levar à inibição da ação do GH por competição e, conseqüentemente, à redução das concentrações séricas do IGF-1. A normalização de IGF-1 sérico ocorre em até 90% dos pacientes com doses diárias de 20mg ⁽¹¹³⁾.

A radioterapia é indicada como terceira linha de tratamento para pacientes nos quais não houve controle do crescimento tumoral ou normalização dos níveis hormonais com cirurgia e/ou tratamento medicamentoso. A radioterapia convencional pode reduzir os níveis de GH e normalizar o IGF-1 em mais de 60% dos pacientes em 10 a 15 anos ⁽¹¹⁴⁾.

1.2.3 Corticotropinomas

A incidência dos corticotropinomas é de 0,2 a 1,7 caso por milhão de indivíduos por ano, sendo muito mais comum no gênero feminino ⁽¹¹⁵⁾. Geralmente são microadenomas, sendo os macroadenomas observados em 5% a 10% dos casos ⁽¹¹⁶⁾.

A Síndrome de Cushing endógena é caracterizada por hipercortisolismo, perda do ritmo circadiano da secreção de cortisol e perda da alça de retroalimentação negativa do cortisol. A causa mais frequente da Síndrome de Cushing endógena, correspondente a 80% dos casos, é a Doença de Cushing (DC), caracterizada pela secreção autônoma de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) por tumor hipofisário. A investigação laboratorial extensa e avaliação por imagem são necessárias para o diagnóstico correto ⁽¹¹⁷⁾.

Os exames recomendados para triagem de DC incluem o teste de supressão com 1 mg de dexametasona, dosagem de cortisol livre em urina (FU) de 24 horas e dosagem de cortisol salivar à meia-noite (F salivar). Para estabelecer o diagnóstico da Síndrome de Cushing são necessários ao menos dois de três testes alterados ⁽¹¹⁸⁾.

Após a confirmação de hipercortisolismo, a dosagem de ACTH plasmático é fundamental para caracterizar a Síndrome em ACTH-dependente (Doença de Cushing e tumores com secreção ectópica de ACTH) ou independente (tumores adrenais secretores de cortisol). Em radioimunoensaios convencionais, o valor de dosagem de ACTH utilizado para essa distinção é de 10 ng/L ⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾. Confirmado o hipercortisolismo ACTH dependente, a avaliação hipofisária com ressonância magnética de hipófise é realizada. Caso não seja possível visualização tumoral, prossegue-se a investigação com cateterismo de seios petrosos para determinação do gradiente de cortisol ⁽¹²⁰⁾.

O objetivo do tratamento é normalização do hipercortisolismo, avaliado através de dosagens de FU normais. No período pós-operatório imediato, os níveis de F sérico menores que 2 mcg/dl estão associados à remissão ⁽¹²¹⁾.

O tratamento de primeira escolha da DC é a cirurgia, frequentemente por via transesfenoidal, levando à remissão em 73% a 76% dos casos. Nos macroadenomas, a remissão é inferior a 43%. A taxa de recorrência após a cirurgia varia de 23% a 33%, sendo menor em microadenomas ⁽¹²²⁾. O tratamento farmacológico é utilizado quando a etiologia não foi definida, no preparo pré-operatório de pacientes com hipercortisolismo grave, ou, mais frequentemente, após falha do tratamento cirúrgico ⁽¹²²⁾.

O mecanismo de ação das principais drogas utilizadas é: bloqueio do receptor de glicocorticóide, inibição da esteroidogênese adrenal, como o cetoconazol, e ação direta no tumor hipofisário, como a CAB e o LRS de nova geração ⁽¹²²⁾.

Em 2004, publicou-se o relato de controle do hipercortisolismo com o uso de CAB em um paciente com Doença de Cushing, sem remissão após a cirurgia ⁽¹²³⁾. No mesmo ano, Pivonello *et al.* demonstraram a expressão proteica do DRD2 em 75% de 15 corticotropinomas avaliados e uma tendência na associação entre a expressão do DRD2 e a resposta clínica à CAB ($P = 0,067$), sendo que todos os pacientes responsivos a CAB expressavam DRD2 e, entre os não-responsivos, havia expressão em apenas um deles ⁽¹²⁴⁾. Há sete séries de casos de pacientes com Doença de Cushing, sem remissão após o tratamento cirúrgico, submetidos ao tratamento com CAB ⁽¹²⁴⁻¹³⁰⁾. A taxa de resposta nos estudos que incluíram mais de três pacientes variou de 25% a 40%, com diferentes protocolos (dose, tempo) para o uso de CAB e diferentes critérios utilizados para definição de controle hormonal. É interessante notar que uma proporção dos pacientes apresentou escape, fenômeno cujo mecanismo ainda não foi esclarecido. Na Tabela 2, a seguir, há um resumo das séries de casos de pacientes com DC tratados com CAB.

Tabela 2 - Séries de casos de pacientes portadores de Doença de Cushing em tratamento clínico com cabergolina

Autores, ano	Nº casos	Uso de CAB	Critério de controle hormonal	Número de pacientes em remissão (%)	Número de pacientes com escape (%)
Pivonello <i>et al.</i> 2004 ⁽¹²⁴⁾	10	1-3 mg/sem, 3 meses	Normalização Fu	4 em 10 (40%)	-
Pivonello <i>et al.</i> 2009 ⁽¹²⁵⁾	20	1-7 mg/sem, mínimo 3 meses	Normalização Fu	10 em 20 (50%) após 12 meses	3/7 (43%), em até 6 meses
Godbout <i>et al.</i> 2010 ⁽¹²⁶⁾	30	0,5-6 mg/sem	Normalização Fu	11 em 30 (36,6%) em 3 a 6 meses	2/11 (18%) em até 5 anos
Lila <i>et al.</i> 2010 ⁽¹²⁷⁾	20	1- 5 mg/sem, 5 até 12 meses	F sérico à meia- noite ou supressão do F sérico após dexametasona 1mg	5 em 18 (28%)	-
Vilar <i>et al.</i> 2010 ⁽¹²⁸⁾	12	1-3 mg/sem, 6 meses	Normalização Fu	3 em 12 (25%)	-
Guyen <i>et al.</i> 2013 ⁽¹²⁹⁾	2	1-1,5 mg/sem	Normalização Fu	Um em 17 meses e outro em 24 meses (100%)	-
Ferriere <i>et al.</i> 2017 ⁽¹³⁰⁾	60	0,5-6 mg/sem, 12 meses	Normalização Fu	21 em 53 (40%)	7
TOTAL	144			52 de 135 (38%) por pelo menos 6 meses	12/39 (30%)

CAB: cabergolina; DC: Doença de Cushing; F: cortisol; Fu: cortisol urinário; sem: semanas

Na ausência de resposta completa à CAB, a associação com o cetoconazol pode ser eficaz ⁽¹²⁸⁾.

Com relação à expressão de SSTRs em corticotropinomas, houve predomínio de SSTR5 em dois ^(131, 132) de três estudos ⁽¹³¹⁻¹³³⁾. O hipercortisolismo reduz a expressão do *SSTR2* ⁽¹³⁴⁾, fato que justifica a predominância de expressão de SSTR5. Dessa forma, o LRS de nova geração, com maior afinidade ao SSTR5, podem apresentar maior eficácia ⁽¹³⁵⁾. Com os resultados do estudo de fase III de Colao *et al.* ⁽¹³⁶⁾, no qual houve normalização dos níveis de cortisol urinário em 20% de 162 pacientes, a pasireotida foi liberada para o tratamento de DC ⁽¹³⁷⁾.

Outra opção de tratamento para pacientes com DC persistente ou recorrente é a radioterapia. O controle do hipercortisolismo ocorre em torno de até 50% dos casos, em dois anos ⁽¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾.

A adrenalectomia bilateral é opção em casos resistentes à cirurgia e ao tratamento farmacológico. Apresenta eficácia no controle do hipercortisolismo, porém, associa-se à necessidade de reposição hormonal adrenal, com risco de insuficiência adrenal e, ainda, possibilidade de crescimento do corticotropinoma ⁽¹⁴¹⁾.

1.2.4 Adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes

Os ACNF incidem em até nove casos por milhão de indivíduos por ano e têm prevalência de 70 a 90 casos por milhão. Representam o segundo subtipo de adenoma mais frequente, sendo mais comuns da quinta até a nona décadas de vida ⁽¹⁴²⁻¹⁴⁴⁾, com predomínio do gênero feminino nos acometidos com menos de 40 anos e do gênero masculino em grupos etários mais avançados ⁽¹⁴²⁾.

O diagnóstico é decorrente da sintomatologia de efeito de massa (quadro visual, cefaléia, hipopituitarismo) ou por achado incidental (como na avaliação por imagem após trauma de crânio). Elevações discretas da PRL podem ser observadas e são decorrentes da desconexão da haste hipofisária ⁽¹⁴⁵⁾.

Apesar de não serem capazes de secretar hormônios, podem ser positivos na IHQ, habitualmente para LH e FSH ⁽¹⁴⁶⁾. Raramente, os ACNF podem apresentar positividade na imuno-histoquímica diagnóstica aos hormônios ACTH, GH ou tiotropina (TSH), porém, por não secretarem esses hormônios em concentrações suficientes para causarem sinais e sintomas clínicos, são denominados silenciosos ⁽¹⁴⁷⁾.

A avaliação hormonal dos microadenomas deve incluir dosagens séricas de PRL, GH e IGF-1, enquanto que, nos macroadenomas, deve-se realizar a avaliação laboratorial hormonal completa a fim de investigar também a presença de hipopituitarismo ⁽¹⁴⁸⁾.

O tratamento cirúrgico está indicado em pacientes com comprometimento visual ⁽¹⁴⁹⁾. O hipopituitarismo, que habitualmente não é indicação para a cirurgia, pode ser revertido, especialmente nos casos com hiperprolactinemia ⁽¹⁴⁸⁾. Até o momento, não há tratamento medicamentoso para os ACNF eficaz e preconizado como rotina.

Alguns autores já haviam demonstrado a expressão de DRD2 em casos de ACNF ⁽¹⁵⁰⁻¹⁵²⁾. A correlação entre expressão do DRD2 e resposta à CAB foi avaliada em quatro estudos. Em um deles ⁽¹⁵³⁾, houve expressão em 67% das amostras tumorais e associação com resposta medicamentosa ($P < 0,05$), o que não foi confirmado por outros dois estudos ^(154, 155), a despeito da positividade do DRD2 em mais de 75% dos casos em um deles ⁽¹⁵⁵⁾. Os estudos *in vivo* com AD estão resumidos na Tabela 3, a seguir:

Tabela 3 - Séries de casos pacientes portadores de adenoma clinicamente não funcionantes em tratamento clínico com cabergolina

Autor, ano	Nº casos	Protocolo de tratamento CAB	Critério de resposta	Resultado na redução tumoral
Lohmann <i>et al.</i> 2001 ⁽¹⁵⁶⁾	13	1 mg/sem, 12 meses	Redução tumoral > 10% do volume inicial	7 em 13 (54%)
Pivonello <i>et al.</i> 2004 ⁽¹⁵³⁾	9	Início 1 mg/sem, com aumento até 3 mg/sem	Redução tumoral > 25% do volume inicial em 12 meses	5 em 9 (56%)
Greenman <i>et al.</i> 2005 ⁽¹⁵⁷⁾	20	BRC até 10 mg/d	Estabilidade ou redução (> 2mm no diâmetro) em 12 meses	18 em 20 (90%)
Garcia <i>et al.</i> 2013 ⁽¹⁵⁸⁾	19	2 mg/sem, 6 meses	Redução tumoral > 25% do volume inicial em 6 meses	6 em 19 (31,6%)
Vieira Neto <i>et al.</i> 2015 ⁽¹⁵⁹⁾	9	3 mg/sem	Redução tumoral > 25% do volume inicial em 6 meses	6 em 9 (67%)
Greenman <i>et al.</i> 2016 ⁽¹⁵⁵⁾	55	CAB para resíduo tumoral após cirurgia	Estabilidade ou redução (> 2mm no diâmetro) em 6 meses	38% com redução, 49% estabilidade e 13% com aumento
Greenman <i>et al.</i> 2016 ⁽¹⁵⁵⁾	24	CAB para tumor em crescimento após cirurgia	Estabilidade ou redução (> 2mm no diâmetro) em 6 meses	58% com redução ou estabilização

BRC: bromocriptina; CAB: cabergolina; mm: milímetros

O uso de LRS já foi estudado em pequenas séries, demonstrando-se redução tumoral modesta com Oct, com melhora em defeitos do campo visual em 25% a 30% dos pacientes ⁽¹⁶⁰⁻¹⁶⁴⁾.

Curiosamente, Andersen *et al.* ⁽¹⁶⁵⁾ encontraram redução tumoral em 60% dos casos em uso de Oct subcutânea em combinação com CAB, em dose de 0,5 mg diária. Alguns autores demonstraram a presença de SSTR2 e SSTR5 em ACNFs ⁽¹⁶⁶⁾ e estudos em cultura de célula apontaram para participação de SSTR2 e SSTR5 nos efeitos antiproliferativos de LRS ⁽¹⁶⁷⁾.

Mais recentemente, Fusco *et al.* ⁽¹⁶⁸⁾ trataram 26 pacientes portadores de ACNF, com remanescente tumoral após a cirurgia, com captação positiva pelo octreoscan®, com octreotida-LAR por doze meses. Houve crescimento tumoral em cinco de 26 pacientes (19%) do grupo tratado, e em sete de 13 (53%) do grupo não tratado. Pelo estudo de imuno-histoquímica, a expressão de SSTR5 foi a mais prevalente.

Em 20 casos de ACNF, Vieira *et al.* ⁽¹⁶⁹⁾ também demonstraram maior expressão de SSTR5, fato que poderia explicar a eficácia dos LRS de nova geração no tratamento desse tumores.

No pós-operatório, deve-se realizar RM após três a quatro meses da cirurgia, a fim de avaliar se a ressecção foi parcial ou completa, e, após essa avaliação inicial, repetir anualmente o exame durante três a cinco anos para avaliar a possibilidade de crescimento da lesão, ou mesmo, recorrência ^(170, 171).

A radioterapia pode ser indicada como terapia adjuvante após a cirurgia em casos de ressecção incompleta ⁽¹⁴⁸⁾, a fim de prevenir o crescimento do remanescente tumoral ⁽¹⁷²⁾. Porém, sua indicação como rotina é discutível.

1.3 Filamina A e resistência ao tratamento medicamentoso nos tumores hipofisários

O tratamento medicamentoso dos tumores hipofisários é o padrão-ouro nos prolactinomas, podendo ser também indicado nos outros tipos tumorais em situações como recusa, ineligibilidade para cirurgia ou mesmo como tratamento adjuvante. Na Tabela 4, a seguir, resume-se a frequência de resistência às drogas utilizadas para cada subtipo tumoral.

Tabela 4 - Resistência medicamentosa nos tumores hipofisários

Tumor de hipófise	Tratamento de escolha	Tratamento clínico	Objetivo	Resistência no tratamento clínico
Prolactinoma	Clínico	AD	PRL normal; Redução tumoral	10-20% ^(30, 173)
Somatotropinoma	Cirúrgico	LRS 1ª geração	GH<1 ng/mL; IGF-1 normal; Redução tumoral	55-60% ⁽⁷⁵⁾
		AD		65% ⁽⁷²⁾
ACNF	Cirúrgico	AD	Redução tumoral	44-62% ^(153, 155)
Corticotropinoma	Cirúrgico	AD	Fu normal	60-70% ⁽¹²⁴⁾
		LRS de nova geração	Fu normal	74% ⁽¹³⁶⁾

AD: agonista dopaminérgico; Fu: cortisol urinário; LRS: ligante de receptor de somatostatina; GH: hormônio do crescimento; PRL: prolactina

O estudo e a identificação dos mecanismos envolvidos na resistência ao tratamento clínico (AD e/ou LRS) são importantes para o desenvolvimento de novas drogas e estratégias terapêuticas. A FLNA foi recentemente implicada na expressão de DRD2 e respostas aos AD em prolactinomas ⁽¹⁵⁾. Adicionalmente, a FLNA parece estar envolvida na cascata de sinalização intracelular após ativação dos SSTR2 aos LRS em somatotropinomas ⁽¹⁶⁾.

A confirmação desses dados e a ampliação dos estudos para os outros tipos de tumores hipofisários é uma abordagem interessante no entendimento dos mecanismos de resistência aos AD e LRS.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste projeto são:

- Avaliar a expressão da filamina A (FLNA) e correlacioná-la com a expressão dos receptores DRD2, SSTR2 e SSTR5 em tumores hipofisários;
- Correlacionar a expressão da FLNA e de DRD2 com a resposta à cabergolina (CAB);
- Correlacionar a expressão da FLNA, SSTR2 e SSTR5, com a resposta à octreotida (Oct) nos somatotropinomas;
- Correlacionar a expressão da FLNA com características de invasividade e de agressividade tumoral.

3. MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

Os participantes foram esclarecidos quanto aos objetivos e procedimentos deste estudo e o Termo de Consentimento Livre Esclarecido foi aplicado (Anexo A). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo B).

3.2 População do estudo

Os pacientes incluídos no estudo são acompanhados no ambulatório da Unidade de Neuroendocrinologia, da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), e foram submetidos ao tratamento cirúrgico no período de 2007 até 2014, através de adenomectomia, por via transesfenoidal ou transcraniana. Realizou-se revisão sistemática dos dados do prontuário, incluindo a avaliação clínica completa, diagnóstico, terapêuticas, imagens tumorais e dados do anátomopatológico de rotina diagnóstica.

3.2.1 Critérios de inclusão e de exclusão

Foram incluídos pacientes com dados disponíveis que permitissem a revisão do prontuário e cujas amostras de tumores hipofisários foram ressecados e selecionados pelos seguintes critérios:

- Confirmação histopatológica e imuno-histoquímica (IHQ) de tumor hipofisário;
- Amostra tecidual em quantidade e qualidade adequadas que permitissem a avaliação proposta;

Foram excluídos os pacientes em que a análise da IHQ da amostra tecidual foi compatível com hipófise normal e excluídos para análise de resposta medicamentosa aqueles que receberam radioterapia antecedendo o uso das medicações.

3.3 Análise clínica e laboratorial

Foi realizada análise retrospectiva e prospectiva dos pacientes estudados, através da avaliação clínica completa de todos os indivíduos, pela anamnese, dados relativos à idade ao diagnóstico, exame físico, avaliação demográfica (idade, sexo, tempo de doença), avaliação hormonal, específica para cada subtipo tumoral (PRL, GH, IGF-1, percentual acima do limite superior do intervalo normal de IGF-1 para idade (%ULNR-IGF-1), F, FU, basais hormonais completos, curva glicêmica com sobrecarga oral de glicose), tamanho do maior diâmetro tumoral, descrição de invasão infrasselar e

parasselar de acordo com os laudos de rotina, com revisão dos critérios de invasão parasselar, considerando Knosp 3 e 4, e dados relativos à agressividade tumoral, como resistência ao tratamento medicamentoso, número de cirurgias, Ki-67 $\geq$ 3% e necessidade de radioterapia. Também foram revisados os dados relativos ao tratamento medicamentoso com LRS e/ou AD e a resposta hormonal e/ou tumoral obtida. Nos pacientes submetidos à cirurgia, foram coletados dados relativos aos níveis hormonais após cirurgia, diagnóstico anátomopatológico e presença de recidiva. Avaliações referentes aos diversos tratamentos realizados também foram coletadas através de revisão do prontuário.

As dosagens bioquímicas e hormonais foram realizadas no Laboratório Central e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM-42 da FMUSP.

O diagnóstico de ACNF baseou-se na presença de lesão sugestiva de tumor hipofisário, visualizada por ressonância magnética, ausência de sintomas e dosagens hormonais que excluíssem hipersecreção hormonal.

3.4 Avaliação por exames de imagem

Os exames de imagem foram realizados pelo Instituto de Radiologia (InRad) do HCFMUSP. Os pacientes foram submetidos à ressonância magnética, aparelhos GE® de 1.5 Tesla para avaliação do tamanho tumoral. Os pacientes foram feitos seguindo o protocolo habitual: imagens multiplanares de 3 mm ponderadas em T1 (sagital e coronal), T2 (coronal), T1 dinâmico coronal pós-contraste e T1 pós-contraste - sagital, coronal e alguns com sequência volumétrica (SPGR).

As ressonâncias magnéticas dos pacientes com ACNF, submetidos ao tratamento com CAB no pós-operatório, foram avaliadas por apenas um radiologista (Dr. Ellison Fernando Cardoso), que mensurou os remanescentes tumorais ao menos seis meses após a cirurgia e durante o tratamento medicamentoso. Considerou-se crescimento e/ou redução tumoral a variação do volume acima de 25%.

3.5 Análise histológica diagnóstica

O exame anatomopatológico de todos os tumores foi realizado conforme rotina diagnóstica, na Divisão de Anatomia Patológica (DAP) do HCFMUSP. O tecido foi corado com hematoxilina-eosina para diagnosticar a presença de adenoma, e foi feita a análise IHQ do tecido tumoral para avaliar a presença dos hormônios hipofisários GH, PRL, hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio tireoestimulante (TSH) e ACTH (Anexo C).

As amostras tumorais foram avaliadas no LIM-14 FMUSP para análise anatomopatológico com IHQ, e no LIM-25 FMUSP para realização de PCR em tempo real, conforme fluxograma abaixo.

HE: hematoxilina-eosina; IHQ: imuno-histoquímica; LIM-25: Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; LIM-14: Laboratório de Investigação em Patologia Hepática da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Figura 4 - Fluxograma após coleta de amostra tumoral, para análise de RNAm e de imuno-histoquímica

3.6 Análise por imuno-histoquímica de FLNA, DRD2, SSTR2, SSTR5, e Ki-67

As análises por IHQ de FLNA, DRD2, SSTR2, SSTR5 e Ki-67, nos tumores hipofisários e em cinco amostras de hipófises normais, foram realizadas em colaboração com o LIM-14, Laboratório de Investigação em Patologia Hepática da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O preparo das reações foi realizado pela funcionária Alda Wakamatsu, sob orientação do Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves. As amostras

humanas de hipófises normais foram fornecidas pela Divisão de Anatomia Patológica (DAP) do HCFMUSP.

Na Tabela 5, a seguir, há descrição dos anticorpos primários utilizados nas reações de IHQ, através do método de imunoperoxidase.

Tabela 5 - Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica da FLNA, DRD2, SSTR2, SSTR5 e Ki-67

Anticorpo	Clone/ marca	Controle positivo
Anti-Filamin	Mouse anti-human Filamin monoclonal Ab, clone PM6/317, Millipore®	Hipófise
Anti-D2DR	Anti-D2DR mouse monoclonal IgG2a Antibody (clone B-10) – Unconjugated, Santa Cruz®	Córtex adrenal
Anti-Somatostatin Receptor 2	Rabbit monoclonal [UMB1] to Somatostatin Receptor 2 (ab134152), Abcam®	Pâncreas
Anti-Somatostatin Receptor 5	Rabbit monoclonal [UMB4] to Somatostatin Receptor 5, (ab109495), Abcam®	Hipófise
Anti-human Ki-67 antigen	Monoclonal Mouse Anti-Human Ki67 Ag Clone MIB-1, Dako ®	Tonsila

O Anexo D contém as informações dos procedimentos de imunoperoxidase, realizados no LIM-14.

As lâminas foram avaliadas por apenas um patologista, Dr. Fernando P. Frassetto, sob microscópio de luz, e sistemas de pontuação diferentes foram usados para cada anticorpo:

- ✓ Filamina A: análise de intensidade e de extensão da coloração da marcação do citoplasma, de acordo com as porcentagens das áreas com coloração positiva, em relação à área do tumor inteiro;
- ✓ DRD2: análise de intensidade e de extensão da coloração da marcação do citoplasma, de acordo com as porcentagens das áreas de coloração positiva, em relação à área do tumor inteiro;
- ✓ SSTR 2 e 5: análise de intensidade e de extensão da coloração da marcação da membrana, de acordo com as porcentagens das áreas com coloração positiva, em relação à área do tumor inteiro;
- ✓ Ki-67: análise por cinco *hot spots*, e somente a coloração nuclear forte foi considerada positiva. Para avaliação, dividiu-se em categorias <3% e ≥3%.

Após a leitura da IHQ de FLNA, DRD2, STTR2, e SSTR5 realizou-se um escore, de acordo com a intensidade e a extensão da coloração. Utilizou-se o escore de imunorreatividade (IRS), que é o produto da porcentagem de células positivas (0%= 0; 1-10%=1; 11-50%=2; >50%=3) e a intensidade da coloração (ausência de coloração=0; fraca=1; moderada=2; intensa=3), com pontuações de 0 a 9. Realizamos o agrupamento do IRS para permitir comparações: expressão negativa (IRS 0 ou 1), fracamente positiva (IRS 2 a 3), moderadamente positiva (IRS de 4 a 8) e fortemente positiva (IRS 9) ⁽¹⁷⁴⁾.

3.7 Avaliação do padrão de granulação de GH nos somatotropinomas

Os somatotropinomas podem ser classificados em densamente e esparsamente granulados e, além da microscopia eletrônica, o padrão de marcação da citoqueratina, avaliado por IHQ, também pode identificar esses subtipos. Utilizamos o anticorpo monoclonal *mouse anti human Cytokeratin* (clone 35 β H11), DAKO® cod. M0631, que marca a citoqueratina 8, de baixo peso molecular. Os somatotropinomas densamente granulados apresentam um padrão perinuclear de coloração à citoqueratina, enquanto que os esparsamente granulados apresentam corpos fibrosos, que são agregados concêntricos de filamentos de queratina, fortemente reagentes.

O Anexo E contém as informações do procedimento de imunoperoxidase para a avaliação do padrão de granulação, realizados no LIM-14.

3.8 Análise Molecular

Os tumores foram coletados a fresco durante o ato operatório habitual e colocados imediatamente em tubo de polipropileno estéril para armazenamento. Os tumores ficaram armazenados em nitrogênio líquido até a realização da extração de RNA. A análise molecular foi processada no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, LIM-25.

3.8.1 Extração do RNA de tecido hipofisário

O RNA dos tecidos foi obtido utilizando o AllPrep DNA/RNA Kit® (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. A qualidade dos ácidos nucleicos foi analisada através da eletroforese em gel de agarose 1%, para avaliação das bandas ribossomais 18S e 28S, e pela leitura em espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Scientific), para avaliação da concentração e da relação de absorbância A260/280, sendo consideradas satisfatórias aquelas amostras com relação A260/280 entre 1,8 e 2,0.

3.8.2 Síntese do cDNA complementar

As amostras de RNA foram tratadas com DNase segundo protocolo padrão. A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1 µg de RNA total extraído dos tecidos hipofisários dos pacientes, pela Transcrição Reversa (RT), utilizando-se o Kit *QuantiTect Reverse Transcription* (Qiagen), seguindo o protocolo do fornecedor.

3.8.3 Estudo de expressão gênica da *FLNA*, *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5*

O estudo da expressão gênica por PCR em tempo real para quantificação do RNA mensageiro (RNA_m) foi realizado utilizando ensaios TAQMAN® com sondas específicas de *FLNA*, *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5*.

As reações foram preparadas em duplicata em um volume final de 25 µl, contendo 12,5 µl de *Taqman Gold Universal mastermix*, 2x 1,25 µl de cada ensaio (*Applied Biosystems Foster City, CA*), 1,0 µl de cDNA e 10,25 µl de

água. As condições de termociclagem foram 95°C/10min, seguida de 40 ciclos de 95°C/ 15 segundos e 60°C/10 min.

Como amostra de referência, foi feita a amplificação dos genes alvos normalizada pelas condições de amplificação do gene endógeno Peptidil-prolil Isomerase E (*PPIE*) utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (175). Para a amostra calibradora foi utilizada um “pool” comercial de RNA de tecido hipofisário normal *Human Pituitary GlandPoly A+ RNA* (Clontech®, Palo Alto, CA, EUA).

A corrida e leitura da reação ocorreram no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®), e os valores de quantificação relativa foram expressos como RQ (*relative quantification*), utilizando o *StepOne™ Software v2.3*.

A Tabela 6 a seguir demonstra os ensaios utilizados no estudo da expressão gênica:

Tabela 6 - Ensaios utilizados no estudo da expressão gênica por PCR em tempo real

Gene	NCBI Gene Reference Translated Protein	Ensaio ID
<i>FLNA</i>	NM_001456.3/NM_001110556.1 NP_001447.2/NP_001104026.1	Hs00924645_m1
<i>DRD2</i>	NM_000795.3 NP_000786.1 NM_016574.3 NP_057658.2	Hs00241436_m1
<i>SSTR2</i>	NM_001050.2 NP_001041.1	Hs00990356_m1
<i>SSTR5</i>	NM_001053.3/NM_001172560.1 NP_001044.1/NP_001166031.1	Hs00265647_s1
<i>PPIE</i>	NM_001195007.1 NP_001181936.1	Hs01102333_m1

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição de frequências foi utilizada para descrever as variáveis categóricas (número de casos e percentual) e as medidas de tendência central (média e mediana) e de variabilidade (mínimo, máximo e desvio padrão) para variáveis numéricas. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Para verificar a associação entre as variáveis numéricas em relação à variável referente a grupo com duas categorias, o teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi aplicado, e quando grupo com três ou mais categorias, o teste de Kruskal-Wallis foi adotado.

Para comparar as variáveis categóricas (tipo tumoral ou variáveis com grupos de categorias) em tabelas de contingência, o teste de frequências do qui-quadrado foi utilizado e, em tabelas 2x2 quando pelo menos uma frequência esperada foi menor do que 5, o teste exato de Fisher foi adotado.

O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes estatísticos. Foram utilizados os programas STATA versão 10.0 e SIGMA STAT VS 3.4 para análise estatística.

5. RESULTADOS

5.1 População estudada

Foram incluídos 116 pacientes portadores de tumores hipofisários, submetidos à cirurgia transesfenoidal para ressecção tumoral, subdivididos em quatro grupos:

- ✓ Grupo PRL: 11 pacientes portadores de prolactinoma;
- ✓ Grupo GH: 48 pacientes portadores de somatotropinoma;
- ✓ Grupo ACTH: 32 pacientes portadores de corticotropinoma;
- ✓ Grupo ACNF: 25 pacientes portadores de adenoma clinicamente não funcionante.

Em três pacientes portadores de Doença de Cushing e em dois pacientes portadores de ACNF, houve coleta de amostra tumoral proveniente de duas abordagens cirúrgicas, perfazendo 121 amostras tumorais dos 116 pacientes avaliados. Para o mesmo paciente, cada amostra tumoral foi considerada separadamente ((a) e (b)).

Os pacientes incluídos no estudo foram provenientes do ambulatório de Neuroendocrinologia do HCFMUSP. As características, quanto à idade ao diagnóstico, gênero, maior diâmetro tumoral, invasividade infrasselar e parasselar

ao exame de imagem, número de cirurgias e realização de radioterapia, estão resumidas na Tabela 7, a seguir, e detalhadas no ANEXO F e G.

Tabela 7 - Características quanto à idade, tamanho tumoral, cirurgias e radioterapia dos pacientes, classificados em grupos de acordo com os subtipos tumorais

Variável	Categoria	PRL	GH	ACTH	ACNF	P
		N=11	N=48	N=35	N=27	
Idade (anos)	Mediana (Variação)	18 (12 – 33)	38 (18 – 73)	35 (14 – 70)	49 (26 – 71)	<0,001
Gênero	Feminino	9 (10,2)	30 (34,1)	33 (37,5)	16 (18,2)	NA
N (%)	Masculino	2 (6,1)	18 (54,5)	2 (6,1)	11 (33,3)	
Maior diâmetro tumoral (cm)	Mediana (Variação)	2,4 (0,6– 5,0)	2,2 (0,6 – 6,4)	0,9 (0,3 – 5,4)	2,8 (1,3 – 6,0)	<0,001*
Expansão Suprasselar	Não	7 (12,3)	17 (29,8)	33 (57,9)	0 (0)	<0,001**
N (%)	Sim	4 (6,2)	31 (48,4)	2 (3,1)	27 (42,2)	
Invasão Parasselar	Não	7 (10,9)	19 (29,7)	26 (40,6)	12 (18,8)	0,011**
N (%)	Sim	4 (7,0)	29 (50,9)	9 (15,8)	15 (26,3)	
Invasão infrasselar	Não	32 (35,2)	33 (36,3)	9 (9,9)	17 (18,7)	NA
N (%)	Sim	3 (10)	15 (50)	2 (6,7)	10 (33,3)	
Cirurgias	1	8 (8,6)	42 (45,2)	24 (25,8)	19 (20,4)	NA
N (%)	> 1 (2 a 4)	3 (10,7)	6 (21,4)	11 (39,3)	8 (28,6)	
RDT	Não	8 (7,3)	47 (43,1)	28 (25,7)	26 (23,9)	NA
N (%)	Sim	3 (25,0)	1 (8,3)	7 (58,3)	1 (8,3)	

N: número; NA: não avaliado estatisticamente; RDT: radioterapia

P-valor obtido pela análise de Variância; *P-valor obtido pelo teste de Kruskal-Wallis; **P –valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

Nota-se que a média da idade ao diagnóstico foi maior no grupo ACNF, assim como o maior diâmetro tumoral, quando comparado aos grupos PRL, GH e ACTH. As medidas de maior diâmetro tumoral foram menores no grupo ACTH, quando comparadas aos demais grupos. No grupo ACNF, todos os casos apresentavam expansão suprasselar e a invasão parasselar foi mais frequente no grupo GH.

Características clínicas, laboratoriais e de imagem de cada subtipo tumoral

Prolactinomas (Grupo PRL)

O grupo corresponde a 9,6% da amostra total e consiste de 11 pacientes (nove mulheres e dois homens), com mediana de idade ao diagnóstico de 18 anos, com variação de 12 a 33 anos. A mediana de PRL sérica ao diagnóstico foi de 500 ng/mL, com variação de 158 a 6000 ng/mL. Em relação ao tamanho tumoral, houve dez macroadenomas e apenas um microadenoma, com mediana de maior diâmetro tumoral de 2,4 cm e variação de 0,6 cm a 5 cm. Quatro casos apresentavam invasão parasselar, dois com invasão infrasselar, sendo um com ambas.

Em todos os casos, o tratamento inicial foi o medicamentoso, com CAB. O critério de resistência à CAB utilizado foi a não normalização dos níveis de prolactina ou crescimento tumoral, com doses maiores ou iguais a 3,5 mg por semana, por mais de seis meses. A indicação cirúrgica em nove casos foi resistência à CAB e intolerância medicamentosa em dois casos. Dos intolerantes, um paciente com microadenoma usou 1 mg semanal por 14 meses e o outro usou 2 mg semanais por 16 meses, ambos irregularmente.

Após a cirurgia, a confirmação histopatológica e por imuno-histoquímica foi realizada em todos os casos. Em um deles, houve positividade discreta também para GH, porém a paciente apresentava níveis de GH e de IGF-1 prévios à cirurgia normais, sem características clínicas de acromegalia e foi diagnosticada como portadora de prolactinoma.

Após o tratamento cirúrgico, houve remissão em três pacientes, sendo que em dois casos indicação cirúrgica foi por intolerância a CAB. Com relação aos oito casos sem remissão, houve reintrodução de CAB em sete e normalização da hiperprolactinemia em apenas um deles. Três pacientes foram encaminhados à radioterapia, todos com abordagens cirúrgicas múltiplas. Os dados dos pacientes estão detalhados nos Anexos F e G.

Somatotropinomas (Grupo GH)

O grupo de somatotropinomas representa 41,4% da amostra total e consiste de 48 pacientes (30 mulheres e 18 homens), com mediana de idade ao diagnóstico de 38 anos, variando de 18 a 73 anos. O quadro clínico foi de gigantismo em um caso e de acromegalia no restante. Ao diagnóstico, a mediana de GH foi de 18,5 ng/mL, média de 70 ng/mL, com desvio padrão de 184,7 ng/mL, com variação de 1,1 ng/mL a 1261 ng/mL. A mediana do IGF-1 foi de 1000 ng/mL, média 1001,7 ng/mL, correspondendo ao percentual médio acima do limite do superior do normal do IGF-1 (ULNR-IGF-1) de 373%. Com relação ao tamanho tumoral, 44 casos eram macroadenomas (91,6%) e apenas quatro eram microadenomas, com mediana do maior diâmetro tumoral foi de 2,2 cm, variando de 0,6 cm a 6,4 cm. Com relação aos macroadenomas, 29 apresentavam invasão parasselar, 13 apresentavam invasão parasselar e infrasselar, e dois casos apenas invasão infrasselar.

Os pacientes receberam tratamento clínico primário e/ou secundário com o OCT-LAR e CAB, isoladamente ou em combinação. A OCT-LAR foi administrada, por via intramuscular, a cada 28 dias, com dose inicial de 20 mg e ajuste de dose para 30 mg em três meses. A CAB foi administrada, por via oral na dose de 1,5 mg por semana por três meses, atingindo a dose máxima de 3,5 mg por semana nos casos não controlados.

Em 13 pacientes, realizou-se tratamento medicamentoso primário (LRS em oito, CAB em quatro, CAB e LRS associados em um) e como não houve resposta hormonal, foram submetidos ao tratamento cirúrgico. No pós-operatório, doze pacientes permaneceram sem controle hormonal. O tratamento primário foi cirúrgico em 35 casos (73%), com remissão em doze (34%). O tratamento medicamentoso foi utilizado no pós-operatório, em ambos os grupos: LRS em 22, CAB em 14 e a combinação dessas drogas em 12 casos. Houve controle hormonal, no grupo com tratamento cirúrgico primário, com LRS em 38,4%, com CAB em 30% e em 17% com a combinação; enquanto que no grupo com tratamento medicamentoso primário, o controle foi 11% com LRS, 50% com CAB e 33% com a combinação das drogas. Os critérios de resposta hormonal utilizados foram níveis de GH abaixo de 1,0 ng/mL e/ou IGF-1 normal para idade. O critério de redução tumoral não foi avaliado. As características dos pacientes e dos tratamentos realizados estão detalhadas nos Anexos F, G e H.

Na avaliação de imuno-histoquímica da rotina do DAP, 28 casos foram positivos apenas para GH, 15 positivos para GH e PRL e quatro com predominância de GH e marcação para outros hormônios. Em um caso, a imuno-histoquímica foi negativa, porém o diagnóstico de somatotropinoma foi

confirmado pela presença de quadro clínico e laboratorial, bem como remissão após o tratamento cirúrgico.

Seis pacientes foram submetidos a mais de um procedimento cirúrgico e um desses foi encaminhado à radioterapia.

Corticotropinomas (Grupo ACTH)

O grupo de corticotropinomas representa 27,5% da amostra e foi composto por 32 pacientes, sendo 30 mulheres e dois homens. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 35 anos, com variação de 14 anos a 70 anos. A mediana de cortisol urinário de 24 horas foi de 605 mcg, sendo a média de 628,5 mcg, variando de 70 mcg a 1339 mcg para o valor de referência inferior a 310 mcg em 24 horas. Houve cinco casos com valores de FU normais ao diagnóstico, sendo um deles corticotropinoma silencioso. Dois pacientes apresentaram progressão do corticotropinoma (Síndrome de Nelson), com aumento da lesão tumoral e elevação dos níveis plasmáticos de ACTH acima de 200 ng/mL.

Com respeito ao tamanho tumoral, 18 casos eram microadenomas (56%), incluindo dois casos sem visualização tumoral na RM, e 14 eram macroadenomas. O tamanho do diâmetro máximo do tumor apresentava a mediana de 0,9 cm, média de 1,4 cm, com desvio-padrão de 1,1 cm.

Os 32 pacientes foram submetidos a cirurgia e houve remissão em 17 (53%), com recidiva em cinco casos (29%), em 20 a 36 meses. Com relação à imuno-histoquímica, 30 casos positivos e dois casos foram negativos para ACTH. Nestes, o diagnóstico clínico e laboratorial para Doença de Cushing e remissão da doença após o tratamento cirúrgico permitiram firmar o diagnóstico

de corticotrofinoma em um caso; em outro uma cirurgia prévia confirmou o anatomo-patológico com ACTH positivo.

Como tratamento secundário, seis pacientes receberam CAB, quatro sem remissão após a cirurgia e dois com recidiva. A dose mediana de CAB foi de 3,5 mg/semana e o período mediano de tratamento foi de 8,5 meses, variando de quatro a 17 meses. Considerando a normalização do cortisol urinário de 24 horas como controle hormonal, houve resposta em dois casos (33%) e ambos apresentaram escape, após oito e doze meses.

Onze pacientes foram submetidos a múltiplas cirurgias e a radioterapia foi indicada em sete pacientes. As características dos pacientes e dos tratamentos realizados no grupo ACTH estão descritas nos Anexos F e G.

Adenomas clinicamente não funcionantes (Grupo ACNF)

Esse grupo representa 21,5% da amostra total e consistiu de 25 pacientes, sendo 15 mulheres e dez homens. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 49 anos, com variação de 26 a 71 anos. Todos os casos eram macroadenomas, com mediana de tamanho tumoral de 2,8 cm, variando de 1,3 cm a 6 cm. Todos os pacientes apresentavam expansão suprasselar, 15 com invasão parasselar e dez casos com invasões parasselar e infrasselar.

Dois pacientes foram submetidos a dois procedimentos cirúrgicos, perfazendo 27 amostras tumorais de 25 pacientes.

O resultado da imuno-histoquímica diagnóstica do DAP resultou em 18 casos (72%) negativos para todo painel (*null cell*) e positividade para um ou mais hormônios nos outros casos (vide Anexos F e G). Todos os pacientes foram submetidos a cirurgia como tratamento primário, com ressecção

macroscópica total em quatro (16%) casos, havendo invasão parasselar em apenas um caso, classificado como Knosp 3.

Sete pacientes, que apresentaram remanescente tumoral, em avaliação ao menos após seis meses do procedimento cirúrgico, receberam tratamento com CAB, por no mínimo seis meses. A dose mediana da dose de CAB foi de 3,5 mg/semana, com variação de 1,5 mg/sem a 3,5 mg/sem, por mediana de tempo de 32 meses (6 a 39 meses). A estabilidade e redução tumoral, maior que 25% do volume inicial, foram consideradas como critérios de resposta ao tratamento medicamentoso. As imagens foram avaliadas por apenas um radiologista (EFC).

Dose, tempo de tratamento e resposta à CAB estão detalhadas no Anexo G.

Sete pacientes foram submetidos a múltiplos tratamentos cirúrgicos, e um caso foi encaminhado à radioterapia.

5.2 Resultados de imuno-histoquímica

De 121 amostras tumorais, a expressão de ao menos um dentre os seguintes: FLNA, DRD2, SSTR2, SSTR5 e Ki-67, foi obtida em 101 casos, sendo 11 prolactinomas, 37 somatotropinomas, 30 corticotropinomas e 23 ACNF.

Além das amostras tumorais, cinco hipófises normais também foram avaliadas, sendo duas provenientes do arquivo do LIM-14 e três provenientes do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO) do HCFMUSP. As glândulas hipofisárias foram coletadas até 24 horas do post mortem, e houve confirmação da normalidade tecidual, pelo patologista, após avaliação por microscopia. A

expressão da FLNA, DRD2, SSTR2 e SSTR5 nas cinco amostras de hipófises normais está detalhada na Tabela 8, a seguir:

Tabela 8 - Expressão, segundo o IRS, de FLNA, DRD2, SSTR2, SSTR5 nas amostras de hipófises normais

IRS	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4*	Nº 5*	Mediana (Variação)	Média (DP)
FLNA	6	1	4	6	1	4 (1-6)	3,6 (2,5)
DRD2	4	9	6	2	6	6 (2-9)	5,4(2,6)
SSTR2	2	6	4	9	6	6 (2-9)	5,4(2,6)
SSTR5	2	6	3	2	2	2 (2-6)	3,0 (1,7)

DP: desvio padrão; Nº: número de amostras de hipófises normais

*Hipófises provenientes do arquivo do DAP do HCFMUSP

5.2.1 Expressão da FLNA

A expressão da FLNA foi avaliada, de acordo com IRS, para cada grupo de subtipo tumoral. No grupo PRL, a mediana foi 0, com variação de 0 a 6; no grupo GH, mediana de 1, com variação de 0 a 6; no grupo ACTH, a mediana foi de 1, com variação de 0 a 9; e no grupo ACNF, a mediana foi de 1, com variação de 0 a 6. Na comparação entre as medianas, não houve diferença entre os grupos, conforme Figura 5, a seguir.

- - -: linha tracejada representa mediana

As medianas entre os grupos foram comparadas usando teste de Kruskal-Wallis

Figura 5 - Gráfico de caixa IRS da Filamina A

Na comparação entre a mediana de cada grupo e a mediana das hipófises normais, houve menor expressão no grupo PRL ($P=0,032$) e no grupo GH ($P=0,023$).

Vale ressaltar que o IRS da FLNA foi negativo (0 e 1) em 60% (58 em 97) das amostras tumorais e as maiores pontuações (9) foram obtidas em dois casos do grupo ACTH. O IRS da FLNA de cada amostra tumoral está descrito no Anexo I.

Na Figura 6 a seguir, demonstramos a IHQ da FLNA.

Figura 6 - Fotografia de lâminas de imuno-histoquímica da FLNA, sob microscopia óptica, em aumento de 400 vezes: A - Caso ACTH32; IRS FLNA=9; B - Caso ACTH10a, IRS FLNA=0; C - Controle positivo (hipófise normal)

5.2.2 Expressão do DRD2

A expressão do DRD2 foi avaliada, de acordo com IRS, para cada grupo de subtipo tumoral. No grupo PRL, a mediana foi de 6, com variação de 1 a 9; no grupo GH, a mediana foi de 4, com variação de 0 a 9; no grupo ACTH, mediana de 4, com variação de 0 a 9; e no grupo ACNF, mediana de 9, com variação de 0 a 9. Comparando-se a mediana, houve maior expressão no grupo ACNF ($P=0,008$), conforme ilustrado na Figura 7. Não houve diferença na mediana quando se comparou cada grupo tumoral com as amostras de hipófise normal. Os dados individuais de cada amostra tumoral estão detalhados no Anexo I.

- - -: linha tracejada representa mediana

As medianas entre os grupos foram comparadas usando teste de Kruskal-Wallis. * $P = 0,008$

Figura 7 - Gráfico de caixa IRS do DRD2

Na Figura 8 a seguir, demonstramos exemplos de IHQ do DRD2.

Figura 8 - Fotografia de lâminas de imuno-histoquímica do DRD2, sob microscopia óptica, em aumento de 400 vezes: A - Caso ACNF11, IRS DRD2=9; B - Caso ACTH10a, IRS DRD2=0; C - Controle positivo (córtex adrenal)

5.2.3 Expressão do SSTR2 e SSTR5

As expressões do SSTR2 e do SSTR5 foram avaliadas, de acordo com IRS, para cada subtipo tumoral. No grupo PRL, a mediana do SSTR2 foi 0, com variação de 0 a 9; no grupo GH foi de 9, com variação de 0 a 9; no grupo ACTH, mediana de 6, com variação de 0 a 9; e no grupo ACNF, mediana de 1, com variação de 1 a 9. Quanto ao IRS do SSTR5, no grupo PRL, a mediana foi de 0, com variação de 0 a 9; no grupo GH, mediana de 1, com variação de 0 a 9; no grupo ACTH, mediana de 0, com variação de 0 a 6; e no grupo ACNF, mediana de 0, com variação de 0 a 6. Na comparação das medianas entre os grupos, houve maior expressão de ambos SSTRs no grupo GH ($P < 0,001$), conforme demonstrado na Figura 9. Os dados individuais de cada amostra tumoral estão detalhados no Anexo I.

Figura 9 - Gráfico de caixa IRS do SSTR2 e SSTR5

Comparando a expressão de SSTR2 entre os grupos tumorais e as hipófises normais, não houve diferença. No entanto, a expressão de SSTR5 foi maior no grupo de hipófises normais, quando comparada aos grupos PRL ($P=0,033$), ACTH ($P=0,001$) e ACNF ($P<0,001$).

Na Figura 10, a seguir, demonstramos exemplos de IHQ de SSTR2 e SSTR5.

Figura 10 - Fotografia de lâminas de imuno-histoquímica do SSTR2 (A - Caso GH18, IRS SSTR2 = 9; B - Caso GH08, IRS SSTR2=0; C - Controle positivo: pâncreas), e do SSTR5 (D - GH21, IRS SSTR5 = 9; E - GH09, IRS SSTR5 = 0; F - Controle positivo: hipófise normal), sob microscopia óptica, em aumento de 400 vezes

5.2.4 Correlação entre a expressão de FLNA e os receptores DRD2, SSTR2 e SSTR5

Avaliando-se todos os subtipos de tumores hipofisários, não houve correlação entre a expressão da FLNA e de DRD2, utilizando o método de Spearman ($\rho=0,25$; $P=0,01$). Considerando os subtipos, não houve associação nos grupos PRL ($\rho=0,14$; $P=0,71$), GH ($\rho=0,17$; $P=0,32$) e ACTH ($\rho=0,15$; $P=0,50$), mas sim correlação positiva moderada no grupo ACNF ($\rho=0,49$; $P=0,02$), conforme ilustrado na Figura 11, abaixo.

Figura 11 - Correlação entre IRS do DRD2 e da FLNA no gupo ACNF

No grupo GH, não houve correlação entre a expressão da FLNA e de SSTR2 ($\rho=0,07$; $P=0,68$) ou ainda entre FLNA e SSTR5 ($\rho=0,26$; $P=0,14$). Ainda neste grupo, não houve correlação entre a expressão de SSTR2 e SSTR5 ($\rho=0,18$; $P=0,34$).

A comparação entre diferentes amostras tumorais ((a) e (b)) de um mesmo paciente foi possível em apenas dois casos do grupo ACTH (ACTH02 e ACTH07). Nas amostras de um paciente do grupo ACTH e de dois pacientes do grupo ACNF reabordados, houve perda de representatividade.

A amostra (a) do paciente ACTH02 foi obtida em tratamento cirúrgico primário. Após tratamento com cetoconazol por quatro meses, sem controle da cortisolúria, o paciente foi submetido a nova abordagem cirúrgica, quando se obteve a amostra (b). Para o caso ACTH02, comparando-se as amostras (a) e (b) houve perda da imunoexpressão do DRD2 e do SSTR2, o que pode ser explicado por heterogeneidade tumoral, tamanho de amostra, conservação do material, ou até mesmo efeito do cetoconazol. A amostra (a) do paciente ACTH07 foi obtida em tratamento cirúrgico primário e, após seis meses, por crescimento tumoral, o paciente foi submetido à nova cirurgia (amostra (b)), sem uso de tratamento medicamentoso nesse período de tempo. Comparando-se as amostras (a) e (b) do caso ACTH07, houve alteração de IRS para FLNA e DRD2, que não pode ser considerada significativa (vide Anexo I).

5.2.5 Correlações entre a expressão da FLNA e resposta a cabergolina, e entre DRD2 e resposta a cabergolina

Houve correlação entre a expressão de FLNA e resposta à CAB apenas no grupo ACNF ($P=0,045$), conforme ilustrado na Figura 12. Essa análise não foi possível no grupo PRL. Com respeito à expressão de DRD2 e resposta à cabergolina, não houve correlação em nenhum dos subtipos tumorais. No grupo GH, incluímos para essas análises apenas os pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico primário, a fim de não haver influência do tratamento medicamentoso na avaliação da expressão dos receptores. Ainda para o grupo GH, considerou-se resposta hormonal níveis de GH abaixo de 1,0 ng/mL e/ou IGF-1 normal. Os dados dos subtipos tumorais estão detalhados na Tabela 9.

-- -: linha tracejada representa mediana; CAB = cabergolina

As medianas entre os grupos foram comparadas usando teste de Kruskal-Wallis. * $P = 0,045$

Figura 12 - Gráfico de caixa IRS da FLNA e do DRD2, no grupo ACNF, categorizando os casos em resistentes e sensíveis ao tratamento com cabergolina

Tabela 9 - Expressão da FLNA e do DRD2 e correlação com resposta à cabergolina

Grupo PRL	Resistentes à CAB	Sensíveis CAB	P
IRS FLNA	N=7	N=2	NA
Mediana (variação)	0 (0-6)	0 (0)	
Média (DP)	1,3 (2,2)	-	
IRS DRD2	N=5	N=2	0,842
Mediana (variação)	6 (2-9)	5 (1-9)	
Média (DP)	5,0 (3,0)	5,0 (5,6)	
Grupo GH*			
IRS FLNA	N=2	N=3	0,999
Mediana (variação)	1 (0-2)	1 (0-2)	
Média (DP)	1,0 (1,4)	1,0 (1,0)	
IRS DRD2	N=2	N=3	0,543
Mediana (variação)	3 (2-4)	4 (2-6)	
Média (DP)	3,0 (1,4)	4,0 (2,0)	
Grupo ACTH			
IRS FLNA	N=4	N=2	0,784
Mediana (variação)	0 (0-3)	1 (0-2)	
Média (DP)	0,75 (1,5)	1 (1,4)	
IRS DRD2	N=3	N=2	0,197
Mediana (variação)	2 (0-4)	4 (4)	
Média (DP)	2,0 (2,0)	4,0	
Grupo ACNF			
IRS FLNA	N=4	N=3	0,045
Mediana (variação)	0 (0)	1 (0-2)	
Média (DP)	0 -	1,0 (0,8)	
IRS DRD2	N=3	N=4	0,095
Mediana (variação)	4 (0-6)	9 (4-9)	
Média (DP)	3,3 (3,0)	7,7(2,5)	

* Grupo GH submetido ao tratamento cirúrgico primariamente, utilizando como parâmetro de resposta hormonal GH<1 ng/mL e/ou IGF-1 normal para idade

CAB: cabergolina; DP: desvio padrão; N: número de amostras tumorais; p- valor obtido pelo teste Mann-Whitney U.

5.2.6 Correlação entre a expressão de FLNA e resposta aos ligantes de receptor de somatostatina no grupo somatotropinomas

Considerando o grupo GH que inclui pacientes submetidos ao tratamento primário cirúrgico, sem remissão, e que posteriormente recebeu tratamento com LRS, não houve associação entre a expressão de FLNA e resposta aos LRS, entre a expressão de SSTR2 e resposta aos LRS, ou, ainda, entre a expressão de SSTR5 e resposta aos LRS, ao utilizar-se como critério de resposta hormonal níveis de GH abaixo de 1,0 ng/mL e/ou IGF-1 normal para idade, conforme está demonstrado na Tabela 10, a seguir.

Tabela 10 - Expressão da FLNA, SSTR2 e SSTR5 e correlação com resposta hormonal aos ligantes de receptor de somatostatina em somatotropinomas, incluindo pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico primário

	Resistentes* aos LRS	Sensíveis aos LRS	P
IRS FLNA	N=4	N=4	0,999
Mediana (variação)	0 (0-2)	0 (0-2)	
Média (DP)	0,5 (1,0)	0,5 (1,0)	
IRS SSTR2	N=4	N=3	0,999
Mediana (variação)	7,5 (6-9)	9,0 (0-9)	
Média (DP)	7,5 (1,7)	6,0 (5,2)	
IRS SSTR5	N=4	N=3	0,435
Mediana (variação)	1 (0-6)	0 (0-1)	
Média (DP)	2,0 (2,8)	0,3 (0,6)	

DP: desvio padrão; N: número de amostras tumorais; LRS: ligantes dos receptores de somatostatina, P-valor obtido pelo teste Mann-Whitney U.

* critério para resistência: ausência de resposta hormonal para níveis de GH abaixo de 1,0 ng/mL e/ou IGF-1 normal para idade.

A avaliação do padrão de granulação do grupo GH, de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico primário, foi possível em apenas três pacientes. Em dois deles (GH03 e GH39), houve correlação entre expressão de SSTR2, padrão de granulação e resposta aos LRS. No entanto, em um caso (GH09), houve resposta ao LRS, sem expressão de SSTR2, com padrão densamente granuloso. Este caso especificamente, foi avaliado quanto à expressão de SSTR3, cujo IRS foi de 9, podendo explicar a resposta ao LRS mesmo na ausência de SSTR2.

5.2.7 Correlação entre expressão de FLNA e critérios de invasividade e agressividade tumorais

Considerando todas as amostras tumorais, não houve associação entre FLNA e quaisquer dos seguintes parâmetros: micro ou macroadenoma, invasão tumoral infrasselar, invasão tumoral parasselar, radioterapia, mais de uma neurocirurgia para ressecção tumoral, Ki-67 maior ou igual a 3% e radioterapia. A Tabela 11, abaixo, resume os dados.

Tabela 11 - Correlação entre a expressão da FLNA e tamanho tumoral, invasão tumoral (infrasselar e parasselar), número de cirurgias, radioterapia, e expressão de Ki-67

Variável	Categoria	N	FLNA		P
			Mediana (variação)	Média (DP)	
Tamanho tumoral	MIC	16	0 (0-4)	0,9 (1,2)	0,244
	MAC	81	1 (0-9)	1,6 (2,0)	
Extensão tumoral	Não	72	1 (0-6)	1,1 (1,3)	0,165
Infrasselar	Sim	25	2 (0-9)	2,4 (2,9)	
Extensão tumoral	Não	51	0 (0-6)	1,0 (1,4)	0,087
Parasselar	Sim	46	1 (0-9)	1,9 (2,3)	
Mais de um procedimento cirúrgico	Não	73	1 (0-6)	1,4 (1,6)	0,262
	Sim	24	0 (0-9)	1,5 (2,7)	
Radioterapia	Não	87	1 (0-9)	1,4 (1,8)	0,706
	Sim	10	1 (0-9)	2,1 (3,1)	
Ki-67 $\geq$ 3%	Não	80	1,0 (0-9)	NA	0,23
	Sim	15	2,0		

MIC: microadenoma; MAC: macroadenoma; NA: não avaliado;

P-valor obtido pelo teste Mann-Whitney U.

Não houve correlação entre a expressão de FLNA e idade ao diagnóstico ($\rho=0,18$; $P= 0,08$), ou entre expressão de FLNA e tamanho do maior diâmetro tumoral, em centímetros ($\rho=0,02$; $P= 0,85$).

Realizando as mesmas análises nos subtipos tumorais, houve associação entre FLNA e presença de invasão tumoral infrasselar ($P=0,004$) e tendência a associação entre FLNA e invasão tumoral parasselar ($P=0,054$) no grupo ACTH, conforme ilustrado na Tabela 12, a seguir.

Tabela 12 - Correlação entre a expressão da FLNA e invasão tumoral (infrasselar e parasselar) nos corticotropinomas

Invasão tumoral infrasselar	Não	Sim	P
IRS FLNA	N=24	N=3	0,004
Mediana (variação)	1 (0-4)	9 (6-9)	
Média (DP)	1,1 (1,2)	8,0 (1,7)	
Invasão tumoral parasselar	Não	Sim	
IRS FLNA	N=18	N=9	
Mediana (variação)	0,5 (0-4)	9 (0-9)	0,054
Média (DP)	1,0 (1,2)	3,5 (3,6)	

DP: desvio padrão; N: número de amostras tumorais; P- valor obtido pelo teste Mann-Whitney U.

Nos demais subgrupos tumorais, não houve correlação entre a expressão da FLNA e os parâmetros micro ou macroadenoma, invasão tumoral infrasselar, invasão tumoral parasselar, radioterapia, mais de uma neurocirurgia para ressecção tumoral e radioterapia, conforme detalhado no Anexo J.

5.3 Resultados da expressão do RNAm e comparação com os resultados da expressão proteica

A análise do RNAm da *FLNA*, do *DRD2*, do *SSTR2* e do *SSTR5* foi realizada nos grupos GH (N=28) e ACNF (N=13). Do grupo GH, também foram avaliadas sete amostras de pacientes que receberam tratamento medicamentoso prévio à cirurgia, sendo seis com LRS e um com CAB. A expressão do *DRD2* e da *FLNA* não diferiu entre os dois grupos, enquanto que a expressão de ambos *SSTR2* e *SSTR5* foi significativamente maior ($P < 0,001$) no grupo de GH (2,5, 0,5-5,7 e 3,8, -0,2-7,0, respectivamente), em relação ao ACNF (-1,3, -2,8-3,8 e 0,0, -0,0-3,3, respectivamente). Correlacionando-se a expressão do RNAm com a expressão proteica, houve forte correlação positiva entre a expressão do *SSTR2* ($\rho = 0,86$; $P < 0,001$) e *SSTR5* ($\rho = 0,766$; $P < 0,001$), mas não para o *DRD2* ($\rho = 0,28$; $P = 0,11$) e *FLNA* ($\rho = 0,31$; $P = 0,08$). A expressão gênica detalhada está descrita no Anexo K.

Expressão do RNAm *DRD2* e *FLNA* e resposta à cabergolina

A correlação entre expressão molecular de *DRD2*, *FLNA* e resposta a AD não pode ser realizada pelo número de casos tratados: no grupo ACNF foram três pacientes em uso de CAB, com resposta, e no grupo GH, cinco pacientes que utilizaram CAB, havendo resposta em um deles.

Expressão do RNAm *SSTR2* e *SSTR5* e resposta aos LRS no grupo de GH

No grupo GH, não houve diferença entre a expressão do *SSTR2* e do *SSTR5* nos pacientes com e sem controle hormonal com LRS, considerando-se GH < 1,0 ng/mL e/ou IGF-1 normal. No entanto, houve maior expressão do *SSTR5* nos pacientes que apresentaram níveis de GH < 1,0 ng/mL com o uso de LRS, conforme demonstrado na Tabela 13.

Tabela 13 - Correlação entre a expressão do RNAm dos *SSTR2* e *SSTR5* e a resposta ao uso de ligantes do receptor de somatostatina nos somatotropinomas

CrITÉRIOS de resposta	Resistentes aos LRS	SensÍveis aos LRS	P
GH <1,0 ng/mL e IGF-1 normal			
<i>SSTR2</i> (RQ)	2,9 ± 3,0	2,6 ± 1,4	0,81
<i>SSTR5</i> (RQ)	3,4 ± 2,4	1,2 ± 1,6	0,23
GH < 1,0 ng/mL			
<i>SSTR2</i> (RQ)	2,7 ± 2,1	2,6 ± 1,4	0,91
<i>SSTR5</i> (RQ)	0,78 ± 1,4	3,7 ± 2,2	0,05
IGF-1 normal			
<i>SSTR2</i> (RQ)	2,4 ± 1,3	3,7 ± 2,5	0,22
<i>SSTR5</i> (RQ)	3,5 ± 2,3	0,8 ± 1,4	0,07

LRS: ligantes do receptor de somatostatina

6. DISCUSSÃO

Em nossa casuística, não houve diferença na expressão de FLNA entre os diferentes subtipos de tumores hipofisários PRL, GH, ACTH e ACNF. Na literatura, apenas prolactinomas e somatotropinomas haviam sido avaliados quanto à expressão de FLNA ^(15, 16). Em nosso estudo, avaliaram-se 11 amostras de prolactinomas e não houve correlação entre expressão de FLNA e DRD2 ou destes e resposta aos AD. Nossos resultados não confirmaram os dados anteriormente publicados por Peverelli *et al.* ⁽¹⁵⁾, e, talvez o fato de a amostra de casos sensíveis aos AD ter sido pequena, possa justificar tal diferença.

Em somatotropinomas, a expressão de DRD2 havia sido avaliada apenas por Ferone *et al.* ⁽⁷³⁾ que encontraram correlação com resposta a AD apenas *in vitro*. Em nossa casuística, 63% das amostras de somatotropinomas expressaram DRD2 de forma moderada ou intensa ($IRS \geq 4$), confirmando dados anteriormente publicados ⁽¹⁷⁶⁾. A eficácia da CAB no controle hormonal foi obtida em 30% dos somatotropinomas, compatível com os dados da literatura ⁽⁷²⁾. Não encontramos correlação entre DRD2 e eficácia à CAB no grupo GH. Quanto ao grupo de corticotropinomas, a taxa de resposta hormonal com CAB e a expressão de DRD2 moderada ou intensa também foram compatíveis com os dados de literatura ⁽¹²⁴⁻¹³⁰⁾. Em nosso estudo, não encontramos correlação entre expressão de DRD2 e resposta hormonal à CAB, o que foi descrito em apenas um estudo, ainda que sem significância estatística ⁽¹²⁵⁾.

No grupo ACNF, 90% das amostras apresentaram expressão de DRD2 ao menos moderada ($\text{IRS} \geq 4$) e houve correlação entre a expressão de FLNA e de DRD2, bem como entre a expressão de FLNA e resposta à CAB. A expressão frequente de DRD2 em ACNF também foi relatada anteriormente ^(155, 159, 176), no entanto, sua correlação com resposta à CAB foi avaliada estatisticamente por apenas dois estudos ^(153, 155), sendo positiva em apenas um deles ⁽¹⁵³⁾.

A expressão da FLNA em somatotropinomas havia sido avaliada em apenas um estudo ⁽¹⁶⁾, no qual não houve correlação com a expressão de SSTR2, porém demonstrou-se que a presença da FLNA foi necessária para a sinalização intracelular do SSTR2, após ligação com agonista. Em nosso estudo, a expressão moderada ou intensa ($\text{IRS} \geq 4$) de FLNA ocorreu em 3% dos casos, a expressão moderada ou intensa de SSTR5, em 31%, e de SSTR2, em 80% dos casos. Não houve correlação entre a expressão de FLNA e SSTR2, entre FLNA e SSTR5, ou entre FLNA e resposta hormonal aos LRS. Ainda que a expressão de SSTR2 e SSTR5, gênica e proteica, tenha sido maior nos somatotropinomas, conforme dados da literatura ^(106, 177), não encontramos correlação entre a expressão de SSTR2 e resposta aos LRS, apenas entre a expressão molecular de SSTR5 e resposta aos LRS, quanto ao parâmetro $\text{GH} < 1,0 \text{ ng/mL}$. Sabe-se que os LRS de primeira geração apresentam maior afinidade ao SSTR2 e que a expressão desse receptor é necessária ^(84-86, 100-102), porém não suficiente ^(110, 111) para resposta a essas drogas. Apesar das diferenças nos métodos de detecção do SSTR2 (gene ou proteína), dos diversos anticorpos utilizados nos estudos com imunohistoquímica, na inclusão ou não de pacientes com tratamento clínico primário, e na utilização de diferentes critérios para controle hormonal na acromegalia, a

grande maioria dos estudos confirma a correlação entre SSTR2 e resposta aos LRS^(84-86, 100-102). No único estudo prévio no qual não houve tal correlação⁽¹⁰³⁾, os autores ponderam que a expressão do receptor não garantiu a resposta adequada aos LRS. Em nossa casuística, avaliando apenas os pacientes com tratamento cirúrgico ou o grupo total, não houve diferença na expressão de SSTR2, fato que ainda é controverso na literatura^(100, 103). Ainda que não tenhamos encontrado associação entre a expressão de SSTR2 e resposta aos LRS, apenas um paciente (GH08) apresentou resposta hormonal ao LRS sem a presença do SSTR2. Porém, a expressão de SSTR5 na amostra tumoral desse paciente poderia justificar a resposta medicamentosa.

Vale lembrar que, em nosso estudo, considerou-se a expressão de SSTR2 e SSTR5 na membrana, o que é discutível entre os autores: alguns utilizaram localização citoplasmática para análise da IHQ⁽¹⁰³⁾, enquanto outros preconizam a localização na membrana, que refletiria o estado funcional do receptor^(104, 105).

Em nosso estudo, analisamos também a expressão da FLNA com critérios de agressividade e invasividade tumorais. Ainda que a definição dessas características não seja uniforme^(20, 24), muitos autores consideram os sinais de invasão parasselar e infrasselar, nos exames de imagem e achados intra-operatórios, como invasividade e a presença de múltiplos tratamentos, necessidade de radioterapia e índice de proliferação celular Ki-67 acima de 3% como características de agressividade tumorais⁽²⁶⁾. Incluindo todos os subtipos tumorais, não houve correlação entre FLNA e invasividade/agressividade. No entanto, no grupo ACTH, houve correlação com invasão infrasselar e tendência na correlação com invasão parasselar. É interessante notar que nossa casuística

de corticotropinomas é peculiar pela alta frequência de macroadenomas, incluindo dois tumores gigantes. Nossos resultados apontam para um papel da FLNA específico para os corticotropinomas, relacionado a motilidade e invasividade tumorais. Em alguns estudos tem-se verificado que o sistema Notch, que regula o “destino” das células, através da inibição lateral, permitindo a formação de “barreiras” entre células de um mesmo tipo ou não ⁽¹⁷⁸⁾, participa do processo de tumorigênese dos tumores hipofisários ⁽¹⁷⁹⁻¹⁸¹⁾, inclusive em corticotropinomas ⁽¹⁸²⁾. Há evidências de que a FLNA forme um complexo com Notch e outras proteínas ⁽¹⁸³⁾, portanto, o aumento da expressão de FLNA nos corticotropinomas invasivos poderia estar relacionado a maior ativação do sistema Notch. Outros elementos do citoesqueleto celular têm sido implicados na invasividade de tumores hipofisários. Peverelli *et al.* ⁽¹⁸⁴⁾ descreveram que a menor expressão da cofilina, outra proteína que se liga à actina e participa de sua polimerização, correlacionou-se à invasividade em ACNF, e que sua perda de função, após fosforilação por ação de AD, pode estar envolvida no mecanismo da redução tumoral com o tratamento medicamentoso. Outros autores demonstraram que a expressão da fascina (FSCN1) se correlacionou à invasividade de tumores de hipófise e que a redução dessa proteína promove redução da ativação dos níveis de Notch 1 ⁽¹⁸⁵⁾. Essas evidências recentes sugerem que estudos que correlacionem estruturas do citoesqueleto celular e invasividade em tumores hipofisários poderão esclarecer novos mecanismos de tumorigênese e apontar para novas possibilidades medicamentosas.

7. CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados, concluímos que:

- Não houve diferença na expressão da FLNA, entre os diferentes subtipos de tumores de hipófise;
- No grupo GH, houve maior expressão de SSTR2 e SSTR5, comparada aos outros grupos, porém não houve correlação com expressão de FLNA, ou, ainda, com a resposta aos ligantes do receptor de somatostatina;
- No grupo ACNF, houve maior expressão de DRD2 e correlação moderada entre a expressão de DRD2 e de FLNA. Houve correlação positiva entre a expressão de DRD2 e resposta à CAB, no entanto, não houve correlação entre a expressão de FLNA e resposta à CAB;
- No grupo ACTH, houve associação entre a expressão de FLNA e a presença de invasão tumoral infrasselar e tendência a associação entre FLNA e invasão tumoral parasselar.

8. ANEXOS

Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos pacientes incluídos no estudo

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :SEXO : .M ☐ F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇONº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :SEXO : .M ☐ F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇONº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Estudo da expressão gênica e proteica da filamina A e sua correlação com a expressão e função dos receptores de dopamina D2 e de somatostatina SST2 e SST5 nos adenomas hipofisários”

2. PESQUISADORES: Responsável: Dra Andrea Glezer / Executante: Thais Sickler

CARGO/FUNÇÃO: Médicos; INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 90751

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Neuroendocrinologia, Serviço/Disciplina de Endocrinologia e Metabologia – Divisão de Clínica Médica 1

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses (previsão)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s) essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. Os tumores hipofisários podem ou não produzir hormônios. Dependendo do tipo de hormônio produzido o paciente apresenta uma doença diferente como o aumento do hormônio do crescimento (acromegalia), aumento do cortisol (doença de cushing), aumento da PRL (prolactinoma). No entanto, o quadro clínico, a elevação hormonal e a resposta ao tratamento variam entre pacientes com o mesmo tipo de tumor. Este estudo visa pesquisar a presença de alterações genéticas em pacientes com tumores hipofisários, que possam justificar essas variações.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiro: será realizada análise genética no tecido do tumor de hipófise, obtido durante a cirurgia indicada para o tratamento. Essa análise não muda o tratamento recebido.

3 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto para o participante, pois trata-se de estudo que avalia se há alterações genéticas relacionadas com sintomas dos pacientes com adenomas hipofisários.

4 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: não há.

5– Garantia de acesso em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas referentes aos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa. O principal investigador é a Dra Andrea Glezer e a Pesquisadora Executante é Thais de Paula Sickler que podem ser encontrados no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 5º andar, bloco 4B ambulatório de Endocrinologia, telefones: 2661-6745/ 2661-6293 / 2661-6624. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225, Bairro Cerqueira Cesar – 5º andar – tel: 2661-7585, FAX: 2661-7585, e-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

6– É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

7 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

8 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

9 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

10- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo referido.

Li este documento e seu conteúdo foi explicado para mim por Dra Andrea Glezer / Dra. Thais de Paula Sickler.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Forneço, de livre e espontânea vontade, meu consentimento para participar deste estudo sabendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

☐ Sim, eu recebi uma cópia assinada do termo de consentimento livre.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

Anexo B - Aprovação da comissão de ética para análise de projetos de pesquisa

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA FILAMINA A E SUA CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO E FUNÇÃO DOS RECEPTORES DE DOPAMINA D2 E DE SOMATOSTATINA SST2 E SST5 NOS ADENOMAS HIPOFISÁRIOS.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Marcello Dellano Bronstein

Versão: 1

Pesquisador Executante: Thais de Paula Sickler

CAAE: 13288613.7.0000.0068

Co-autores: Andrea Glezer, Ericka B. Trarbach

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Orientador: dr. Marcello Dellano Bronstein

Instituição: HCFMUSP

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10449

Número do Parecer: 352.286

Data da Relatoria: 07/08/2013

Apresentação do Projeto: Trata-se de estudo prospectivo em que será analisada a expressão da proteína filamina e sua correlação com a expressão de receptores hipofisários em material de tumores da hipófise operados por diferentes indicações clínicas

Objetivo da Pesquisa: Determinar a expressão gênica e proteica da filamina em tumores hipofisários tratados por cirurgia e sua correlação com a expressão de receptores conhecidos da hipófise e as relações com os quadros clínicos

Avaliação dos Riscos e Benefícios: A pesquisa não adiciona risco significativo e não interfere com o tratamento desses pacientes

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa pode adicionar conhecimento em mecanismos fisiopatológicos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: No cadastro do projeto, o desenho do estudo foi incorretamente classificado de retrospectivo. Como será coletado material a fresco para a análise, trata-se de estudo prospectivo observacional. Os autores estimam um custo de R\$ 80.000,00 e assumem esse custo com autofinanciamento. A Divisão de anatomia patológica e a Disciplina de Endocrinologia estão cientes

Recomendações: No processo de triagem solicitou-se atualização do número de telefone da CAPPesq. Isso deve também ser feito no telefone de contato dos pesquisadores, onde ainda lê-se o prefixo 3069. Corrigir o desenho do estudo no cadastro da pesquisa. Adicionar carta de anuência do neurocirurgião que possivelmente coletará o material.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O estudo não tem impedimento para sua realização, mas pede-se aos pesquisadores que atendam às solicitações o mais breve possível.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 09 de Agosto de 2013

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Professora Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
Em Endocrinologia

Anexo C - Procedimento de imuno-histoquímica dos hormônios hipofisários na rotina diagnóstica dos tumores hipofisários

O protocolo das reações para o diagnóstico anátomo-patológico complementar dos tumores hipofisários, de imunohistoquímica dos hormônios hipofisários, realizado no DAP HCFMUSP, baseia-se nas seguintes etapas:

1. Desparafinização (a quente): em xilol (estufa) entre 50°C à 80 °C, por 10 minutos;
2. Desparafinização (a frio): em xilol a temperatura ambiente por 2 minutos;
3. Hidratação dos cortes em: álcool absoluto em cinco cubas (cinco vezes).
Lavagem em água corrente e destilada;
4. Bloqueio da peroxidase endógena com: água oxigenada 6% (20 volumes), bloqueio de 20 minutos. Lavar em água corrente e desmineralizada;
5. Pré-tratamento (restrito a alguns antígenos): recuperação a quente panela de pressão de 2 a 5 minutos, com solução de ácido cítrico 0,01M, pH 6,0 ou TRIS/EDTA pH 9,0. Lavar em água corrente / desmi e tampão PBS, pH 7,2 à 7,4 (três vezes);
6. Incubação do anticorpo primário (específico para o antígeno), diluído em solução de albumina a 1% em PBS, em câmara úmida: overnight de 0 a 8°C. No segundo dia pela manhã, realizar lavagens em tampão PBS pH 7,2 à 7,4 (três vezes). Para o ACTH, utiliza-se o anticorpo monoclonal de camundongo (Clone 02A3, DAKO®) na diluição de 1:10.000; para LH, o anticorpo monoclonal de camundongo (Cell Marque®) 1:500; FSH, o anticorpo policlonal de coelho (DAKO®) 1:20.000; para TSH, o anticorpo

- policlonal de camundongo (Cell Marque ®) 1:25; para TSH, o anticorpo policlonal de camundongo (Cell Marque ®) 1:25; para GH, o anticorpo policlonal de camundongo (Cell Marque ®) 1:6.000; e para a PRL, o anticorpo policlonal de camundongo (Cell Marque ®) 1:20.000;
7. Incubação com secundário ligado ao polímero, em câmara úmida por 30 minutos em temperatura de 35 °C à 40 °C. Lavagens em tampão PBS pH 7,2 a 7,4 (três vezes);
 8. Incubação em câmara úmida com complexo conjugado à peroxidase, por 30 minutos, em temperatura de 35 °C à 40 °C. Lavagens em tampão PBS pH 7,2 a 7,4 (três vezes);
 9. Revelação com cromogênico daminobenzidina, pronto para uso por 5 minutos. Lavagem em água corrente e destilada;
 10. Contra coloração em hematoxilina de Harris (um a dois minutos). Lavagem em água corrente e destilada;
 11. Desidratação dos cortes em: álcool absoluto (cinco vezes) e xilol (cinco vezes);
 12. Montar a lâmina com lamínula e entellan (meio de montagem);
 13. Etiquetar a lâmina com respectivo número de entrada, antígeno utilizado, data e número de controle interno ⁽¹⁸⁶⁾.

Anexo D - Procedimentos de imunoperoxidase utilizados para imunohistoquímica da Filamina A, DRD2, SSTR2, SSTR5 e Ki-67

1. Desparafinização dos cortes de 3 μ de espessura, do material incluído em parafina: incubação com xilol a 60° C por 20 minutos seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 15 minutos;
2. Hidratação dos cortes em concentrações de etanol a 100% com três banhos de 30 segundos cada, etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada;
3. Recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 (Merck®, E.U.A.) ou pH8,0 (tampão EDTA 1mM) ou pH 9,0 (tampão Tris-EDTA 1mM) em panela a vapor (após a fervura da água da panela, colocar a cuba com as lâminas em solução de recuperação), por 40 minutos. Deixar esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente. Lavagens em água corrente e água destilada;
4. Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de dez minutos cada. Lavagens em água corrente e água destilada. Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por cinco minutos;
5. Bloqueio de proteínas com Cas Block (Zymed®) por dez minutos a 37° C. Escorrer e incubar com o anticorpo primário;
6. Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (SIGMA®, E.U.A.) a 1,0% e azida sódica NaN₃ (Inlab®, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida:

30 min. a 37° C e, em seguida, 18 horas (*overnight*) a 4° C. Lavagens em tampão PBS com três trocas de cinco minutos cada;

7. Incubação com o bloqueador pós-primário (Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System®, Newcastle, Reino Unido), por 30 minutos a 37°C. Lavagens com tampão PBS com três trocas de três a cinco minutos cada.

8. Incubação com NovoLink® (Polímero) do mesmo *kit* por 30 minutos a 37 °C;

9. Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma®, E.U.A.) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfoxido (Labsynth®) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37 °C. Lavagens em água corrente e água destilada;

10. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por um minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada;

11. Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (três trocas de um minuto cada), diafanização em banhos de xilol e montagem em meio permanente (Entellan Merck®) com lamínula.

Os controles utilizados na reação imunohistoquímica compreendem, um controle positivo sabidamente positivo para o Anticorpo em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos IHQ ⁽¹⁸⁶⁾.

Anexo E - Procedimentos de imunoperoxidase utilizados para imuno-histoquímica do padrão de granulação dos somatotropinomas

O procedimento de imuno-histoquímico para realização da citoqueratina 8 nos somatotropinomas utilizou o anticorpo Monoclonal mouse anti human Cytokeratin (clone 35 β H11), DAKO® cod. M0631. Título: 1/1000, steamer, pH 6 3+ (Spring) foi utilizado para IHQ do CAM e a metodologia está descrita a seguir:

1. Desparafinização dos cortes de 3 μ de espessura, do material incluído em parafina: incubação com xilol a 60° C por 15 minutos seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 15 minutos;
2. Hidratação dos cortes em concentrações de Etanol a 100% com 3 banhos de 30 segundos cada, Etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada;
3. Recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de tampão citrato pH 6,0 (PMB1-125) Spring Bioscience®, em panela a vapor (após a fervura da água da panela, colocar a cuba com as lâminas em solução de recuperação), por 35 minutos. Deixar esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente. Lavagens em água corrente e água destilada;
4. Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada. Lavagens em água corrente e água destilada. Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por cinco minutos;
5. Bloqueio de proteínas com Cas Block (Zymed®) por dez minutos a 37° C. Escorrer e incubar com o anticorpo primário;

6. Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (SIGMA®, E.U.A.) a 1,0% e azida sódica NaN_3 (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 min. a 37° C e, em seguida, 18 horas (overnight) a 4° C. Lavagens em tampão PBS com três trocas de cinco minutos cada;
7. Incubação com o bloqueador pós-primário (Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Newcastle, Reino Unido), por 30 minutos a 37° C. Lavagens com tampão PBS com três trocas de 3 a 5 minutos cada.
8. Incubação com NovoLink (Polímer) do mesmo *kit* por 30 minutos a 37 °C;
9. Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma®, E.U.A.) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfoxido (Labsynth) a 1% em PBS, em banho de cinco minutos, a 37 °C. Lavagens em água corrente e água destilada;
10. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por um minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada;
11. Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (três trocas de um minuto cada), diafanização em banhos de xilol e montagem em meio permanente (Entellan Merck®) com lamínula.

Os controles utilizados na reação imuno-histoquímica compreendem, um controle positivo sabidamente positivo para o Anticorpo em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imuno-histoquímicos ⁽¹⁸⁶⁾.

Anexo F - Características clínicas, laboratoriais e de imagem ao diagnóstico

Pacientes	Idade (anos)	Sexo	GH ng/ml	IGF-1 ng/ml	ULNR-IGF-1 (%)	FU µg/24h	PRL ng/ml	Tumor ao diagnóstico	Maior diâmetro tumoral (cm)	Invasão tumoral		
										Infrasselar	Suprasselar	Parasselar
PRL01	24	F					266	Mac	2,9	Sim	Não	Sim
PRL02	14	M					6000	Mac	3	Não	Não	Não
PRL03	24	F					189	Mac	1,1	Não	Não	Não
PRL04	13	F					1519	Mac	2,4	Não	Sim	Não
PRL05	16	F					2029	Mac	3	Não	Sim	Sim
PRL06	15	F					158	Mic	0,6	Não	Não	Não
PRL07	26	M					1000	Mac	5	Não	Sim	Sim
PRL08	18	F					500	Mac	1,6	Sim	Não	Não
PRL09	33	F					179	Mac	2,2	Não	Não	Não
PRL10	22	F					305	Mac	1,5	Não	Sim	Não
PRL11	12	F					1883	Mac	2,8	Não	Não	Sim
GH01	21	F	220,7	1171	343			Mac	4,2	Sim	Sim	Sim
GH02	26	F	1,1	344	107			Mac	2,3	Não	Sim	Sim
GH03	36	F	47,8	1177	396			Mac	3	Não	Sim	Sim
GH04	52	F	1261	1074	461			Mac	5,6	Não	Sim	Sim
GH05	38	M	91,2	1528	551			Mac	1,8	Não	Sim	Sim
GH06	18	M	1,7	923	202			Mac	1,7	Não	Sim	Não
GH07	39	M	183	1206	435			Mac	2,6	Sim	Sim	Sim
GH08	37	F	99	1136	435			Mac	4	Não	Sim	Sim
GH09	71	M	6,4	784	426			Mac	1,7	Não	Não	Não
GH10	30	F	35,5	854	288			Mac	3,9	Não	Sim	Sim
GH11	46	F	9,6	942	383			Mac	1,6	Sim	Sim	Sim
GH12	41	F	6,3	487	176			Mac	3,5	Sim	Não	Sim
GH13	29	M	25	1150	387			Mac	1,6	Não	Não	Não
GH14	46	F	9,6	1096	470			Mac	1	Não	Não	Não
GH15	72	M	24,1	988	537			Mic	0,7	Não	Não	Não
GH16	45	M	85,5	1600	616			Mac	6,4	Sim	Sim	Sim
GH17	30	F	16,1	1101	370			Mac	1,6	Não	Sim	Sim
GH18	26	M	15,1	1078	316			Mac	1,8	Não	Não	Não
GH19	24	M	69	1003	312			Mac	1,8	Sim	Não	Sim
GH20	62	F	18,9	524	146			Mac	3,2	Não	Sim	Não
GH21	26	F	1,6	524	189			Mac	2	Sim	Sim	Sim
GH22	46	M	5,6	1068	434			Mac	2	Sim	Não	Não
GH23	34	M	6,2	871	314			Mic	0,6	Não	Não	Não
GH24	73	F	14,3	1588	863			Mac	2,2	Não	Não	Sim
GH25	30	M	1,1	637	ND			Mac	5	Não	Sim	Sim
GH26	35	F	5,4	392	132			Mac	2,5	Não	Sim	Não
GH27	30	F	40	1841	ND			Mac	ND	Não	Sim	Não
GH28	54	F	37,9	1072	460			Mac	2,2	Não	Sim	Não
GH29	46	F	2,9	724	350			Mac	1	Não	Sim	Não
GH30	52	F	20,6	1297	557			Mac	2,5	Sim	Sim	Sim
GH31	50	F	124	721	348			Mac	2,2	Sim	Sim	Sim
GH32	58	M	2,9	661	300			Mic	0,6	Não	Não	Não
GH33	55	F	27,2	997	405			Mac	1,6	Não	Sim	Não
GH34	18	F	75,3	1481	324			Mac	3,4	Não	Sim	Sim
GH35	20	M	3,4	957	389			Mic	0,8	Não	Não	Sim
GH36	37	F	221,8	1241	448			Mac	3,7	Sim	Sim	Sim
GH37	38	M	8,1	721	260			Mac	4,9	Sim	Sim	Sim
GH38	30	M	76	829	258			Mac	4	Não	Sim	Sim
GH39	39	F	37,4	1498	541			Mac	2,2	Sim	Não	Sim
GH40	21	F	16	1114	402			Mac	1,5	Não	Sim	Não
GH41	50	F	3,7	871	374			Mac	1,2	Não	Não	Sim
GH42	22	F	139	1128	331			Mac	2,2	Não	Sim	Sim
GH43	48	M	8,38	976	397			Mic	0,9	Sim	Não	Não
GH44	40	F	6,3	931	357			Mac	1,1	Não	Não	Sim
GH45	61	F	3,5	1032	469			Mac	1,1	Não	Não	Não
GH46	44	F	148,8	1087	416			Mac	2	Não	Sim	Sim
GH47	25	M	76	895	226			Mac	2,5	Sim	Sim	Sim
GH48	31	F	18,2	762	256			Mac	2,5	Não	Sim	Não

Continua...

Conclusão Anexo F

Pacientes	Idade (anos)	Sexo	GH ng/ml	IGF-1 ng/ml	ULNR-IGF-1 (%)	FU µg/24h	PRL ng/ml	Tumor ao diagnóstico	Maior diâmetro tumoral (cm)	Invasão tumoral		
										Infrasselar	Suprasselar	Parasselar
ACTH01	27	F				245		Mic	0,7	Não	Não	Não
ACTH02a	43	F				445,2		Mac	2,5	Não	Não	Sim
ACTH02b	43	F				445,2		Mac	2,5	Não	Não	Sim
ACTH03	70	F				269,2		Mac	1,5	Não	Não	Não
ACTH04	34	F				736		Mic	0,8	Não	Não	Não
ACTH05	14	F				1110		Mic	ND	Não	Não	Não
ACTH06	53	F				430		Mic	0,7	Não	Não	Não
ACTH07a	30	F				578		Mac	4	Sim	Não	Sim
ACTH07b	30	F				578		Mac	4	Sim	Não	Sim
ACTH08	25	F				624		Mac	1,6	Não	Não	Não
ACTH09	25	F				568		Mic	0,7	Não	Não	Não
ACTH10a	39	F				610		Mic	0,6	Não	Não	Não
ACTH10b	39	F				610		Mic	0,6	Não	Não	Não
ACTH11	35	F				1339		Mac	1	Não	Não	Sim
ACTH12	28	F				ND		Mic	0,9	Não	Não	Não
ACTH13	34	F				156		Mac	1,6	Não	Não	Sim
ACTH14	24	F				517		Mac	1,2	Não	Sim	Não
ACTH15	26	F				1322		Mic	0,3	Não	Não	Não
ACTH16	50	F				395		Mac	1,8	Não	Não	Sim
ACTH17	49	F				600		Mic	0,3	Não	Não	Não
ACTH18	41	F				611,5		Mac	1	Não	Não	Não
ACTH19	55	M				997		Mic	N	Não	Não	Não
ACTH20	35	F				568		Mic	0,7	Não	Não	Não
ACTH21	38	F				650		Mic	0,8	Não	Não	Não
ACTH22	47	F				925		Mac	1,1	Não	Não	Não
ACTH23	29	F				724		Mic	0,9	Não	Não	Não
ACTH24	14	F				1207		Mac	1,9	Não	Não	Não
ACTH25	51	F				380		Mic	0,8	Não	Não	Não
ACTH26	31	F				304		Mic	0,7	Não	Não	Não
ACTH27	38	F				671		Mic	0,3	Não	Não	Não
ACTH28	40	F				638		Mic	0,8	Não	Não	Não
ACTH29	42	F				70		Mac	1,1	Não	Não	Não
ACTH30	32	M				771		Mic	0,9	Não	Não	Não
ACTH31	20	F				1186		Mac	2	Não	Não	Sim
ACTH32	17	F				87,9		Mac	5,4	Sim	Sim	Sim
ACNF01	49	F						Mac	2,6	Não	Sim	Não
ACNF02	63	M						Mac	2,1	Não	Sim	Sim
ACNF03a	43	M						Mac	1,9	Não	Sim	Não
ACNF03b	43	M						Mac	1,9	Não	Sim	Não
ACNF04	71	F						Mac	2	Não	Sim	Não
ACNF05	51	M						Mac	2,8	Não	Sim	Não
ACNF06	48	M						Mac	2,6	Sim	Sim	Sim
ACNF07	63	M						Mac	6	Sim	Sim	Sim
ACNF08	56	M						Mac	3,4	Sim	Sim	Sim
ACNF09	62	M						Mac	3,4	Não	Sim	Sim
ACNF10	47	F						Mac	4	Sim	Sim	Sim
ACNF11	65	F						Mac	2,8	Não	Sim	Sim
ACNF12	58	F						Mac	3,8	Sim	Sim	Sim
ACNF13a	43	F						Mac	4,2	Não	Sim	Não
ACNF13b	43	F						Mac	4,2	Não	Sim	Não
ACNF14	45	F						Mac	3,4	Não	Sim	Não
ACNF15	49	F						Mac	2,2	Sim	Sim	Sim
ACNF16	36	F						Mac	2	Sim	Sim	Sim
ACNF17	42	F						Mac	2,4	Sim	Sim	Sim
ACNF18	47	M						Mac	2,7	Sim	Sim	Sim
ACNF19	26	F						Mac	2,8	Não	Sim	Não
ACNF20	30	F						Mac	3	Não	Sim	Não
ACNF21	33	F						Mac	1,3	Não	Sim	Não
ACNF22	67	M						Mac	3	Não	Sim	Não
ACNF23	61	F						Mac	2,7	Não	Sim	Não
ACNF24	56	F						Mac	3,5	Sim	Sim	Sim
ACNF25	67	M						Mac	2,9	Não	Sim	Sim

Legenda: ACNF: Adenoma Clinicamente não funcionante; ACTH: Doença de Cushing; F: Feminin; FU: cortisol urinário; GH: somatotropinomas; M: Masculino; Mic: microadenomas; Mac: macroadenomas; PRL: prolactinomas

Anexo G - Tratamento primário, imuno-histoquímica diagnóstica, número de cirurgias, resposta ao tratamento clínico (CAB e/ou LRS) e necessidade de radioterapia

Pacientes	Tratamento primário	IHQ tumor	Nº Cirurgias	Resposta hormonal						uso de CAB e LRS; resposta	Resposta CAB	dose CAB (mg) e tempo (meses)	RDT
				LRS	LRS	LRS	CAB	CAB	CAB				
				GH < 1,0 ng/ml e IGF1nl	GH < 1,0 ng/ml	IGF-1nl	GH < 1,0 ng/ml e IGF1nl	GH < 1,0 ng/ml	IGF-1nl	GH < 1,0 ng/ml e/ou IGF1nl			
PRL01		PRL	1								Não	3,5/48	Não
PRL02		PRL	2								Não	7/120	Sim
PRL03		PRL	1								Não	3,0/84	Não
PRL04		PRL	1								Não	3,0/36	Não
PRL05		PRL	2								Não	3,5/6	Sim
PRL06*		PRL/GH	1								Sim	1,0/14	Não
PRL07		PRL	3								Não	3,5/96	Sim
PRL08*		PRL	1								Sim	2,0/2016	Não
PRL09		PRL	1								Não	1,0/11	Não
PRL10		PRL	1								Não	1,5/4	Não
PRL11		PRL	1								Não	10,5/108	Não
GH01	CIR	GH/PRL	1				Não	Não	Não	sim/ não			Não
GH02	CIR	GH	2	Não	Não	Sim							Não
GH03	CIR	GH	1	Não	Não	Não				sim/ não			Não
GH04	CIR	GH/PRL	1	Não	Não	Não				sim/ não			Não
GH05	CIR	GH	1										Não
GH06	CIR	GH/PRL	1										Não
GH07	Cab	GH/PRL	1				Não	Não	Não	sim/ sim			Não
GH08	CIR	GH	2	Sim	Sim	Sim							Não
GH09	CIR	GH	1	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não				Não
GH10	CIR	GH	2										Não
GH11	CIR	GH	1										Não
GH12	CIR	GH/PRL	1										Não
GH13	LRS	GH/PRL/FSH	1	Não	Não	Não							Não
GH14	CIR	GH/PRL	1				Não	Não	Não				Não

Continua...

Continuação Anexo G

Pacientes	Tratamento primário	IHQ tumor	Nº Cirurgias	Resposta hormonal						uso de CAB e LRS; resposta	Resposta CAB	dose CAB (mg) e tempo (meses)	RDT
				LRS	LRS	LRS	CAB	CAB	CAB				
				GH < 1,0 ng/ml e IGF1nl	GH < 1,0 ng/ml	IGF-1nl	GH < 1,0 ng/ml e IGF1nl	GH < 1,0 ng/ml	IGF-1nl	GH < 1,0 ng/ml e/ou IGF1nl			
GH15	CIR	GH, LH e FSH	1				ND	Não	ND				Não
GH16	LRS	PRL/GH	1	Não	Não	Não							Não
GH17	CIR	GH	1										Não
GH18	CIR	GH/PRL	1										Não
GH19	Cab	GH	1	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	sim/ sim			Não
GH20	CIR	GH	2				Sim	Sim	Sim				Sim
GH21	CIR	GH/PRL	1										Não
GH22	CAB, CAB+LRS	NEGATIVO	1							sim/ não			Não
GH23	CIR	GH/PRL	1				Não	Sim	Não				Não
GH24	LRS	GH	1	Não	Não	Não				sim/ não			Não
GH25	CIR	GH/TSH/PRL	2										Não
GH26	CIR	GH/PRL	1	Não	Não	Não	Não	Não	Não				Não
GH27	CIR	GH	1				ND	ND	Sim	sim/ não			Não
GH28	CIR	GH	1	Não	Não	Não							Não
GH29	CIR	GH	1										Não
GH30	LRS	GH	1	Não	Não	Não							Não
GH31	LRS	GH/PRL	1	Não	Não	Não				sim/ não			Não
GH32	CIR	GH	1										Não
GH33	CIR	GH	1										Não
GH34	CIR	GH, LH e FSH	2	Não	Não	Não							Não
GH35	cab	GH/PRL	1										Não
GH36	CIR	GH	1	Não	Não	Não							Não
GH37	cab	GH/PRL	1	Não	Não	Não							Não
GH38	CIR	GH	1	Não	Não	Não				sim/ não			Não
GH39	CIR	GH/PRL	1	Não	Sim	Não				sim/ sim			Não
GH40	CIR	GH	1										Não
GH41	CIR	GH	1										Não
GH42	LRS	GH	1	nd	Não	ND	ND	Não	ND	sim/ sim			Não

Continua...

Continuação Anexo G

Pacientes	Tratamento primário	IHQ tumor	Nº Cirurgias	Resposta hormonal						uso de CAB e LRS; resposta	Resposta CAB	dose CAB (mg) e tempo (meses)	RDT
				LRS	LRS	LRS	CAB	CAB	CAB				
				GH < 1,0 ng/ml e IGF1nl	GH < 1,0 ng/ml	IGF-1nl	GH < 1,0 ng/ml e IGF1nl	GH < 1,0 ng/ml	IGF-1nl	GH < 1,0 ng/ml e/ou IGF1nl			
GH43	LRS	GH	1	Não	Não	Não							Não
GH44	CIR	GH	1										Não
GH45	CIR	GH	1										Não
GH46	CIR	GH	1	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não				Não
GH47	CIR	GH	1	Não	Não	Não	Não	Não	Não				Não
GH48	LRS	GH	1				Sim	Sim	Sim				Não
ACTH01	CIR	ACTH	2										Não
ACTH02a	CIR	ACTH	2										Sim
ACTH02b	CIR	ACTH	2										Sim
ACTH03	CIR	ACTH	1										Não
ACTH04	CIR	ACTH	1										Sim
ACTH05	CIR	ACTH	2								Não	3,5/6	Sim
ACTH06	CIR	ACTH	1										Não
ACTH07a	CIR	ACTH	2										Sim
ACTH07b	CIR	ACTH	2										Sim
ACTH08	CIR	ACTH	1								Não	3,5/9	Não
ACTH09	CIR	ACTH	1										Não
ACTH10a	CIR	ACTH	2										Não
ACTH10b	CIR	ACTH	2								Não	3,5/12	Não
ACTH11	CIR	ACTH	2										Não
ACTH12	CIR	ACTH	1										Sim
ACTH13	CIR	ACTH	1								Sim	3,5/17	Não
ACTH14	CIR	ACTH	1										Não
ACTH15	CIR	ACTH	2										Não
ACTH16	CIR	ACTH	1										Não
ACTH17	CIR	ACTH	1										Não
ACTH18	CIR	ACTH	1										Não
ACTH19	CIR	NEGATIVO	1										Não
ACTH20	CIR	ACTH	1										Não

Continua...

Continuação Anexo G

Pacientes	Tratamento primário	IHQ tumor	Nº Cirurgias	Resposta hormonal						uso de CAB e LRS; resposta	Resposta CAB	dose CAB (mg) e tempo (meses)	RDT
				LRS	LRS	LRS	CAB	CAB	CAB				
				GH < 1,0 ng/ml e IGF1nl	GH < 1,0 ng/ml	IGF-1nl	GH < 1,0 ng/ml e IGF1nl	GH < 1,0 ng/ml	IGF-1nl	GH < 1,0 ng/ml e/ou IGF1nl			
ACTH21	CIR	ACTH	1										Não
ACTH22	CIR	ACTH	1										Não
ACTH23	CIR	ACTH	1								Sim	3,5/8	Não
ACTH24	CIR	ACTH	1										Não
ACTH25	CIR	ACTH	1										Não
ACTH26	CIR	ACTH, PRL, GH	1										Não
ACTH27	CIR	ACTH	1										Não
ACTH28	CIR	ACTH	1										Não
ACTH29	CIR	ACTH	1										Não
ACTH30	CIR	ACTH	1										Não
ACTH31	CIR	ACTH	1								Não	3,5/4	Não
ACTH32	CIR	NEGATIVO	4										Não
ACNF01	CIR	TSH positivo focal< 10%	1								Sim	3,5/6	Não
ACNF02	CIR	TSH 10-50%, FSH10%, LH 10%	1										Não
ACNF03a	CIR	Null cell	2										Não
ACNF03b	CIR	Null cell	2								Não	1,5/39	Não
ACNF04	CIR	null cell	1										Não
ACNF05	CIR	TSH positivo focal< 10%	1										Não
ACNF06	CIR	Null cell	1										Não
ACNF07	CIR	ACTH/PRL/GH positivo focal< 10%	1								Sim	3,5/23	Não
ACNF08	CIR	FSH /LH positivo focal< 10%	1										Não

Continua...

Conclusão Anexo G

Pacientes	Tratamento primário	IHQ tumor	Nº Cirurgias	Resposta hormonal						uso de CAB e LRS; resposta	Resposta CAB	dose CAB (mg) e tempo (meses)	RDT
				LRS	LRS	LRS	CAB	CAB	CAB				
				GH < 1,0 ng/ml e IGF1nl	GH < 1,0 ng/ml	IGF-1nl	GH < 1,0 ng/ml e IGF1nl	GH < 1,0 ng/ml	IGF-1nl	GH < 1,0 ng/ml e/ou IGF1nl			
ACNF09	CIR	Null cell	1								Sim	3,5/57	Não
ACNF10	CIR	Null cell	1										Não
ACNF11	CIR	TSH /LH positivos em < 10%	2								Sim	3,5/60	Não
ACNF12	CIR	Null cell	1										Não
ACNF13a	CIR	Null cell	3										Não
ACNF13b	CIR	Null cell	3								Não	3,5/10	Não
ACNF14	CIR	null cell	1										Não
ACNF15	CIR	Null cell	1										Não
ACNF16	CIR	Null cell	1										Não
ACNF17	CIR	Null cell	1										Não
ACNF18	CIR	TSH /FSH positivos em < 10%, dura-mater infiltrada	3										Sim
ACNF19	CIR	Null cell	1								Não	3,5/31	Não
ACNF20	CIR	Null cell	2										Não
ACNF21	CIR	GH 10-50%, LH e FSH 10%, PRL 10-50%	1										Não
ACNF22	CIR	Null cell	1										Não
ACNF23	CIR	Null cell	1										Não
ACNF24	CIR	Null cell	2										Não
ACNF25	CIR	FSH 10-50%	1										Não

Legenda: ACNF: Adenoma Clinicamente não funcionante; ACTH: Doença de Cushing; CAB: cabergolina; CIR: cirurgia; GH: somatotropinomas; LRS: Ligantes do receptor de somatostatina; PRL: prolactinomas; RDT: radioterapia; * indicação cirúrgica por intolerância à cabergolina

Anexo H - Fluxograma de tratamento cirúrgico e medicamentoso do grupo GH

* GH19- Controle hormonal com CAB, LRS e LRS+ CAB; ** GH42

Anexo I - IRS da FLNA, DRD2, SSTR2, SSTR5 e resultado de Ki-67

Amostra tumoral	filamina A	filamina A	filamina A	DRD2	DRD2	DRD2	SSTR2	SSTR2	SSTR2	SSTR5	SSTR5	SSTR5	Ki-67 %
	IRS	Extensão	Intensidade	IRS	Extensão	Intensidade	IRS	Extensão	Intensidade	IRS	Extensão	Intensidade	
PRL01	6	60%	2	6	60%	2	6	40%	3	2	40%	1	1
PRL02	0	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	2	20%	1	1
PRL03	4	30%	2	4	50%	2	0	0	0	2	20%	1	3
PRL04	2	50%	1	9	60%	3	6	50%	3	4	30%	2	ND
PRL05	1	10%	1	2	20%	1	0	0	0	0	0	0	3
PRL06	0	0	0	9	60%	3	4	40%	2	2	20%	1	5
PRL07	0	0	0	6	80%	2	0	0	0	0	0	0	0
PRL08	0	0	0	1	10%	1	0	0	0	0	0	0	1
PRL09	0	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	0
PRL10	0	0	0	6	60%	2	9	90%	3	0	0	0	1
PRL11	0	0	0	2	20%	1	0	0	0	0	0	0	3
GH01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GH02	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GH03	0	0	0	2	30%	1	9	80%	3	2	50%	1	1
GH04	0	0	0	2	30%	1	6	80%	2	0	0	0	1
GH05	3	70%	1	6	60%	2	9	100%	3	6	80%	2	1
GH06	0	0	0	9	90%	3	0	0	0	0	0	0	1
GH07	0	0	0	9	70%	3	9	80%	3	2	30%	1	1
GH08	0	0	0	4	30%	2	0	0	0	1	10%	1	5
GH09	0	0	0	2	40%	1	9	80%	3	0	0	0	0
GH10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1
GH11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GH12	2	10%	2	9	80%	3	9	90%	3	6	60%	2	0
GH13	0	0	0	4	50%	2	0	0	0	0	0	0	0
GH14	2	20%	1	4	20%	2	4	30%	2	1	10%	1	1
GH15	0	0	0	0	0	0	9	90%	3	0	0	0	0
GH16	0	0	0	3	60%	1	9	90%	3	6	80%	2	1
GH17	2	20%	1	4	50%	2	2	10%	2	6	90%	2	1
GH18	3	10%	3	4	50%	2	9	70%	3	ND	ND	ND	10
GH19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GH20	1	10%	1	4	40%	2	9	80%	3	6	90%	2	1
GH21	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND	9	90%	3	1

Continua...

Continuação Anexo I

Amostra tumoral	filamina A	filamina A	filamina A	DRD2	DRD2	DRD2	SSTR2	SSTR2	SSTR2	SSTR5	SSTR5	SSTR5	Ki-67 %
	IRS	Extensão	Intensidade	IRS	Extensão	Intensidade	IRS	Extensão	Intensidade	IRS	Extensão	Intensidade	
GH22	0	0	0	0	0	0	9	100%	3	6	80%	2	1
GH23	0	0	0	2	10%	2	9	80%	3	0	0	0	1
GH24	2	10%	2	2	10%	2	4	30%	2	ND	ND	ND	0
GH25	0	0	0	6	80%	2	9	90%	3	1	10%	1	1
GH26	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GH27	2	1%	2	6	60%	2	9	100%	3	3	80%	1	0
GH28	2	10%	2	9	80%	3	9	90%	3	6	80%	2	1
GH29	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GH30	6	50%	3	1	10%	1	6	40%	3	4	50%	2	1
GH31	2	10%	2	0	0%	0	6	50%	3	3	90%	1	1
GH32	2	10%	2	4	40%	2	9	90%	3	0	0	0	1
GH33	2	10%	2	4	50%	2	9	90%	3	0	0	0	3
GH34	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GH35	1	10%	1	9	80%	3	9	100%	3	2	10%	2	1
GH36	0	0	0	6	90%	2	6	80%	2	0	0	0	1
GH37	2	10%	2	6	60%	2	2	30%	1	ND	ND	ND	1
GH38	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GH39	2	10%	2	6	80%	2	9	80%	3	0	0	0	1
GH40	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	nd
GH41	2	1%	2	3	60%	1	9	100%	3	0	0	0	0
GH42	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GH43	0	0	0	1	10%	1	2	30%	1	0	0	0	1
GH44	0	0	0	6	80%	2	9	80%	3	1	10%	1	1
GH45	1	10%	1	6	60%	2	6	80%	2	0	0%	0%	1
GH46	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GH47	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GH48	1	10%	1	9	60%	3	2	20%	1	4	20%	2	1
ACTH01	0	0	0		PR	PR	9	80%	3	1	5	1	1
ACTH02a	0	0	0	4	30%	2	3	5%	3	0	0	0	0
ACTH02b	1	10%	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ACTH03	1	10%	1	6	70%	2	9	90%	3	0	0	0	1
ACTH04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACTH05	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0	1
ACTH06	3	60%	1	9	70%	3	4	20%	2	ND	ND	ND	0

Continua...

Continuação Anexo I

Amostra tumoral	filamina A	filamina A	filamina A	DRD2	DRD2	DRD2	SSTR2	SSTR2	SSTR2	SSTR5	SSTR5	SSTR5	Ki-67 %
	IRS	Extensão	Intensidade	IRS	Extensão	Intensidade	IRS	Extensão	Intensidade	IRS	Extensão	Intensidade	
ACTH07a	6	60%	2	4	50%	2	0	0	0	0	0	0	1
ACTH07b	9	60%	3	2	20%	1	0	0	0	0	0	0	1
ACTH08	0	0	0	2	10%	2	2	10%	2	0	0	0	3
ACTH09	0	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	0
ACTH10a	0	0	0	0	0	0	9	80%	3	0	0	0	1
ACTH10b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	1
ACTH11	3	80%	1	9	80%	3	9	100%	3	3	80%	1	3
ACTH12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4	30%	2	ND	ND	ND	3
ACTH13	0	0	0	4	50%	2	3	10%	3	0	0	0	1
ACTH14	2	10%	2	2	40%	1	6	50%	3	6	90%	2	1
ACTH15	2	50%	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1
ACTH16	1	10%	1	6	80%	2	9	70%	3	0	0	0	1
ACTH17	4	50%	2	2	20%	1	0	0	0	0	0	0	1
ACTH18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACTH19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1
ACTH20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACTH21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACTH22	0	0	0	9	80%	3	9	90%	3	6	90%	2	1
ACTH23	2	40%	1	4	20%	2	0	0	0	0	0	0	3
ACTH24	0	0	0	4	50%	2	6	50%	3	0	0	0	1
ACTH25	1	10%	1	9	90%	3	9	80%	3	2	40%	1	1
ACTH26	0	0	0	4	40%	2	9	70%	3	0	0	0	1
ACTH27	1	10%	1	2	20%	1	9	90%	3	0	0	0	0
ACTH28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACTH29	2	10%	2	6	70%	2	9	90%	3	ND	ND	ND	0
ACTH30	0	0	0	4	30%	2	9	90%	3	0	0	0	0
ACTH31	3	10%	3	4	30%	2	6	20%	3	0	0	0	5
ACTH32	9	100%	3	9	100%	3	0	0	0	0	0	0	8
ACNF01	1	10%	1	9	90%	3	0	0	0	0	0	0	1
ACNF02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACNF03a	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5
ACNF03b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
ACNF04	4	50%	2	6	90%	2	6	30%	3	0	0	0	1
ACNF05	3	80%	1	9	80%	3	1	10%	1	0	0	0	1

Continua...

Conclusão Anexo I

Amostra tumoral	filamina A	filamina A	filamina A	DRD2	DRD2	DRD2	SSTR2	SSTR2	SSTR2	SSTR5	SSTR5	SSTR5	Ki-67 %
	IRS	Extensão	Intensidade	IRS	Extensão	Intensidade	IRS	Extensão	Intensidade	IRS	Extensão	Intensidade	
ACNF06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACNF07	0	0	0	4	30%	2	0	0	0	0	0	0	0
ACNF08	6	70%	2	9	70%	3	4	30%	2	0	0	0	3
ACNF09	2	10%	2	9	90%	3	6	60%	2	0	0	0	1
ACNF10	1	10%	1	9	90%	3	6	20%	3	0	0	0	1
ACNF11	1	10%	1	9	80%	3	1	10%	1	0	0	0	0
ACNF12	0	0	0	9	90%	3	0	0	0	0	0	0	1
ACNF13a	0	0	0	6	70%	2	0	0	0	0	0	0	1
ACNF13b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACNF14	0	0	0	9	90%	3	6	20%	3	0	0	0	1
ACNF15	2	10%	2	9	80%	3	2	10%	2	0	0	0	1
ACNF16	4	30%	2	9	90%	3	0	0	0	0	0	0	0
ACNF17	0	0	0	9	90%	3	0	0	0	0	0	0	1
ACNF18	3	70%	1	9	90%	3	0	0	0	0	0	0	1
ACNF19	0	0	0	4	30%	2	0	0	0	0	0	0	0
ACNF20	0	0	0	2	20%	1	9	90%	3	6	70%	2	1
ACNF21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ACNF22	3	60%	1	9	70%	3	0	0	0	0	0	0	1
ACNF23	6	70%	2	9	90%	3	6	60%	2	0	0	0	1
ACNF24	0	0	0	4	40%	2	9	60%	3	0	0	0	1
ACNF25	2	30%	1	4	20%	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2

Anexo J - Correlação entre a expressão da filamina A e características de invasividade e agressividade tumorais

Tabela 1 – Correlação entre FLNA e invasão parasselar, por subtipo tumoral

Variável	Medidas	Invasão parasselar		P-valor
		NAO	SIM	
TIPO TUMOR	PRL			
IRS FLNA	N	7	4	0,511
	Mediana (variação)	0 (0-4)	0,5 (0-6)	
	Média (DP)	0,8 (1,6)	1,7 (2,9)	
TIPO TUMOR	GH			
IRS FLNA	N	16	20	0,931
	Mediana (variação)	1 (0-3)	0,5 (0-6)	
	Média (DP)	1,0 (1,0)	1,2 (1,5)	
TIPO TUMOR	ACNF			
IRS FLNA	N	10	13	0,363
	Mediana (variação)	0 (0-6)	2 (0-6)	
	Média (DP)	1,4 (2,2)	1,8 (1,8)	

P-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney; NA- não avaliável estatisticamente; DP: desvio padrão; N: número de amostras tumorais

Tabela 2 - Correlação entre FLNA e invasão infrasselar, por subtipo tumoral

Variável	Medidas	Invasão infrasselar		P-valor
		NAO	SIM	
TIPO TUMOR	PRL			
IRS FLNA	N	9	2	0,413
	Mediana (variação)	0 (0-4)	3 (0-6)	
	Média (DP)	0,8 (1,4)	3,0 (4,2)	
TIPO TUMOR	GH			
IRS FLNA	N	25	11	0,897
	Mediana (variação)	1 (0-3)	0 (0-6)	
	Média (DP)	1,0 (1,0)	1,3 (1,8)	
TIPO TUMOR	ACNF			
IRS FLNA	N	14	9	0,895
	Mediana (variação)	1 (0-6)	1 (0-6)	
	Média (DP)	1,6 (1,9)	1,8 (2,2)	

P-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney; NA- não avaliável estatisticamente; DP: desvio padrão; N: número de amostras tumorais

Tabela 3 - Distribuição da FLNA de acordo com tamanho tumoral ao diagnóstico, por subtipo tumoral

Variável	Medidas	Número de amostras		P-valor
		Macro	Micro	
TIPO TUMOR	PRL			
IRS FLNA	N	10	1	NA
	Mediana (variação)	0 (0-6)	0 (0)	
	Média (DP)	1,3 (2,1)	-	
TIPO TUMOR	GH			
IRS FLNA	N	32	4	0,135
	Mediana (variação)	1 (0 – 6)	0 (0 – 1)	
	Média (DP)	1,2 (1,4)	0,25 (0,5)	
TIPO TUMOR	ACTH			
IRS FLNA	N	16	11	0,504
	Mediana (variação)	1 (0-9)	1 (0-4)	
	Média (DP)	2,3 (3,1)	1,2 (1,4)	
TIPO TUMOR	ACNF			
IRS FLNA	N	23	0	NA
	Mediana (variação)	1 (0-6)	-	
	Média (DP)	1,6 (1,9)	-	

P-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney; NA- não avaliável estatisticamente; DP: desvio padrão; Macro: macroadenoma; Micro: microadenoma; N: número de amostras tumorais

Tabela 4 - Distribuição da FLNA de acordo com cirurgias realizadas, por subtipo tumoral

Variável	Medidas	Número de cirurgias		P-valor
		Somente 1	≥ 1	
TIPO TUMOR	PRL			
IRS FLNA	N	8	3	0,636
	Mediana (variação)	0 (0-6)	0 (0-1)	
	Média (DP)	1,5 (2,3)	0,3 (0,6)	
TIPO TUMOR	GH			
IRS FLNA	N	32	4	0,135
	Mediana (variação)	1 (0-6)	0 (0-1)	
	Média (DP)	1,2 (1,4)	0,25 (0,5)	
TIPO TUMOR	ACTH			
IRS FLNA	N	17	10	0,388
	Mediana (variação)	1 (0-4)	1,5 (0-9)	
	Média (DP)	1,2 (1,3)	3,0 (3,7)	
TIPO TUMOR	ACNF			
IRS FLNA	N	16	7	0,064
	Mediana (variação)	2 (0-6)	0 (0-3)	
	Média (DP)	2,1 (2,1)	0,6 (1,1)	

P-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney; DP: desvio padrão; N: número de amostras tumorais

Tabela 5 - Distribuição da FLNA de acordo com radioterapia, por subtipo tumoral

Variável	Medidas	Radioterapia		P-valor
		NÃO	SIM	
TIPO TUMOR	PRL			
IRS FLNA	N	8	3	0,636
	Mediana (variação)	0 (0-6)	0 (0-1)	
	Média (DP)	1,5 (2,3)	3,3 (0,6)	
TIPO TUMOR	GH			
IRS FLNA	N	35	1	NA
	Mediana (variação)	1 (0-6)	1 (1)	
	Média (DP)	1,1 (1,3)	-	
TIPO TUMOR	ACTH			
IRS FLNA	N	22	5	0,626
	Mediana (variação)	1 (0-9)	1 (0-9)	
	Média (DP)	1,5 (2,1)	3,2 (4,1)	
TIPO TUMOR	ACNF			
IRS FLNA	N	22	1	NA
	Mediana (variação)	1 (0-6)	3 (3)	
	Média (DP)	1,6 (2,0)	-	

P-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney; NA- não avaliável estatisticamente; DP: desvio padrão; N: número de amostras tumorais

Anexo K - Expressão gênica (RQ) de *FLNA*, *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* nas amostras tumorais de somatotropinomas e de ACNF

Identificação paciente	<i>FLNA</i>	<i>DRD2</i>	<i>SSTR2</i>	<i>SSTR5</i>
GH02	3,0	2,3	5,4	0,0
GH03	0,5	1,0	4,1	4,3
GH08	-0,6	1,7	0,8	2,5
GH12	2,4	1,3	3,9	7,0
GH18	-1,3	1,6	0,8	3,0
GH20	-0,3	0,7	2,9	5,2
GH24	0,1	3,1	0,5	4,7
GH26	4,9	-0,3	1,6	0,0
GH28	-0,6	0,0	5,1	5,0
GH29	0,8	2,4	3,9	2,2
GH30	3,4	-0,1	1,4	4,8
GH31	0,6	1,2	1,3	4,4
GH32	1,6	2,9	2,7	2,6
GH33	1,8	1,7	4,1	2,4
GH34	0,7	3,0	3,7	3,9
GH35	1,7	1,4	1,8	0,3
GH36	2,2	1,9	2,9	0,6
GH37	2,8	1,7	1,3	6,6
GH38	4,1	1,0	2,0	2,5
GH39	1,1	6,1	2,5	-0,2
GH40	1,3	2,9	5,7	4,5
GH41	-0,5	0,8	4,8	3,8
GH42	-0,2	1,6	2,5	5,4
GH43	-1,7	-2,8	1,9	2,9
GH44	-0,3	3,1	1,6	4,1
GH45	2,1	1,4	1,6	6,3
GH47	0,4	0,3	5,1	0,1
GH48	2,8	3,0	3,7	7,0
ACNF01	3,6	2,5	-0,8	0,0
ACNF05	1,9	3,1	-1,4	0,0
ACNF07	0,6	3,1	-2,6	0,0
ACNF08	-0,4	1,7	0,6	0,0
ACNF10	1,3	3,1	-1,9	0,0
ACNF11	1,4	2,9	-2,6	0,0
ACNF12	1,7	1,9	-0,6	0,0
ACNF14	0,4	1,4	-1,3	0,0
ACNF15	3,3	-1,3	0,3	0,0
ACNF17	2,2	0,0	-2,9	0,0
ACNF18	1,4	2,3	-2,5	0,0
ACNF20	1,4	1,9	2,4	3,4
ACNF23	1,8	3,7	3,8	0,0

9. REFERÊNCIAS

1. Peverelli E, Treppiedi D, Giardino E, Vitali E, Lania AG, Mantovani G. Dopamine and Somatostatin Analogues Resistance of Pituitary Tumors: Focus on Cytoskeleton Involvement. *Frontiers in Endocrinology*. 2015;6.
2. van der Flier A, Sonnenberg A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 2001;1538(2-3):99-117.
3. Hartwig JH, Stossel TP. Isolation and properties of actin, myosin, and a new actin-binding protein in rabbit alveolar macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 1975;250(14):5696-705.
4. Nakamura F, Stossel TP, Hartwig JH. The filamins Organizers of cell structure and function. *Cell Adhesion & Migration*. 2011;5(2):160-9.
5. Janmey PA, Hvidt S, Kas J, Lerche D, Maggs A, Sackmann E, et al. The mechanical-properties of actin gels - elastic-modulus and filament motions. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(51):32503-13.
6. Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, et al. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(2):138-45.
7. Peverelli E, Giardino E, Vitali E, Treppiedi D, Lania AG, Mantovani G. Filamin A in Somatostatin and Dopamine Receptor Regulation in Pituitary and the Role of cAMP/PKA Dependent Phosphorylation. *Hormone and Metabolic Research*. 2014;46(12):845-53.
8. Seo MD, Seok SH, Im H, Kwon AR, Lee SJ, Kim HR, et al. Crystal structure of the dimerization domain of human filamin A. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*. 2009;75(1):258-63.
9. Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng YY, Graham DA, et al. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron*. 1998;21(6):1315-25.
10. Liu JS. Molecular Genetics of Neuronal Migration Disorders. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2011;11(2):171-8.
11. Kyndt F, Gueffet JP, Probst V, Jaafar P, Legendre A, Le Bouffant F, et al. Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation*. 2007;115(1):40-9.

12. Savoy RM, Ghosh PM. The dual role of filamin A in cancer: can't live with (too much of) it, can't live without it. *Endocrine-Related Cancer*. 2013;20(6):R341-R56.
13. Shao QQ, Zhang TP, Zhao WJ, Liu ZW, You L, Zhou L, et al. Filamin A: Insights into its Exact Role in Cancers. *Pathology & Oncology Research*. 2016;22(2):245-52.
14. Lin RW, Karpa K, Kabbani N, Goldman-Rakic P, Levenson R. Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(9):5258-63.
15. Peverelli E, Mantovani G, Vitali E, Elli FM, Olgiate L, Ferrero S, et al. Filamin-A Is Essential for Dopamine D2 Receptor Expression and Signaling in Tumorous Lactotrophs. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;97(3):967-77.
16. Peverelli E, Giardino E, Treppiedi D, Vitali E, Cambiaghi V, Locatelli M, et al. Filamin A (FLNA) Plays an Essential Role in Somatostatin Receptor 2 (SST2) Signaling and Stabilization After Agonist Stimulation in Human and Rat Somatotroph Tumor Cells. *Endocrinology*. 2014;155(8):2932-41.
17. Kaltsas GA, Nomikos P, Kontogeorgos G, Buchfelder M, Grossman AB. Clinical review: Diagnosis and management of pituitary carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90(5):3089-99.
18. Jagannathan J, Kanter AS, Sheehan JP, Jane JA, Laws ER. Benign brain tumors: Sellar/parasellar tumors. *Neurologic Clinics*. 2007;25(4):1231-+.
19. Levy A. Molecular and trophic mechanisms of tumorigenesis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2008;37(1):23-+.
20. Chatzellis E, Alexandraki KI, Androulakis LI, Kaltsas G. Aggressive Pituitary Tumors. *Neuroendocrinology*. 2015;101(2):87-104.
21. Thapar K, Kovacs K, Scheithauer BW, Stefaneanu L, Horvath E, Pernicone PJ, et al. Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: An analysis using the MIB-1 antibody. *Neurosurgery*. 1996;38(1):99-106.
22. Knosp E, Steiner E, Kitz K, Matula C. Pituitary-adenomas with invasion of the cavernous sinus space - a magnetic-resonance-imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery*. 1993;33(4):610-8.
23. Heaney A. Management of aggressive pituitary adenomas and pituitary carcinomas. *Journal of Neuro-Oncology*. 2014;117(3):459-68.

24. Meij BP, Lopes MBS, Ellegala DB, Alden TD, Laws ER. The long-term significance of microscopic dural invasion in 354 patients with pituitary adenomas treated with transsphenoidal surgery. *Journal of Neurosurgery*. 2002;96(2):195-208.
25. Trouillas J, Roy P, Sturm N, Dantony E, Cortet-Rudelli C, Viennet G, et al. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathologica*. 2013;126(1):123-35.
26. Lopes MBS. The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary. *Acta Neuropathologica*. 2017;134(4):521-35.
27. Colao A, Lombardi G. Growth-hormone and prolactin excess. *Lancet*. 1998;352(9138):1455-61.
28. Colao A, Di Sarno A, Cappabianca P, Briganti F, Pivonello R, Di Somma C, et al. Gender differences in the prevalence, clinical features and response to cabergoline in hyperprolactinemia. *European Journal of Endocrinology*. 2003;148(3):325-31.
29. Mancini T, Casanueva FF, Giustina A. Hyperprolactinemia and prolactinomas. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2008;37(1):67-+.
30. Colao A. The prolactinoma. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;23(5):575-96.
31. Webster J, Piscitelli G, Polli A, Ferrari CI, Ismail I, Scanlon MF. A comparison of cabergoline and bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. *New England Journal of Medicine*. 1994;331(14):904-9.
32. Colao A, Pivonello R, Di Somma C, Savastano S, Grasso LFS, Lombardi G. Medical therapy of pituitary adenomas: Effects on tumor shrinkage. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 2009;10(2):111-23.
33. Colao A, Di Sarno A, Landi ML, Scavuzzo F, Cappabianca P, Pivonello R, et al. Macroprolactinoma shrinkage during cabergoline treatment is greater in naive patients than in patients pretreated with other dopamine agonists: A prospective study in 110 patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(6):2247-52.
34. Molitch ME. Disorders of prolactin secretion. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2001;30(3):585-+.

35. Webster JA. A comparative review of the tolerability profiles of dopamine agonists in the treatment of hyperprolactinaemia and inhibition of lactation (vol 14, pg 228, 1996). *Drug Safety*. 1996;14(5):342-.
36. Di Sarno A, Landi ML, Cappabianca P, Di Salle F, Rossi FW, Pivonello R, et al. Resistance to cabergoline as compared with bromocriptine in hyperprolactinemia: Prevalence, clinical definition, and therapeutic strategy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(11):5256-61.
37. Brue T, Pellegrini I, Gunz G, Morange I, Dewailly D, Brownell J, et al. Effects of the dopamine agonist CV 205-502 in human prolactinomas resistant to bromocriptine. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1992;74(3):577-84.
38. Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A. Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocrine Reviews*. 2006;27(5):485-534.
39. Molitch ME. Management of medically refractory prolactinoma. *Journal of Neuro-Oncology*. 2014;117(3):421-8.
40. <https://www.drugs.com/pro/cabergoline.html>. cabergoline prescribing information [
41. Delgrange E, Daems T, Verhelst J, Abs R, Maiter D. Characterization of resistance to the prolactin-lowering effects of cabergoline in macroprolactinomas: a study in 122 patients. *European Journal of Endocrinology*. 2009;160(5):747-52.
42. Ono M, Miki N, Kawamata T, Makino R, Amano K, Seki T, et al. Prospective Study of High-Dose Cabergoline Treatment of Prolactinomas in 150 Patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(12):4721-7.
43. Vroonen L, Jaffrain-Rea ML, Petrossians P, Tamagno G, Chanson P, Vilar L, et al. Prolactinomas resistant to standard doses of cabergoline: a multicenter study of 92 patients (vol 167, pg 651, 2012). *European Journal of Endocrinology*. 2012;167(6):887-.
44. Missale C, Boroni F, Losa M, Giovanelli M, Zanellato A, Daltoso R, et al. Nerve growth-factor suppresses the transforming phenotype of human prolactinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(17):7961-5.
45. Pellegrini I, Rasolonjanahary R, Gunz G, Bertrand P, Delivet S, Jedynak CP, et al. Resistance to bromocriptine in prolactinomas. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1989;69(3):500-9.

46. Caccavelli L, Feron F, Morange I, Rouer E, Benarous R, Dewailly D, et al. Decreased expression of the 2 d-2 dopamine-receptor isoforms in bromocriptine-resistant prolactinomas. *Neuroendocrinology*. 1994;60(3):314-22.
47. Passos VQ, Fortes M, Giannella-Neto D, Bronstein MD. Genes Differentially Expressed in Prolactinomas Responsive and Resistant to Dopamine Agonists. *Neuroendocrinology*. 2009;89(2):163-70.
48. Grandy DK, Marchionni MA, Makam H, Stofko RE, Alfano M, Frothingham L, et al. Cloning of the cdna and gene for a human d2-dopamine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(24):9762-6.
49. Oh MC, Aghi MK. Dopamine agonist-resistant prolactinomas. *Journal of Neurosurgery*. 2011;114(5):1369-79.
50. Dal Toso, R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, et al. The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *The EMBO Journal*. 1989; (8):4025-34 .
51. Ferone D, Gatto F, Arvigo M, Resmini E, Boschetti M, Teti C, et al. The clinical-molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2009;42(5-6):361-70.
52. Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *British Journal of Pharmacology*. 2015;172(1):1-23.
53. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine Reviews*. 2001;22(6):724-63.
54. Kovacs K, Stefaneanu L, Horvath E, Buchfelder M, Fahlbusch R, Becker W. Prolactin-producing pituitary-tumor - resistance to dopamine agonist therapy. *Journal of Neurosurgery*. 1995;82(5):886-90.
55. Petrossians P, De Herder W, Kwekkeboom D, Lamberigts G, Stevenaert A, Beckers A. Clinical case seminar - Malignant prolactinoma discovered by D2 receptor imaging. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(1):398-401.
56. Caccavelli L, MorangeRamos I, Kordon C, Jaquet P, Enjalbert A. Alteration of G alpha subunits mRNA levels in bromocriptine resistant prolactinomas. *Journal of Neuroendocrinology*. 1996;8(10):737-46.

57. Wu ZB, Zheng WM, Su ZP, Chen Y, Wu JS, Cheng D, et al. Expression of D2RmRNA isoforms and ERmRNA isoforms in prolactinomas: correlation with the response to bromocriptine and with tumor biological behavior. *Journal of Neuro-Oncology*. 2010;99(1):25-32.
58. Filopanti M, Barbieri AM, Angioni AR, Colao A, Gasco V, Grottole S, et al. Dopamine D-2 receptor gene polymorphisms and response to cabergoline therapy in patients with prolactin-secreting pituitary adenomas. *Pharmacogenomics Journal*. 2008;8(5):357-63.
59. Bueno CBF, Trarbach EB, Bronstein MD, Glezer A. Cabergoline and prolactinomas: lack of association between DRD2 polymorphisms and response to treatment. *Pituitary*. 2017;20(3):295-300.
60. Bronstein MD, Musolino NR, Benabou S, Marino R. Cerebrospinal-fluid rhinorrhea occurring in long-term bromocriptine treatment for macroprolactinomas. *Surgical Neurology*. 1989;32(5):346-9.
61. Olsen LJS, Irizarry LR, Chao ST, Weil RJ, Hamrahian AH, Hatipoglu B, et al. Radiotherapy for prolactin-secreting pituitary tumors. *Pituitary*. 2012;15(2):135-45.
62. Wilson PJ, Williams JR, Smee RI. Single-centre experience of stereotactic radiosurgery and fractionated stereotactic radiotherapy for prolactinomas with the linear accelerator. *Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology*. 2015;59(3):371-8.
63. Melmed S, Kleinberg D. Anterior Pituitary. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR Williams Textbook of Endocrinology. 11th ed Philadelphia: Saunders 2008. 155-261.
64. Alexander L, Appleton D, Hall R, Ross WM, Wilkinson R. Epidemiology of acromegaly in the newcastle region. *Clinical Endocrinology*. 1980;12(1):71-9.
65. Cordido F, Arnes JAG, Aspiroz MM, Vela ET, Spanish Soc Endocrinology N. Practical guidelines for diagnosis and treatment of acromegaly. *Endocrinologia Y Nutricion*. 2013;60(8).
66. Giustina A, Chanson P, Bronstein MD, Klibanski A, Lamberts S, Casanueva FF, et al. A Consensus on Criteria for Cure of Acromegaly. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;95(7):3141-8.
67. Giustina A, Chanson P, Kleinberg D, Bronstein MD, Clemmons DR, Klibanski A, et al. Expert Consensus Document A consensus on the medical treatment of acromegaly. *Nature Reviews Endocrinology*. 2014;10(4):243-8.

68. Newman CB. Medical therapy for acromegaly. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 1999;28(1):171-+.
69. Laws ER, Vance ML, Thapar K. Pituitary surgery for the management of acromegaly. *Hormone Research*. 2000;53:71-5.
70. Ahmed S, Elsheikh M, Stratton IM, Page RCL, Adams CBT, Wass JAH. Outcome of transphenoidal surgery for acromegaly and its relationship to surgical experience. *Clinical Endocrinology*. 1999;50(5):561-7.
71. Katznelson L, Laws ER, Melmed S, Molitch ME, Murad MH, Utz A, et al. Acromegaly: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(11):3933-51.
72. Sandret L, Maison P, Chanson P. Place of Cabergoline in Acromegaly: A Meta-Analysis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(5):1327-35.
73. Ferone D, de Herder WW, Pivonello R, Kros JM, van Koetsveld PM, de Jong T, et al. Correlation of in Vitro and in Vivo somatotrophic adenoma responsiveness to somatostatin analogs and dopamine agonists with immunohistochemical evaluation of somatostatin and dopamine receptors and electron microscopy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(4):1412-7.
74. Carmichael JD, Bonert VS, Nuno M, Ly D, Melmed S. Acromegaly Clinical Trial Methodology Impact on Reported Biochemical Efficacy Rates of Somatostatin Receptor Ligand Treatments: A Meta-Analysis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(5):1825-33.
75. Jallad RS, Musolino NRC, Salgado LR, Bronstein MD. Treatment of acromegaly with octreotide-LAR: extensive experience in a Brazilian institution. *Clinical Endocrinology*. 2005;63(2):168-75.
76. Jallad RS, Bronstein MD. Optimizing Medical Therapy of Acromegaly: Beneficial Effects of Cabergoline in Patients Uncontrolled with Long-Acting Release Octreotide. *Neuroendocrinology*. 2009;90(1):82-92.
77. Gola M, Bonadonna S, Mazziotti G, Amato G, Giustina A. Resistance to somatostatin analogs in acromegaly: An evolving concept? *Journal of Endocrinological Investigation*. 2006;29(1):86-93.
78. Paragliola RM, Corsello SM, Salvatori R. Somatostatin receptor ligands in acromegaly: clinical response and factors predicting resistance. *Pituitary*. 2017;20(1):109-15.

79. Engstrom BE, Burman P, Karlsson FA. Men with acromegaly need higher doses of octreotide than women. *Clinical Endocrinology*. 2002;56(1):73-7.
80. Suliman M, Jenkins R, Ross R, Powell T, Battersby R, Cullen DR. Long-term treatment of acromegaly with the somatostatin analogue SR-lanreotide. *Journal of Endocrinological Investigation*. 1999;22(6):409-18.
81. Melmed S. Medical progress: Acromegaly. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(24):2558-73.
82. Melmed S. Acromegaly pathogenesis and treatment. *Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(11):3189-202.
83. Heck A, Ringstad G, Fougner SL, Casar-Borota O, Nome T, Ramm-Petersen J, et al. Intensity of pituitary adenoma on T2-weighted magnetic resonance imaging predicts the response to octreotide treatment in newly diagnosed acromegaly. *Clinical Endocrinology*. 2012;77(1):72-8.
84. Taboada GF, Luque RM, Vieira L, Machado ED, Sbaffi BC, Domingues RC, et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtypes (1-5) gene expression levels in somatotropinomas and correlation to in vivo hormonal and tumor volume responses to treatment with octreotide LAR. *European Journal of Endocrinology*. 2008;158(3):295-303.
85. Wildemberg LEA, Neto LV, Costa DF, Nasciuti LE, Takiya CM, Alves LM, et al. Low somatostatin receptor subtype 2, but not dopamine receptor subtype 2 expression predicts the lack of biochemical response of somatotropinomas to treatment with somatostatin analogs. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2013;36(1):38-43.
86. Gatto F, Feelders RA, van der Pas R, Kros JM, Waaijers M, Sprij-Mooij D, et al. Immunoreactivity Score Using an Anti-sst2A Receptor Monoclonal Antibody Strongly Predicts the Biochemical Response to Adjuvant Treatment with Somatostatin Analogs in Acromegaly. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(1):E66-E71.
87. Fougner SL, Casar-Borota O, Heck A, Berg JP, Bollerslev J. Adenoma granulation pattern correlates with clinical variables and effect of somatostatin analogue treatment in a large series of patients with acromegaly. *Clinical Endocrinology*. 2012;76(1):96-102.
88. Jaquet P, Saveanu A, Gunz G, Fina F, Zamora AJ, Grino M, et al. Human somatostatin receptor subtypes in acromegaly: Distinct patterns of messenger ribonucleic acid expression and hormone suppression identify different tumoral phenotypes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(2):781-92.

89. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *European Journal of Nuclear Medicine*. 2001;28(7):836-46.
90. <https://www.omim.org/entry/182452?search=sstr2&highlight=sstr2> OMIM [
91. Patel YC, Greenwood M, Kent G, Panetta R, Srikant CB. Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2 - Tissue selective distribution and camp regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1993;192(1):288-94.
92. Florio T. Molecular mechanisms of the antiproliferative activity of somatostatin receptors (SSTRs) in neuroendocrine tumors. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2008;13:822-40.
93. Takeda J, Fernald AA, Yamagata K, Lebeau MM, Bell GI. Localization of human somatostatin receptor-5 gene (SSTR5) to chromosome BAND-16P13.3 by fluorescence in-situ hybridization. *Genomics*. 1995;26(3):638-9.
94. Taboada GF, Luque RM, Bastos W, Guimares RFC, Marcondes JB, Chimelli LMC, et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology*. 2007;156(1):65-74.
95. Shimon I, Taylor JE, Dong JZ, Bitonte RA, Kim S, Morgan B, et al. Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures - Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;99(4):789-98.
96. Shimon I, Yan XM, Taylor JE, Weiss MH, Culler MD, Melmed S. Somatostatin receptor (SSTR) subtype-selective analogues differentially suppress in vitro growth hormone and prolactin in human pituitary adenomas - Novel potential therapy for functional pituitary tumors. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;100(9):2386-92.
97. Hofland LJ, van der Hoek J, van Koetsveld PM, de Herder WW, Waaijers M, Sprij-Mooij D, et al. The novel somatostatin analog SOM230 is a potent inhibitor of hormone release by growth hormone- and prolactin-secreting pituitary adenomas in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(4):1577-85.

98. Ferrante E, Pellegrini C, Bondioni S, Peverelli E, Locatelli M, Gelmini P, et al. Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2. *Endocrine-Related Cancer*. 2006;13(3):955-62.
99. Peverelli E, Lania AG, Mantovani G, Beck-Peccoz P, Spada A. Characterization of Intracellular Signaling Mediated by Human Somatostatin Receptor 5: Role of the DRY Motif and the Third Intracellular Loop. *Endocrinology*. 2009;150(7):3169-76.
100. Casar-Borota O, Heck A, Schulz S, Nesland JM, Bollerslev J. Expression of SSTR2a, but not of SSTRs 1, 3 or 5 in somatotroph adenomas assessed by monoclonal antibodies was reduced by octreotide and correlated with the acute and long-term effects of octreotide. *Brain Pathology*. 2014;24:90-.
101. Casarini APM, Jallad RS, Pinto EM, Soares IC, Nonogaki S, Giannella-Neto D, et al. Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. *Pituitary*. 2009;12(4):297-303.
102. Brzana J, Yedinak CG, Gultekin SH, Delashaw JB, Fleseriu M. Growth hormone granulation pattern and somatostatin receptor subtype 2A correlate with postoperative somatostatin receptor ligand response in acromegaly: a large single center experience. *Pituitary*. 2013;16(4):490-8.
103. Gonzalez B, Vargas G, Ramirez C, Asa S, Cheng S, Sandoval C, et al. Cytoplasmic expression of SSTR2 and 5 by immunohistochemistry and by RT/PCR is not associated with the pharmacological response to octreotide. *Endocrinologia Y Nutricion*. 2014;61(10):523-30.
104. Chinezu L, Vasiljevic A, Jouanneau E, Francois P, Borda A, Trouillas J, et al. Expression of somatostatin receptors, SSTR2A and SSTR5, in 108 endocrine pituitary tumors using immunohistochemical detection with new specific monoclonal antibodies. *Human Pathology*. 2014;45(1):71-7.
105. Wildemberg LEA, Neto LV, Costa DF, Nasciutti LE, Takiya CM, Alves LM, et al. Validation of immunohistochemistry for somatostatin receptor subtype 2A in human somatotropinomas: Comparison between quantitative real time RT-PCR and immunohistochemistry. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2012;35(6):580-4.
106. Hofland LJ, Lamberts SWJ. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocrine Reviews*. 2003;24(1):28-47.

107. Reubi JC, Schaer JC, Waser B, Mengod G. Expression and localization of somatostatin receptor SSTR1, SSTR2, and SSTR3 Messenger-RNAs in primary human tumors using in-situ hybridization. *Cancer Research*. 1994;54(13):3455-9.
108. Nielsen S, Møller S, Rasmussen LM, Ledet T, Olsen N, Bojsen-Møller M, et al. Expression of somatostatin receptors on human pituitary adenomas in vivo and ex vivo. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2001;24(6):430-7.
109. Gadelha MR, Kasuki L, Korbonits M. Novel pathway for somatostatin analogs in patients with acromegaly. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2013;24(5):238-46.
110. Gatto F, Biermasz NR, Feelders RA, Kros JM, Dogan F, van der Lely AJ, et al. Low beta-arrestin expression correlates with the responsiveness to long-term somatostatin analog treatment in acromegaly. *European Journal of Endocrinology*. 2016;174(5):651-62.
111. Treppiedi D, Peverelli E, Giardino E, Ferrante E, Calebiro D, Spada A, et al. Somatostatin Receptor Type 2 (SSTR2) Internalization and Intracellular Trafficking in Pituitary GH-Secreting Adenomas: Role of Scaffold Proteins and Implications for Pharmacological Resistance. *Hormone and Metabolic Research*. 2017;49(4):259-68.
112. Bronstein MD, Fleseriu M, Neggers S, Colao A, Sheppard M, Gu F, et al. Switching patients with acromegaly from octreotide to pasireotide improves biochemical control: crossover extension to a randomized, double-blind, Phase III study. *Bmc Endocrine Disorders*. 2016;16.
113. Van der Lely AJ, Hutson RK, Trainer PJ, Besser GM, Barkan AL, Katznelson L, et al. Long-term treatment of acromegaly with pegvisomant, a growth hormone receptor antagonist. *Lancet*. 2001;358(9295):1754-9.
114. Melmed S, Colao A, Barkan A, Molitch M, Grossman AB, Kleinberg D, et al. Guidelines for Acromegaly Management: An Update. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(5):1509-17.
115. Lindholm J, Juul S, Jorgensen JOL, Astrup J, Bjerre P, Feldt-Rasmussen U, et al. Incidence and late prognosis of Cushing's syndrome: A population-based study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(1):117-23.
116. Solak M, Kraljevic I, Dusek T, Melada A, Kavanagh MM, Peterkovic V, et al. Management of Cushing's disease: a single-center experience. *Endocrine*. 2016;51(3):517-23.

117. Pivonello R, De Martino MC, De Leo M, Lombardi G, Colao A. Cushing's syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2008;37(1):135-+.
118. Nieman LK. Cushing's syndrome: update on signs, symptoms and biochemical screening. *European Journal of Endocrinology*. 2015;173(4):M33-M8.
119. Lytras N, Grossman A, Perry L, Tomlin S, Wass JAH, Coy DH, et al. Corticotropin releasing-factor - responses in normal subjects and patients with disorders of the hypothalamus and pituitary. *Clinical Endocrinology*. 1984;20(1):71-84.
120. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: An endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(5):1526-40.
121. Biller BMK, Grossman AB, Stewart PM, Melmed S, Bertagna X, Bertherat J, et al. Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: A consensus statement. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(7):2454-62.
122. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Murad MH, Newell-Price J, Savage MO, et al. Treatment of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015;100(8):2807-31.
123. Miyoshi T, Otsuka F, Takeda M, Inagaki K, Suzuki J, Ogura T, et al. Effect of cabergoline treatment on Cushing's disease caused by aberrant adrenocorticotropin-secreting macroadenoma. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2004;27(11):1055-9.
124. Pivonello R, Ferone D, de Herder WW, Kros JM, De Caro MLD, Arvigo M, et al. Dopamine receptor expression and function in corticotroph pituitary tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(5):2452-62.
125. Pivonello R, De Martino MC, Cappabianca P, De Leo M, Faggiano A, Lombardi G, et al. The Medical Treatment of Cushing's Disease: Effectiveness of Chronic Treatment with the Dopamine Agonist Cabergoline in Patients Unsuccessfully Treated by Surgery. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(1):223-30.
126. Godbout A, Manavela M, Danilowicz K, Beauregard H, Bruno OD, Lacroix A. Cabergoline monotherapy in the long-term treatment of Cushing's disease. *European Journal of Endocrinology*. 2010;163(5):709-16.

-
127. Lila AR, Gopal RA, Acharya SV, George J, Sarathi V, Bandgar T, et al. Efficacy of cabergoline in uncured (persistent or recurrent) cushing disease after pituitary surgical treatment with or without radiotherapy. *Endocrine Practice*. 2010;16(6):968-76.
 128. Vilar L, Naves LA, Azevedo MF, Arruda MJ, Arahata CM, Silva LME, et al. Effectiveness of cabergoline in monotherapy and combined with ketoconazole in the management of Cushing's disease. *Pituitary*. 2010;13(2):123-9.
 129. Guven A, Baltacioglu F, Dursun F, Cebeci AN, Kirmizibekmez H. Remission with Cabergoline in Adolescent Boys with Cushing's Disease. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 2013;5(3):194-8.
 130. Ferriere A, Cortet C, Chanson P, Delemer B, Caron P, Chabre O, et al. Cabergoline for Cushing's disease: a large retrospective multicenter study. *European Journal of Endocrinology*. 2017;176(3):305-14.
 131. Hofland LJ, van der Hoek J, Feelders R, van Aken MO, van Koetsveld PM, Waaijers M, et al. The multi-ligand somatostatin analogue SOM230 inhibits ACTH secretion by cultured human corticotroph adenomas via somatostatin receptor type 5. *European Journal of Endocrinology*. 2005;152(4):645-54.
 132. Batista DL, Zhang X, Gejman R, Ansell PJ, Zhou YL, Johnson SA, et al. The effects of SOM230 on cell proliferation and adrenocorticotropin secretion in human corticotroph pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(11):4482-8.
 133. Hassaneen W, Cahill DP, Fuller GN, Levine NB. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtype 5 (SSTR-5) in cushing adenoma. *Journal of Neuro-Oncology*. 2010;98(1):151-2.
 134. Stalla GK, Brockmeier SJ, Renner U, Newton C, Buchfelder M, Stalla J, et al. Octreotide exerts different effects in-vivo and in-vitro in cushings-disease. *European Journal of Endocrinology*. 1994;130(2):125-31.
 135. Fleseriu M. Medical Treatment of Cushing Disease New Targets, New Hope. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2015;44(1):51-+.
 136. Colao A, Petersenn S, Newell-Price J, Findling JW, Gu F, Maldonado M, et al. A 12-Month Phase 3 Study of Pasireotide in Cushing's Disease. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(10):914-24.
 137. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm332351.htm>. pasireotide [

138. Castinetti F, Nagai M, Morange I, Dufour H, Caron P, Chanson P, et al. Long-Term Results of Stereotactic Radiosurgery in Secretory Pituitary Adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(9):3400-7.
139. Estrada J, Boronat M, Mielgo M, Magallon R, Millan I, Diez S, et al. The long-term outcome of pituitary irradiation after unsuccessful transsphenoidal surgery in Cushing's disease. *New England Journal of Medicine*. 1997;336(3):172-7.
140. Starke RM, Williams BJ, Vance ML, Sheehan JP. Radiation therapy and stereotactic radiosurgery for the treatment of Cushing's disease: an evidence-based review. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity*. 2010;17(4):356-64.
141. Bertagna X, Guignat L. Approach to the Cushing's Disease Patient With Persistent/Recurrent Hypercortisolism After Pituitary Surgery (vol 98, pg 1307, 2013). *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(7):3091-.
142. Mindermann T, Wilson CB. Age-related and gender-related occurrence of pituitary-adenomas. *Clinical Endocrinology*. 1994;41(3):359-64.
143. Oruckaptan HH, Senmevsim O, Ozcan OE, Ozgen T. Pituitary adenomas: Results of 684 surgically treated patients and review of the literature. *Surgical Neurology*. 2000;53(3):211-8.
144. Turner HE, Adams CBT, Wass JAH. Pituitary tumours in the elderly: a 20 year experience. *European Journal of Endocrinology*. 1999;140(5):383-9.
145. Ferrante E, Ferraroni M, Castrignano T, Menicatti L, Anagni M, Reimondo G, et al. Non-functioning pituitary adenoma database: a useful resource to improve the clinical management of pituitary tumors. *European Journal of Endocrinology*. 2006;155(6):823-9.
146. Young WF, Scheithauer BW, Kovacs KT, Horvath E, Davis DH, Randall RV. Gonadotroph adenoma of the pituitary gland: A clinicopathologic analysis of 100 cases. *Mayo Clinic Proceedings*. 1996;71(7):649-56.
147. Freda PU, Beckers AM, Katznelson L, Molitch ME, Montori VM, Post KD, et al. Pituitary Incidentaloma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(4):894-904.
148. Molitch ME. Nonfunctioning pituitary tumors and pituitary incidentalomas. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2008;37(1):151-+.

149. Nomikos P, Ladar C, Fahlbusch R, Buchfelder M. Impact of primary surgery on pituitary function in patients with non-functioning pituitary adenomas - a study on 721 patients. *Acta Neurochirurgica*. 2004;146(1):27-35.
150. Neto LV, Machado ED, Luque RM, Taboada GF, Marcondes JB, Chimelli LMC, et al. Expression Analysis of Dopamine Receptor Subtypes in Normal Human Pituitaries, Nonfunctioning Pituitary Adenomas and Somatotropinomas, and the Association between Dopamine and Somatostatin Receptors with Clinical Response to Octreotide-LAR in Acromegaly. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(6):1931-7.
151. Gabalec F, Beranek M, Netuka D, Masopust V, Nahlovsky J, Cesak T, et al. Dopamine 2 receptor expression in various pathological types of clinically non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*. 2012;15(2):222-6.
152. Su ZP, Wang CD, Wu JS, Jiang XL, Chen YX, Chen Y, et al. Expression of dopamine 2 receptor subtype mRNA in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurological Sciences*. 2012;33(2):275-9.
153. Pivonello R, Matrone C, Filippella M, Cavallo LM, Di Somma C, Cappabianca P, et al. Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunctioning pituitary tumors: Comparison with the effectiveness of cabergoline treatment. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(4):1674-83.
154. Florio T, Barbieri F, Spaziante R, Zona G, Hofland LJ, van Koetsveld PM, et al. Efficacy of a dopamine-somatostatin chimeric molecule, BIM-23A760, in the control of cell growth from primary cultures of human non-functioning pituitary adenomas: a multi-center study. *Endocrine-Related Cancer*. 2008;15(2):583-96.
155. Greenman Y, Cooper O, Yaish I, Robenshtok E, Sagiv N, Jonas-Kimchi T, et al. Treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists. *European Journal of Endocrinology*. 2016;175(1):63-72.
156. Lohmann T, Trantakis C, Biesold M, Prothmann S, Guenzel S, Schober R et al. Minor Tumour Shrinkage in Nonfunctioning Pituitary Adenomas by Long-Term Treatment with the Dopamine Agonist Cabergoline. *Pituitary*. 2001; (4):173–8.
157. Greenman Y, Tordjman K, Osher E, Veshchev I, Shenkerman G, Reider-Groswasser, Il, et al. Postoperative treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists decreases tumour remnant growth. *Clinical Endocrinology*. 2005;63(1):39-44.

158. Garcia EC, Naves LA, Silva AO, de Castro LF, Casulari LA, Azevedo MF. Short-term treatment with cabergoline can lead to tumor shrinkage in patients with nonfunctioning pituitary adenomas. *Pituitary*. 2013;16(2):189-94.
159. Neto LV, Wildemberg LE, Moraes AB, Colli LM, Kasuki L, Marques NV, et al. Dopamine receptor subtype 2 expression profile in nonfunctioning pituitary adenomas and in vivo response to cabergoline therapy. *Clinical Endocrinology*. 2015;82(5):739-46.
160. Debruin TWA, Kwekkeboom DJ, Vantverlaat JW, Reubi JC, Krenning EP, Lamberts SWJ, et al. Clinically nonfunctioning pituitary-adenoma and octreotide response to long-term high-dose treatment, and studies invitro. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1992;75(5):1310-7.
161. Katznelson L, Oppenheim DS, Coughlin JF, Kliman B, Schoenfeld DA, Klibanski A. Chronic somatostatin analog administration in patients with alpha-subunit-secreting pituitary-tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1992;75(5):1318-25.
162. Duet M, Mundler O, Ajzenberg C, Berolatti B, Chedin P, Duranteau L, et al. Somatostatin receptor imaging in nonfunctioning pituitary-adenomas - value of an uptake index. *European Journal of Nuclear Medicine*. 1994;21(7):647-50.
163. Plockinger U, Reichel M, Fett U, Saeger W, Quabbe HJ. Preoperative octreotide treatment of growth hormone-secreting and clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas - effect on tumor volume and lack of correlation with immunohistochemistry and somatostatin receptor scintigraphy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1994;79(5):1416-23.
164. Warnet A, Harris AG, Renard E, Martin D, JamesDeidier A, ChaumetRiffaud P. A prospective multicenter trial of octreotide in 24 patients with visual defects caused by nonfunctioning and gonadotropin-secreting pituitary adenomas. *Neurosurgery*. 1997;41(4):786-95.
165. Andersen M, Bjerre P, Schroder HD, Edal A, Hoilund-Carlsen PF, Pedersen PH, et al. In vivo secretory potential and the effect of combination therapy with octreotide and cabergoline in patients with clinically non-functioning pituitary adenomas. *Clinical Endocrinology*. 2001;54(1):23-30.
166. Panetta R, Patel YC. Expression of messenger-rna for all 5 human somatostatin receptors (HSSTR1-5) in pituitary-tumors. *Life Sciences*. 1994;56(5):333-42.

167. Padova H, Rubinfeld H, Hadani M, Cohen ZR, Nass D, Taylor JE, et al. Effects of selective somatostatin analogs and cortistatin on cell viability in cultured human non-functioning pituitary adenomas. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2008;286(1-2):214-8.
168. Fusco A, Giampietro A, Bianchi A, Cimino V, Lugli F, Piacentini S, et al. Treatment with octreotide LAR in clinically non-functioning pituitary adenoma: results from a case-control study. *Pituitary*. 2012;15(4):571-8.
169. Neto LV, Wildemberg LE, Colli LM, Kasuki L, Marques NV, Moraes AB, et al. ZAC1 and SSTR2 Are Downregulated in Non-Functioning Pituitary Adenomas but Not in somatotropinomas. *Plos One*. 2013;8(10).
170. Chanson P, Raverot G, Castinetti F, Cortet-Rudelli C, Galland F, Salenave S, et al. Management of clinically non-functioning pituitary adenoma. *Annales D Endocrinologie*. 2015;76(3):239-47.
171. Reddy R, Cudlip S, Byrne JV, Karavitaki N, Wass JAH. Can we ever stop imaging in surgically treated and radiotherapy-naive patients with non-functioning pituitary adenoma? *European Journal of Endocrinology*. 2011;165(5):739-44.
172. Tanaka Y, Hongo K, Tada T, Sakai K, Kakizawa Y, Kobayashi S. Growth pattern and rate in residual nonfunctioning pituitary adenomas: correlations among tumor volume doubling time, patient age, and MIB-1 index. *Journal of Neurosurgery*. 2003;98(2):359-65.
173. Casanueva FF, Molitch ME, Schlechte JA, Abs R, Bonert V, Bronstein MD, et al. Guidelines of the Pituitary Society for the diagnosis and management of prolactinomas. *Clinical Endocrinology*. 2006;65(2):265-73.
174. Lee M, Lupp A, Mendoza N, Martin N, Beschorner R, Honegger J, et al. SSTR3 is a putative target for the medical treatment of gonadotroph adenomas of the pituitary. *Endocrine-Related Cancer*. 2015;22(1):111-9.
175. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
176. Wang YW, Li JY, Tohti MT, Hu YB, Wang S, Li WC, et al. The expression profile of Dopamine D2 receptor, MGMT and VEGF in different histological subtypes of pituitary adenomas: a study of 197 cases and indications for the medical therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2014;33.
177. Cuevas-Ramos D, Fleseriu M. Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2014;52(3):R223-R40.

178. Yavropoulou MP, Maladaki A, Yovos JG. The role of Notch and Hedgehog signaling pathways in pituitary development and pathogenesis of pituitary adenomas. *Hormones-International Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2015;14(1):5-18.
179. Mezzomo LC, Pesce FG, Marcal JMB, Haag T, Ferreira NP, Lima J, et al. Decreased TAp63 and Delta Np63 mRNA Levels in Most Human Pituitary Adenomas Are Correlated with Notch3/Jagged1 Relative Expression. *Endocrine Pathology*. 2017;28(1):13-21.
180. Miao ZL, Miao YF, Lin YC, Lu XJ. Overexpression of the Notch3 receptor in non-functioning pituitary tumours. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2012;19(1):107-10.
181. Lu RC, Gao H, Wang HY, Cao L, Bai JW, Zhang YZ. Overexpression of the Notch3 receptor and its ligand Jagged1 in human clinically non-functioning pituitary adenomas. *Oncology Letters*. 2013;5(3):845-51.
182. Perrone S, Zubeldia-Brenner L, Gazza E, Demarchi G, Baccarini L, Baricalla A, et al. Notch system is differentially expressed and activated in pituitary adenomas of distinct histotype, tumor cell lines and normal pituitaries. *Oncotarget*. 2017;8(34):57072-88.
183. Wang YW, Yu SL, Huang D, Cui M, Hu HK, Zhang LH, et al. Cellular Prion Protein Mediates Pancreatic Cancer Cell Survival and Invasion through Association with and Enhanced Signaling of Notch1. *American Journal of Pathology*. 2016;186(11):2945-56.
184. Peverelli E, Giardino E, Treppiedi D, Locatelli M, Vaira V, Ferrero S, et al. Dopamine receptor type 2 (DRD2) inhibits migration and invasion of human tumorous pituitary cells through ROCK-mediated cofilin inactivation. *Cancer Letters*. 2016;381(2):279-86.
185. Liu CH, Gao H, Cao L, Gui SB, Liu Q, Li CZ, et al. The role of FSCN1 in migration and invasion of pituitary adenomas. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2016;419(C):217-24.
186. Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J. *Manual de Imuno-histoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia. 1999.