Ingrid Quevedo Wanichi

**Características dos Pacientes com Doença de Cushing Devido
ao Micro e ao Macrocorticotropinomas Associados ou Não à
Mutação do *USP8*: Revisão Retrospectiva da Literatura.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Wanichi, Ingrid Quevedo

Características dos pacientes com doença de
Cushing devido à micro e macrocorticotropinomas
associados ou não à mutação do USP8 : revisão
retrospectiva da literatura / Ingrid Quevedo
Wanichi. -- São Paulo, 2019.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Candida Barisson Villares
Fragoso.

Descritores: 1.Hipersecreção hipofisária de ACTH
2.Hormônio adrenocorticotrópico 3.Microadenoma
4.Macroadenoma 5.Mutação com ganho de função
6.Hipercortisolismo 7.Síndrome de Cushing 8.Gene
USP8

USP/FM/DBD-150/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 e no Laboratório de Genética LIM/25 da Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Dedicatória

À minha mãe:

Susi Maria Cortes Quevedo, por ser meu pilar, por sempre me incentivar e estar ao meu lado, por mostrar que sempre podemos fazer mais e sermos a melhor versão de nós mesmos e pelo seu amor incondicional de mãe. Obrigada!

À minha grande amiga:

Beatriz Marinho de Paula Mariani, por todas as conversas, ensinamentos, paciência, confidências, por cuidar de mim, por estar ao meu lado incansavelmente em todos os momentos difíceis e por seu sorriso que me acalmava frente às minhas angústias, meu eterno: MUITO OBRIGADA!!!!

À minha orientadora Profª. Dra. Maria Candida por acreditar em mim.

Aos meus avós:

Admar Quevedo e Maria Cortes Quevedo, por seu amor, carinho e orgulho no olhar.

Aos meus familiares por sempre estarem presentes em minha vida e pelo seu amor.

Agradecimentos

Agradecimentos

Apresento agora meus agradecimentos aos que de alguma forma contribuíram para a feitura desta dissertação:

Profa. Dra. Berenice Bilharinho Mendonça

Profa. Dra. Ana Claudia Latronico

Dra. Margaret de Castro

Ericka B. Trarbach

Mariana F. A. Funari

Mirian Y. Nishi

Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP

Vinicius Fernando Calsavara

Luciani Carvalho

Rafael Loch

Francinilda da S. P. Oliveira

Ana Maria de Miranda

Rosangele de P. Zamboni Santos

Cristina Rossi

À todos do LIM 42

Sumário

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Resumo

Summary

1.0 INTRODUÇÃO	01
1.1 Doença de Cushing	01
1.2 Corticotropinomas	03
1.3 Patogênese molecular da doença de Cushing	04
1.4 Protease 8 específica das ubiquitinas (<i>USP8</i>)	06
1.4.1 Sistema ubiquitina proteassoma	07
1.4.2 Ubiquitinação e Desubiquitinação	08
1.4.3 Receptor do Fator de Crescimento da Epidermico (EGFR)	17
1.5. Revisão da literatura	17
2.0 OBJETIVOS	25
3.0 MÉTODOS	26
3.1 Casuística	26
3.2 Extração de DNA de tecido fresco conservado em nitrogênio líquido	26
3.3 Extração de DNA de tecido conservado em embocado de parafina	27
3.4 PCR para amplificação da região de interesse do gene <i>USP8</i>	27
3.5 Sequenciamento do produto de PCR pelo método de Sanger	29
3.6 Análise da expressão proteica USP8	30
3.7 Análise estatística	31

4.0 RESULTADOS	32
4.1 Banco de dados da coorte de pacientes do HC-FMUSP.....	32
4.2 Banco de dados da coorte de pacientes de oito series da literatura.....	32
4.3 Mutações somáticas do <i>USP8</i> nos corticotropinas.....	33
4.3.1 Mutações do <i>USP8</i> na coorte de pacientes HC-FMUSP.....	33
4.3.2 Mutações do <i>USP8</i> na coorte de pacientes de oito series da literatura...	34
4.4 Expressão proteica da USP8 - imunoistoquinica.....	35
4.5 Análise estatística das correlações entre as nove series	35
5.0 DISCUSSÃO	38
6.0 CONCLUSÃO	41
7.0 ANEXOS	42
8.0 REFERÊNCIAS	47

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

DC – Doença de Cushing

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

MIC– Microadenomas

MAC – Macroadenomas

POMC – Pró-opiomelanocortina

RM – Ressonancia magnética

USP8 – gene Ubiquitin Specific Protease 8

UBPY / *USP8* – proteína Ubiquitin Specific Protease 8

DNA – Ácido desoxirribonucleico

KRAS - Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

RET – Rearranged during transfection

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico

UPS – Ubiquitina Proteassoma Sistema

UB – Ubiquitinacao

DUB – Desubiquitinacao

H/E – Hematoxilina e eosina

PCR – Polimerase chain reaction

DST – *Dexamethasone suppressed test*

WT – *Wild Type*

RNA - Ribonucleic acid

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

CAPES- Coordenação De Aperfeiçoamento De Pessoal De Nível Superior

p.Ser718Pro – mutação de ponto no codon 718 que leva a troca de serina por prolina

p.C718Cys - mutação de ponto no codon 718 que leva a troca de serina por cisteína

p.Pro720Arg - mutação de ponto no codon 720 que leva a troca de prolina por arginina

p.Pro720Gln - mutação de ponto no codon 720 que leva a troca de prolina por glicina

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação de Hardy ¹⁴ para adenomas hipofisários e de Knosp ²³ para invasões paraselares. **a.** Classificação de Hardy. Grau 0: normal; Grau I: microadenoma (< 10 mm) restrito à sela túrcica; Grau II: macroadenoma ($\geq$ 10 mm) restrito à sela túrcica; Grau III: perfuração localizada no soalho selar; Grau IV: destruição difusa do soalho selar. **b.** Classificação de Knosp. Grau 0: nenhum envolvimento do seio cavernoso; Graus I e II se insinuam contra a parede medial do seio cavernoso, mas não excedem uma linha hipotética entre os centros dos dois segmentos da artéria carótida interna (Grau I) ou que vai além desta linha, mas sem ultrapassar uma linha tangente nas margens laterais da artéria (Grau II); Grau III: o tumor estende-se lateralmente para a carótida interna dentro do seio cavernoso; Grau IV: envolvimento total da artéria carótida intracavernosa. Adaptado de Di Leva, 2014 ¹⁴pg. 04

Figura 2 a. Localização do *USP8* no braço longo do cromossomo 15, região 21 e sub-região 2 **b.** Os aminoácidos afetados pelas mutações no USP8 são altamente conservados entre as diferentes espécies.....pg. 06

Figura 3 – Sinalização da proteína alvo pela ubiquitinação e degradação da proteína alvo pelo proteassoma.....pg. 08

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Frequência dos principais sinais e sintomas do hipercortisolism.....pg. 02

Tabela 2 – *Primers* desenhados para realização da PCR dos DNAs de tecidos frescos armazenados em nitrogênio líquido.....pg. 20

Tabela 3 – *Primers* desenhados para realização da PCR dos DNAs de tecidos frescos armazenados em emblocados de parafina.....pg. 20

Tabela 4 – Diferença entre o cortisol urinário de 24h e o tamanho de corticotropinoma.....pg. 24

Tabela 5 – Relação entre a presença da mutação USP8 a as concentrações de cortisol urinário de 24 h.....p. 25

Lista de anexos

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Anexo 2 – Características clínicas dos 49 pacientes brasileiros

Anexo 3 – Localização da proteína USP8

Anexo 4 – Manuscrito submetido

Resumo

Wanichi IQ. *Características dos pacientes com doença de Cushing devido à micro e macrocorticotropinomas associados ou não à mutação do USP8: revisão retrospectiva da literatura*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Resumo:

Objetivo: A doença de Cushing (DC) é uma condição clínica grave geralmente causada por um microcorticotropinoma (MIC) e 7-20% desses pacientes apresentam um macrocorticotropinoma produtor de ACTH (MAC). Recentemente, mutações somáticas no gene *USP8* foram identificadas como uma importante causa genética de DC devido a adenomas hipofisários secretores de ACTH (23% - 62%). Poucas séries relataram a distribuição entre MIC e MAC relacionada à mutação *USP8* e à correlação genótipo-fenótipo. Nosso objetivo foi avaliar as mutações *USP8* em uma coorte de MIC-MAC a partir do único centro terciário. **Métodos:** DNA-tumor-tecido foi sequenciado (16 MICs e 33 MACs). Dados clínicos, bioquímicos, de imagem e remissão / recorrência foram avaliados. Analisamos sistematicamente 8 séries publicadas. **Resultados:** Foram identificadas quatro variantes alélicas patogênicas da *USP8* previamente descritas em 13 dos 49 corticotrofinomas (26,5%). Oito foram (61,5%) detectados em MACs. As concentrações do cortisol urinário de pacientes com mutação *USP8* foram menores do que os do grupo selvagem ($p \leq 0,012$). A frequência de mutações *USP8* entre as séries foi de cerca de 30%, com maior prevalência em pacientes do sexo feminino ($p < 0,0001$). Nenhum consenso significativo foi identificado entre tipo selvagem e mutação da *USP8* em relação aos níveis hormonais; tamanho do tumor e remissão / recorrência entre todas as séries. **Conclusão:** Nossos dados, bem como a revisão retrospectiva sobre DC associada ou não a mutação em *USP8*, nos mostram um achado heterogêneo entre as séries publicadas, com várias desvantagens devido à falta de um protocolo sistemático para avaliar esses pacientes. Em conclusão, mais estudos prospectivos multicêntricos em uma força-tarefa trarão informações consistentes sobre a influência da principal causa genética da doença de Cushing, o gene *USP8*, em relação à apresentação clínico-radiológica e às taxas de remissão / recorrência.

Summary

Wanichi IQ. Characteristics of patients with Cushing's disease due to micro and macrocorticotropinomas associated or not with *USP8*-mutation: a retrospective review of the literature. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Summary

Objective: Cushing's disease (CD) is a severe clinical condition generally caused by a microcorticotropinomas (MIC) and 7-20% of these patients present an ACTH-producing macrocorticotropinomas (MAC). Recently, somatic mutations in *USP8* gene, were identified as a major genetic cause of CD due to ACTH-secreting pituitary adenomas (23% - 62%). Few series reported the distribution between MIC and MAC related to *USP8*-mutated and to genotype-phenotype correlation. We aimed to evaluate *USP8*-mutations in a cohort of MIC-MAC from the unique tertiary center. **Methods:** DNA-tumor- tissue was sequenced (16 MICs and 33 MACs). Clinical, biochemical, imaging data and remission/recurrence rates were evaluated. We systematically analyzed 8 published series. **Results:** We identified four *USP8* pathogenic allelic variants previously described in 13 out of 49 corticotrophinomas (26.5%). Eight were (61.5%) detected in MACs. Urinary cortisol levels of patients with *USP8*-mutated were lower than wild-type group ($p \leq 0.012$). The frequency of *USP8*-mutated among the series was around 30% with higher prevalence in female patients ($p < 0.0001$). No significant consensus was identified between wild-type and *USP8*-mutated regarding hormonal levels; tumor size and remission/recurrence among all series. **Conclusion:** Our data as well as the retrospective review about CD associated or not with *USP8*-mutated show us a heterogeneous finding among the published series with several drawbacks due to lack of a systematic protocol to evaluate these patients. In conclusion, further multicenter prospective studies in a task-force will bring consistent information about the influence of the major genetic cause of Cushing's disease, *USP8* gene, regarding clinical-radiological presentation and remission/recurrence rates.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Cushing

A doença de Cushing (DC) é considerada uma causa rara de hipercortisolismo endógeno dependente de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), geralmente decorrente de um adenoma hipofisário, com incidência de 2 a 4 pacientes por milhão / ano e alta prevalência em pacientes do sexo feminino (25 e 40 anos) ¹. Aproximadamente 10% dos tumores hipofisários se desenvolvem a partir da linhagem corticotrófica (corticotropinomas), através da secreção autônoma de ACTH pelas células corticotróficas tumorais, levando à uma produção crônica e excessiva de cortisol pela zona fasciculada do córtex das glândulas suprarrenais ¹⁻⁴

A maioria dos corticotropinomas, quando visíveis em exames de ressonância magnética, são microcorticotropinomas (<10 mm de diâmetro), enquanto macrocorticotropinomas são identificados em cerca de 10 a 20% ($\geq$ 10 mm de diâmetro) dos pacientes. Apenas alguns casos apresentam comportamento invasivo e, excepcionalmente, desenvolvem potencial de malignização ⁴.

Os pacientes com DC apresentam amplo espectro clínico, de acordo com a intensidade da produção hormonal, tempo de exposição e sensibilidade aos receptores do cortisol. Pacientes com síndrome de Cushing são o protótipo da síndrome metabólica sendo associado a maior morbi-mortalidade em relação a população geral devido principalmente ao aumento do risco de doença cardiovascular, cerebral e infecciosa. A Tabela 1 resume os principais sinais e sintomas associados ao hipercortisolismo.

Tabela 1 - Frequência dos principais sinais e sintomas do hipercortisolismo

Manifestações clínicas	%
- Calculose renal - Infecções oportunistas - Parada ou diminuição da velocidade de crescimento	15-50
- Alterações psicológicas	31-86
- Estrias violáceas (> 1 cm)	51-71
- Face pleórica, arredondada	50-94
- Fraqueza da musculatura proximal	29-90
- Glicemia de jejum alterada diabetes mellitus	39-90
- Hipertensão arterial	74-87
- Obesidade	79-97
- Osteopenia/Osteoporosis – Fratura óssea	50-70
- Pele atrófica, hematoma (mm traumas)	51-71
- Hirsutismo irregularidade menstrual, amenorreia	64-80

O tratamento considerado padrão-ouro para esses pacientes é a ressecção cirúrgica do tumor hipofisário, no entanto, a remissão do hipercortisolismo ocorre em cerca de 76% dos microcorticotropinomas e 43% dos macrocorticotropinomas, com taxas de recorrência variando de 23% a 33% ⁵. Pacientes sem remissão ou recorrência de hipercortisolismo precisam da associação de outros tratamentos, como terapia medicamentosa; irradiação / radioterapia da região selar ⁶. Os medicamentos mais importantes na prática clínica para controlar o hipercortisolismo, atuam como inibidores da liberação de ACTH, da secreção de cortisol ou a partir do bloqueio do seu receptor (agonista da dopamina, análogos da somatostatina; cetoconazol, metirapona, mitotano e mifepristona, respectivamente) ⁷.

1.2 Corticotropinomas

A base morfológica dos adenomas corticotróficos consiste de células basófilas que expressam o ACTH e outros peptídeos derivados de POMC. Os adenomas corticotróficos são geralmente benignos, entretanto o comportamento biológico dos corticotropinomas pode ser variável, desde tumores indolentes com baixo potencial de crescimento, até tumores agressivos recorrentes e excepcionalmente malignos ^{14,21,22}.

A atual classificação destes adenomas baseia-se principalmente em suas características secretórias, mas também de acordo com suas características fenotípicas, incluindo tamanho e grau de invasão do tumor ¹⁴. A grande maioria dos pacientes com DC com adenomas visíveis ao exame de ressonância magnética (RM) apresentam microadenomas, tumores menores do que < 10 mm no maior diâmetro. Geralmente os corticotropinomas encontram-se confinados à sela túrcica, podendo ou não apresentar micro-infiltrações para a duramáter. Por outro lado, cerca de 10-20 % dos pacientes podem apresentar tumores ≥ 10 mm, classificados como macroadenomas ¹⁴. Os macroadenomas podem ou não invadir tecidos adjacentes tanto de forma simétrica quanto assimétrica e são comumente classificados de acordo com a nomenclatura de Hardy ¹⁴. Entretanto, a nomenclatura de Knosp ²³ é indicada para classificar as invasões parassellares, de acordo com sua posição em relação à artéria carótida (Figura 1).

Figura 1 - Classificação de Hardy ¹⁴ para adenomas hipofisários e de Knosp ²³ para invasões paraselares. **a.** Classificação de Hardy. Grau 0: normal; Grau I: microadenoma (< 10 mm) restrito à sela túrcica; Grau II: macroadenoma ($\geq$ 10 mm) restrito à sela túrcica; Grau III: perfuração localizada no soalho selar; Grau IV: destruição difusa do soalho selar. **b.** Classificação de Knosp. Grau 0: nenhum envolvimento do seio cavernoso; Graus I e II se insinuam contra a parede medial do seio cavernoso, mas não excedem uma linha hipotética entre os centros dos dois segmentos da artéria carótida interna (Grau I) ou que vai além desta linha, mas sem ultrapassar uma linha tangente nas margens laterais da artéria (Grau II); Grau III: o tumor estende-se lateralmente para a carótida interna dentro do seio cavernoso; Grau IV: envolvimento total da artéria carótida intracavernosa. Adaptado de Di Leva, 2014 ¹⁴

1.3 Patogênese molecular da doença de Cushing

As causas genéticas relacionadas à tumorigênese corticotrófica não foram totalmente elucidadas. Os corticotropinomas são de origem monoclonal e mutações em proto-oncogenes como *KRAS*, *RET*, *PTTG* e *c-MYC* e em supressores de tumor como *RBI* são muito raramente relatadas em corticotropinomas ¹⁰. Mutações no gene *TP53* são extremamente raras e foram encontrados apenas em casos atípicos de tumores mais agressivos (tamanho e invasibilidade) e nos carcinomas corticotróficos. ^{11,12}. A DC raramente é vista no contexto de síndromes genéticas como neoplasia endócrina múltipla MEN1 (*MEN1*), MEN4 (*CDKN1B*), – síndrome McCune Albright (oncogene

GNAS) e mais raramente no complexo Carney (*PRKARIA*)¹³⁻¹⁵. A variante *CDKN1B* foi observada em corticotropinomas em uma grande coorte de adenomas hipofisários esporádicos¹⁷.

A DC raramente é encontrada no contexto familiar dos adenomas hipofisários isolados (FIPA) que ocorrem em famílias com adenomas hipofisários isolados causados por mutação germinativa do *AIP*. Em uma coorte de 74 pacientes pediátricos com DC isolada, um apresentou mutações no gene *AIP* e dois apresentaram mutações no gene *MEN1*¹⁴. A raridade dos eventos familiares ou a associação com síndromes genéticas conhecidas sugere uma base genética adquirida na DC.

Em 2004, Theodoropoulou e cols. sugeriram a participação do receptor do fator endotelial de crescimento (EGFR) na tumorigênese dos adenomas hipofisários funcionantes. O estudo realizado por Fukuoka e cols.²⁸ demonstrou que a via mediada pelo EGFR é essencial para a síntese do precursor do ACTH (POMC). A transfecção de EGFR em uma linhagem celular tumoral corticotrófica de camundongos demonstrou um aumento da secreção de ACTH pela via da MAP quinase. Da mesma forma, o bloqueio do EGFR pela inativação de um inibidor da tirosina quinase, inibiu a hipersecreção de ACTH e a proliferação celular dos tumores corticotróficos pelo aumento da apoptose.

Em 2015, Martin Reincke⁹ e cols., estudando a base genética dos corticotropinomas por técnica de sequenciamento em larga escala em DNA de sangue periférico pareado com DNA de tecido tumoral, identificaram pela primeira vez, variantes alélicas patogênicas, somáticas no gene *USP8* associados somente a corticotropinomas². Os autores em suma, elucidaram um novo mecanismo pelo qual a via do EGFR esta constitutivamente ativada. A mutação do *USP8*, localizada em domínios da atividade proteolítica favorece a um aumento da desubiquitinação do receptor do EGF, impedindo

sua *down*-regulação e mantendo o sinal sustentado. A proteína USP8 mutada aumenta atividade do promotor do gene que codifica a POMC levando consequentemente a um aumento do ACTH.

1.4 Protease 8 específica das ubiquitinas (*USP8*)

O gene *USP8*, foi descrito por S. Naviglio e cols. em 1998, está localizado no cromossomo 15q21.1 (Figura 2) e codifica a enzima UBPY, conhecida como USP8 pertencente à família das proteases.

Figura 2 a. Localização do *USP8* no braço longo do cromossomo 15, região 21 e sub-região 2.

Figura 2 b. Os aminoácidos afetados pelas mutações no *USP8* são altamente conservados entre as diferentes espécies.

1.4.1 Sistema Ubiquitina Proteassoma (UPS)

O UPS é uma via proteolítica que, em eucariontes, representa o principal mecanismo de degradação intracelular. O UPS controla a qualidade das proteínas, degradando as que estiverem inativas por apresentarem alteração estrutural. A proteólise mediada pelo UPS é seletiva, apenas as proteínas que sofreram ubiquitinação (UB) serão degradadas por essa via. As ubiquitinas (Ubs) possuem 76 aminoácidos em sua estrutura e apresentam sete resíduos de lisina. Todos os resíduos contribuem para a formação das cadeias, ou seja, das ligações entre as ubiquitinas. Essas cadeias de poliubiquitinas apresentam grande diversidade, podendo ser uma monoubiquitinação (apenas 1 Ub ligada à proteína alvo), ou multiubiquitinação (mais de 1 Ub ligada à proteína alvo). A ubiquitinação sinaliza as proteínas com alterações estruturais e ativam as organelas responsáveis pela degradação, denominadas proteassomas ³⁰.

1.4.2 Ubiquitinação (UB) e Desubiquitinação (DUB)

A atividade UB depende de três tipos de enzimas: enzima ativadora de ubiquitina que possui afinidade com a Ub e por meio de ligações peptídicas (E1); enzima conjugadora de ubiquitina que possui afinidade com a Ub e com a E3 (E2), e a ubiquitina ligase que possui afinidade com a proteína alvo (E3). As 3 enzimas auxiliam na ligação entre a proteína alvo e as Ubs. Este processo pode acontecer várias vezes, formando a multiubiquitinação ³¹. (Figura 3).

Figura 3. Sinalização da proteína alvo pela ubiquitinação e degradação da proteína alvo pelo proteassoma.

A partir da multiubiquitinação a proteína alvo será facilmente reconhecida pelos proteassomas e o processo de degradação pode ser iniciado. Visto que o processo conta com enzimas para realizar a ligação entre as Ubs e a proteína alvo, este processo é considerado reversível e conhecido como desubiquitinação (DUB) e ocorre logo após o reconhecimento e degradação da proteína alvo pelo proteassoma, reciclando e liberando as Ubs para o citoplasma celular.

A enzima UBPY/USP8 é estritamente controlada pela família das proteínas 14-3-3, que são altamente conservadas entre as espécies e envolvidas em muitos processos intracelulares. O domínio de ligação da USP8 (RSYPSSP) com a proteína 14-3-3, especificamente em PS, é uma serina fosforilada e corresponde à Ser718, em humanos, e é imprescindível para a interação entre ambas proteínas. Vale salientar que, com a ligação estabelecida entre as proteínas, as UBPY permanecem inativas no citoplasma, ao passo que quando não há interação ocorre ativação da mesma no núcleo.

1.4.3 Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)

O EGFR é um receptor localizado na superfície da membrana celular que faz interação com proteínas extracelulares. A abundância de receptores de superfície celular, como o EGFR, e o tráfico lisossomal são controlados pelo produto da proteína USP8, que os destacam, possibilitando sua visualização^{2, 29}. Na presença das mutações ativadoras do *USP8*, ocorre maior atividade DUB e consequentemente uma maior estabilidade do EGFR, que será reciclado, retornando à membrana celular. O aumento do número de EGFRs eleva a transcrição da POMC e consequentemente as concentrações de ACTH^{2,32, 33}.

1.5 Revisão da literatura

I) Título: Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease

Autor: Martin Reincke e cols. (*Nature Genetics*, 2015)

Os autores avaliaram 17 pacientes (6 masculinos - 11 femininos) com idade variando entre 25 e 56 anos. A pesquisa das variantes alélicas no *USP8* foi realizada em 7 MACs e 10 MICs. Cinco dos MACs eram de pacientes do sexo masculino. Seis corticotropinomas apresentaram mutação no *USP8* (cinco mutações diferentes: uma deleção, três mutações pontuais e uma dupla mutação). Todos os pacientes que apresentaram mutação somática eram do sexo feminino.

Com relação a imagem radiológica, o autor classifica como microadenoma dois pacientes com nódulo em hipófise de 10 mm. Os diâmetros dos corticotropinomas que apresentaram mutação no gene *USP8* apresentaram-se menores do que aqueles sem a mutação, 8 ± 6 e 13 ± 8 mm respectivamente.

Os dados hormonais coletados no estudo foram, ACTH plasmático e cortisol sérico após 1 mg de dexametasona. Sendo que, ambas concentrações apresentaram-se mais baixas nos pacientes carreadores da mutação *USP8*, 50 ± 46 e 90 ± 48 pg/mL; 7.8 ± 9.7 e 21.1 ± 12.5 µg/dL, respectivamente. O estudo não avaliou a evolução do hipercortisolismo.

II) Título: The Gene of the Ubiquitin- Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease

Autor: Luis G. Perez- Rivas e cols. (*JCEM*, 2015)

O estudo avaliou 134 pacientes (36 masculinos - 98 femininos) entre adultos e pediátricos, com idade média de 43.8 e 14.6 anos, respectivamente. A pesquisa das variantes alélicas no *USP8* foi realizada em 65 MACs e 69 MICs. Oitenta e seis corticotropinomas apresentaram mutação no *USP8* (oito mutações diferentes: cinco deleções e três mutações pontuais). Os pacientes que apresentaram mutação somática eram majoritariamente do sexo feminino.

Com relação a imagem radiológica, MICs com mutação *USP8* apresentaram tamanho maior quando comparados com os sem mutação, mediana de 8 ± 6 mm, respectivamente. MACs com a presença de mutação apresentaram-se menores do que os sem mutação, mediana de 16 ± 18 mm, respectivamente. Vale ressaltar que,

corticotropinomas de pacientes femininos carreadores de mutação eram significativamente menores do que os sem mutações.

Os dados hormonais coletados no estudo foram: ACTH plasmático, cortisol sérico pela manhã, cortisol urinário de 24h, cortisol sérico após 1/2 e 8 mg de dexametasona. Apesar das diferenças nas concentrações hormonais entre os grupos não apresentarem significância, todas estavam mais baixas com a presença da mutação, exceto o cortisol sérico após 1/2 mg de dexametasona. O estudo não avaliou a evolução do hipercortisolismo.

III) Título: Recurrent gains-of-function *USP8* mutations in Cushing's disease

Autor: Zeng-Yi Ma e cols. (*Cell Research*, 2015)

Os autores avaliaram 120 pacientes (21 masculinos - 99 femininos), com idade média foi identificada por grupo sendo, 36 e 40 anos, com e sem mutação respectivamente. A pesquisa das variantes alélicas no *USP8* foi realizada em 36 MACs e 57 MICs. Cinquenta e nove corticotropinomas apresentaram mutação no *USP8* (dezessete mutações diferentes: cinco deleções, sete mutações pontuais e cinco dupla mutação). Os pacientes que apresentaram mutação somática eram majoritariamente do sexo feminino.

O estudo mostrou os diâmetros dos tumores hipofisários dos pacientes, porém apenas analisou a relação do tamanho com a produção de ACTH plasmático e revelou que a razão entre essas duas variáveis foi maior em pacientes carreadores da mutação *USP8* em relação aos sem mutação.

Os dados hormonais avaliados não mostraram significância estatística, com exceção do ACTH plasmático que mostrou suas concentrações mais baixas em pacientes carreadores da mutação *USP8*.

Ao que se refere à evolução do hipercortisolismo, 20 pacientes recorreram à doença e 100 entraram em remissão após cirurgia, a relação entre remissão/recorrência entre pacientes carreadores ou não da mutação não foi significativa estatisticamente. Dos setenta e cinco pacientes carreadores da mutação, sessenta e três entraram em remissão, representando 84% dos casos mutados. Em relação aos pacientes que recorreram após cirurgia, doze eram carreadores de mutação, representando 20,7% dos casos mutados.

IV) Título: The *USP8* mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease

Autor: Kyohei Hayashi e cols. (*EJE*, 2016)

Os autores avaliaram 60 pacientes (13 masculinos - 47 femininos) com idade variando entre 19 e 81 anos. A pesquisa das variantes alélicas no *USP8* foi realizada em 32 MACs e 28 MICs. Vinte e um corticotropinomas apresentaram mutação no *USP8* (sete mutações diferentes: três deleções e quatro mutações pontuais). Todos os pacientes que apresentaram mutação somática eram do sexo feminino, exceto um.

Com relação a imagem radiológica os diâmetros dos corticotropinomas com mutação no gene *USP8* apresentaram-se menores do que aqueles sem mutação, 9,1 e 16,3 mm respectivamente.

Os dados hormonais coletados no estudo foram: ACTH plasmático e cortisol sérico. Sendo que, ambas concentrações se apresentaram mais baixas nos pacientes carreadores da mutação *USP8*, 79,1 e 110 pg/mL; 19,3 e 20,9 respectivamente.

Ao que se refere à evolução do hipercortisolismo, dezenonove pacientes recorreram à doença e quarenta e um entraram em remissão após cirurgia, a relação entre remissão/recorrência entre pacientes carreadores ou não da mutação foi significativa estatisticamente. Dos vinte e um pacientes carreadores da mutação, vinte entraram em remissão, representando 95,2% dos casos. Em relação aos pacientes que recorreram após cirurgia, dezoito não eram carreadores de mutação, representando 85,7% dos casos.

V) Título: Somatic *USP8* Gene Mutations are a Common cause of Pediatric Cushing Disease

Autor: Fabio R. Faucz e cols. (*JCEM* 2017)

Os autores avaliaram 42 pacientes pediátricos (15 masculinos - 27 femininos) com idade variando entre 13.7 e 18.7 anos. A pesquisa das variantes alélicas no *USP8* não foi realizada relacionando com MICs e MACs. Treze corticotropinomas apresentaram mutação no *USP8* (cinco mutações diferentes: duas deleções e três mutações pontuais). Todos os pacientes que apresentaram mutação somática eram do sexo feminino, exceto dois.

Com relação a imagem radiológica os diâmetros dos corticotropinomas com mutação no gene *USP8* apresentaram-se menores do que aqueles sem mutação, com média de 5,4 e 8 mm respectivamente.

Os dados hormonais coletados no estudo foram: ACTH plasmático e cortisol sérico à meia noite e cortisol urinário de 24h. Sendo que, as concentrações apresentaram-se mais baixas nos pacientes carreadores da mutação *USP8*, exceto em relação ao cortisol sérico à meia noite (47,7 e 82,2 pg/mL; 396 e 468), respectivamente.

Em relação à evolução do hipercortisolismo, cinco dos treze pacientes que entraram em recorrência eram carreadores da mutação, enquanto que todos do grupo de pacientes que entraram em remissão (vinte e nove) não apresentavam mutação somática no *USP8*.

VI) Título: The USP8 mutational status may predict long-term remission in patients with Cushing's disease

Autor: Adriana Albani, (*Clin. Endocrinology*, 2018)

Os autores avaliaram 48 pacientes (10 masculinos - 38 femininos) com idade média significativamente mais baixa em pacientes carreadores de mutação em comparação aos não mutados, 46 e 53 anos respectivamente. A pesquisa das variantes alélicas no *USP8* foi realizada em 12 MACs e 36 MICs. Dezoito corticotropinomas apresentaram mutação no *USP8* (cinco mutações diferentes: duas deleções e três mutações pontuais). Os pacientes que apresentaram mutação somática eram majoritariamente do sexo feminino.

Com relação a imagem radiológica o estudo apontou não ter encontrado significância entre o tamanho e a presença de mutação *USP8*.

Os dados hormonais coletados no estudo foram: ACTH plasmático e cortisol sérico pela manhã e cortisol urinário de 24h. Sendo que, as concentrações de cortisol urinário de 24h apresentaram-se mais elevados nos pacientes carreadores da mutação *USP8*, indicando significância estatística neste dado.

Ao que se refere à evolução do hipercortisolismo, nove pacientes recorreram à doença e trinta e oito entraram em remissão após cirurgia, a relação entre remissão/recorrência entre pacientes carreadores ou não da mutação não foi significativa estatisticamente. O estudo demonstrou que, a presença da mutação aumenta em

aproximadamente quatro vezes o risco de recorrência, no entanto sua durabilidade é menor.

VII) Título: Clinical characteristics and surgical outcome in *USP8*- mutated human adrenocorticotrophic hormone- secreting pituitary adenomas

Autor: Marco Losa, (*Endocrine*, 2018)

Os autores avaliaram 92 pacientes (19 masculinos - 73 femininos) com idade média de 38.6 anos. A pesquisa das variantes alélicas no *USP8* foi realizada em 41 MACs e 51 MICs. Vinte e dois corticotropinomas apresentaram mutação no *USP8*. Todas as variantes alélicas encontradas localizavam-se na região de *hotspot* do *USP8* e haviam sido descritas previamente. Todos os pacientes que apresentaram mutação somática eram do sexo feminino, exceto um.

Com relação a imagem radiológica o estudo apontou que as características tumorais foram semelhantes nos dois grupos. Em MICs com a mutação *USP8*, o tamanho apresentava-se significativamente menor em relação aos não mutados. Não houve relevância estatística entre o tamanho dos diâmetros dos MACs e a presença da mutação.

Os dados hormonais coletados mostraram que houve similaridade entre os grupos de pacientes mutados e não mutados quanto à concentração de ACTH plasmático e cortisol sérico pela manhã. Apesar da insignificância estatística mostraram os dados onde verifica-se que ambos hormônios se apresentam mais baixos com a presença da mutação

Ao que se refere à evolução do hipercortisolismo, todos os pacientes com mutação apresentaram remissão da doença após cirurgia transfenoidal, mostrando que pacientes carreadores da mutação apresentam maior probabilidade de remissão. Desses, cinco apresentaram recorrência da doença enquanto que do grupo de pacientes não mutados (cinquenta e três) apenas em sete houve recorrência da doença.

VIII) Título: Impact of USP8 gene mutations on protein deregulation in Cushing's disease

Autor: Isabel Weigand e cols. (*JCEM*, 2019)

Os autores avaliaram 92 pacientes (22 masculinos - 70 femininos) com idade média foi avaliada em cada grupo (presença ou não de mutação) sendo, 38 e 54 anos respectivamente. O estudo não apresentou o número de micro e macroadenomas avaliados, no entanto indicou a mediana e a variação do maior diâmetro tumoral, sem significância estatística. Dezesete corticotropinomas apresentaram mutação no *USP8*. Todos os pacientes que apresentaram mutação somática eram do sexo feminino.

Os dados hormonais não foram coletados de todos os pacientes estudados. Avaliou-se as concentrações de ACTH plasmático e cortisol sérico pela manhã, porém não houve significância estatística entre o grupo de pacientes com a presença e ausência da mutação somática. O estudo não avaliou a evolução do hipercortisolismo após cirurgia transfenoidal.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

- Pesquisar a frequência de mutações no gene *USP8* em uma coorte de micro e macrocorticotropinomas de pacientes com doença de Cushing, operados no complexo HC-FMUSP de 1995 a 2018.
- Correlacionar os dados clínicos, hormonais, radiológicos (ressonância magnética) e evolução do hipercortisolismo com a presença da mutação no gene *USP8*.
- Comparar os resultados e correlações deste trabalho com as series publicadas na literatura.

3. Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa. Os participantes foram esclarecidos quanto aos objetivos e procedimentos deste estudo, tendo sido aplicado um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo1).

3.1 Casuística

Entre 1995 e 2018 foram avaliados 232 pacientes com DC, do centro terciário do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Brasil. Foram selecionados 49 corticotropinomas com tecido disponível para análise genética. O diagnóstico de doença de Cushing foi confirmado pela análise histológica dos adenomas hipofisários produtores de ACTH. Coletou-se retrospectivamente os dados clínicos, hormonais e radiológicos (ressonância magnética) antes e depois da cirurgia dos pacientes e foi construído um banco de dados (Anexo 2).

- Trinta e seis corticotropinomas foram armazenados em nitrogênio líquido após a realização da cirurgia transfenoidal (laboratório LIM-25).

- Vinte e oito corticotropinomas conservados em emblocado de parafina no setor de Anatomia Patológica - HCFMUSP, sendo 15 deles pareados com tecido fresco, totalizando a coorte de 49 tecidos analisados.

3.2 Extração de DNA de tecido fresco conservado em nitrogênio líquido

Os DNAs foram extraídos pelo método TRIZOL ou kit comercial AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) para tecidos, seguindo protocolo do fabricante. As amostras extraídas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro para análise de concentração e pureza.

A análise tecidual comprobatória da presença do corticotropinoma no fragmento estudado realizou-se pela análise de lâminas. De cada fragmento hipofisário coletado e armazenado, foram realizados cinco cortes no micrótomo do criostato à -20°C, sendo os dois primeiros destinados à confirmação da presença do tecido tumoral. Para tal, foi necessário realizar duas técnicas: Presença de reticulina fragmentada e coloração de Hematoxilina-Eosina (H/E).

3.3 Extração de DNA dos tecidos armazenados em emblocados de parafina

A extração foi realizada com o kit comercial AllPrep DNA/RNA Mini kit (Qiagen) para tecidos fixados em parafina, seguindo o protocolo do fabricante.

3.4 PCR para amplificação da região de interesse do gene *USP8*

Os *primers* para amplificação por PCR do exon 14 do *USP8*, onde foram identificadas as mutações, foram desenhados com auxílio do software Primer3 v4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Tabela 2 e 3). Diferentes jogos de *primers* foram desenhados para cada tipo de armazenamento do tecido, uma vez que o DNA conservado em emblocado de parafina sofre maior degradação.

Tabela 2. Primers desenhados para a realização da PCR dos DNAs de tecidos frescos armazenados em nitrogênio líquido.

<i>Primers -Tecido Fresco</i>	Pares de bases	Número de pares de bases
<i>Forward</i>	TTT AGC AGA ATA CTT TGG AGT GAT TT	26
<i>Reverse</i>	CTG GTA TAG CCA TCC ACA GAA A	22

Tabela 3. Primers desenhados para a realização da PCR dos DNAs dos tecidos armazenados em emblocados de parafina.

<i>Primers -Tecido em parafina</i>	Pares de bases	Número de pares de bases
<i>Forward 1</i>	TCT TTT GAA GTT TAT CGC CAT TT	23
<i>Reverse 1</i>	AAG GAG GTG CAG ATG AAG GA	20
<i>Forward 2</i>	TGA CCC AAT CAC TGG AAC CT	20
<i>Reverse 2</i>	TGG GTT ATA TCT GGG GAG GA	20
<i>Forward 3</i>	CTT CAT CTG CAC CTC CTT CC	20
<i>Reverse 3</i>	TCA GAG TAG AAA CTT TGA AAT ACA GCA	27

Os protocolos para PCRs foram padronizados para cada jogo de *primers*, em termociclador modelo PTC- 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA) com bloco de gradiente de temperatura. Utilizou-se o DNA genômico e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) intrônicos específicos para a amplificação do gene *USP8*. As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 uL, contendo: 50 ng de DNA genômico, 200 uM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs) (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA), 15 pmol de cada primer específico (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA), 0,75 U da enzima Go Taq® DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) e 5 uL da solução tampão 5x

Green Go Taq Reaction Buffer (Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

3.5 Sequenciamento do produto de PCR pelo método de Sanger

Os produtos de PCR foram submetidos à purificação para retirada de impurezas e dímeros de primers utilizando PureLink™ PCR Purification kit (Invitrogen, USA). A reação de sequenciamento será realizada com o reagente BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City CA) utilizando os mesmos primers da PCR e o sequenciamento automático será realizado em equipamento ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City CA).

O produto comercial ExoSAP-IT (Affymetrix Inc., Cleveland, OH, EUA), permitiu a purificação do DNA amplificado. A essa solução purificada, foi adicionado 1 uL de Big Dye Terminator (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA), 1 mL de tampão Save Money (Tris-HCl 0,2 mM; MgCl₂ 5 mM) e 5 pmol de um dos primers (antisense), em seguida, a reação de sequenciamento em um termociclador Veriti (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA): 25 ciclos a 96 °C por 10 segundos, a 50 °C por 5 segundos e à 60 °C por 4 minutos. Os produtos dessa reação foram submetidos à eletroforese capilar em um sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA) e o eletroferograma foi gerado pelo programa Sequencher 5.0.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados do National Center for Biotechnology and Information (NCBI).

3.6 Análise da expressão proteica USP8

Os tecidos conservados em emblocados de parafina foram cortados com 3 μ m de espessura e em seguida fixados para a preparação das lâminas silanizadas.

Em seguida, as lâminas foram desparafinadas com xilol e rehidratadas usando gradiente de etanol. Após a recuperação do antígeno, a atividade da peroxidase endógena é bloqueada a partir do tratamento dos fragmentos com peróxido de hidrogênio 3% em metanol durante 20 minutos. Os fragmentos de tecido foram incubados com o anticorpo anti-USP8 (1:100, Abcam, ab170025) para visualização da proteína USP8. Após a lavagem, os fragmentos foram corados com *ABC staining kit* (Vector Laboratories), seguindo o protocolo do fabricante. Para finalizar, os fragmentos foram contra corados com hematoxilina e eosina.

A técnica de imunoistoquímica foi utilizada no intuito de identificar a localização da USP8 com e sem a mutação do seu respectivo gene, dentro da célula. De acordo com o estudo de Martin Reincke e cols.² a localização da expressão da proteína muda quando há mutação, localizando-se mais no núcleo celular.

Para confirmar a presença de células tumorais corticotrópicas a partir da técnica de hematoxilina e eosina tecidual fresca e fixa e da lâmina de reticulina fragmentada foi realizada em cada amostra, com imunocoloração positiva para ACTH nas lâminas. A imuno-histoquímica foi realizada em 20 adenomas (5 com mutações somáticas USP8), conservados em tecidos fixados em formalina e seções com 3 µm foram fixadas em lâminas silanizadas. O corante de proteína USP8 foi visualizado usando anti-USP8 de coelho (Abcam) com diluição de 1: 100. Dois patologistas experientes realizaram uma análise cega (dados não mostrados).

3.7 Análise estatística

Para resumir as variáveis quantitativas, foram consideradas as medidas resumo de posição e dispersão, como média, mediana, desvio padrão e valores mínimo e máximo. Já para as variáveis qualitativas as frequências absoluta e relativa (%) foram apresentadas. Com o intuito de avaliar uma possível associação entre duas variáveis qualitativas o teste de independência (teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher) foi aplicado. A comparação das variáveis quantitativas em relação a dois grupos independentes foi avaliada por meio do teste não paramétrico U de Mann ou por meio do teste T para amostras independentes. Já para avaliar uma possível correlação entre duas variáveis quantitativas foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman.

O nível de significância adotado foi o de 5%. Assim, resultados cujos valores p são

menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SPSS versão 24 (Chicago, IL) e também pelo software livre R versão 3.5.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Banco de dados da coorte de pacientes do HC-FMUSP

Os testes hormonais pré e pós-operatórios incluíram ACTH basal plasmático, cortisol sérico no início da manhã; cortisol urinário de 24h; cortisol salivar à meia-noite e cortisol após 1 mg de dexametasona (DST) foram coletados da quase totalidade dos 49 pacientes. Os critérios de remissão do hipercortisolismo foram definidos com níveis séricos de cortisol abaixo de 2,2 µg / dL (rotineiramente realizados 4-5 dias após o procedimento cirúrgico) e todos os pacientes que necessitaram de substituição de glicocorticoide devido ao hipocortisolismo pós- cirúrgico, a hidrocortisona foi introduzida. Além disso, a remissão foi considerada se nenhuma recidiva fosse detectada pelo período mínimo de 6 meses após a cirurgia. A recorrência da DC foi identificada quando os sintomas clínicos do hipercortisolismo eram evidentes, bem como a detecção das concentrações de cortisol urinário de 24h, cortisol salivar à meia-noite elevadas e/ou a não-supressão de cortisol após DST ($F > 1,8 \mu\text{g} / \text{dL}$ ou $50 \text{ nmol} / \text{L}$ mg durante a administração oral). Dados clínicos, hormonais, moleculares e de imagem dos quarenta e nove pacientes antes da cirurgia são resumidamente descritos no Anexo 2.

4.3 Avaliação Hormonal dos Pacientes HC-FMUSP com Micro e Macro corticotropinomas

Pacientes com MICs apresentaram concentrações elevadas do ACTH plasmático e consequentemente maiores concentrações do cortisol sérico coletado as 8h (Coeficiente de correlação de Spearman, $p = 0,048$), conforme Tabela 5. Nenhuma correlação pode

ser estabelecida com os pacientes que apresentaram macroadenomas.

Utilizando o teste estatístico U de Mann-Whitney, foi possível detectar diferenças significantes nas concentrações de cortisol urinário de 24h entre os MICs e MACs, conforme Tabela 4. Demais hormônios apresentaram-se similares nos dois grupos.

Tabela 4. Diferença entre cortisol urinário de 24h e o tamanho do corticotropinoma

Variável	Tipo de adenoma	N	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	valor <i>p</i>
24h Urinary cortisol	MICs	15	2	5,493	5,000	15,300	3,805	0,023
	MACs	31	1	4,283	2,300	48,700	8,472	
	Total	46	1	4,677	2,500	48,700	7,258	

- Micro e macrocorticotropinomas e suas respectivas relações hormonais

Este estudo mostrou significância estatística em relação às concentrações de cortisol urinário de 24h e a classificação do adenoma hipofisário (MICs e MACs) (Teste U de Mann-Whitney, $p = 0,01$), respectivamente, de acordo com a Tabela 5.

4.4 Mutações somáticas no *USP8* nos corticotropinomas

4.4.1 Mutações do *USP8* na coorte de pacientes HC-FMUSP

Dos quarenta e nove corticotropinomas analisados, treze (26,53%) apresentaram mutações somáticas do tipo missense no gene *USP8*, sendo todas elas mutações de ponto (p. Ser718Pro, p. Ser718Cys, p. Pro720Arg, p. Pro720Gln). Os aminoácidos acometidos são altamente conservados entre as espécies. Todas as mutações encontradas estão localizadas, nos aminoácidos 718 e 720, próximo ao sítio de ligação da enzima UBPY/USP8 com a proteína 14-3-3².

Os pacientes carreadores da mutação eram majoritariamente do sexo feminino

(12/13, 92,3%, teste exato de Fisher, $P = 1$), conforme gráfico 1, MACs (8/13, 61,5%, teste de qui-quadrado, $P \leq 0,513$) e com idade média de 33,46 anos.

Tabela 5. Relação entre a presença da mutação *USP8* e o cortisol urinário de 24h

Variável	<i>USP8</i>	N	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	<i>p</i>
Cortisol urinário de 24h	Mutado	13	113	601,272	388,000	1543,000	433,338	0,017
	Não mutado	33	265	1051,283	721,500	4743,130	932,590	
	Total	46	113	924,106	683,425	4743,130	842,921	

- Evolução dos Pacientes após cirurgia transesfenoidal: remissão e recorrência

A partir dos 49 pacientes analisados, verificou-se a relação entre a presença da mutação somática com o risco de recorrência e a probabilidade de remissão da doença.

A recorrência da doença ocorreu em vinte e um pacientes, cinco apresentavam mutação somática (38,5%) e dezesseis não carreadores da mutação (44,5%). No entanto, não houve significância estatística entre a presença da mutação e o risco de recorrência (Teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, $p = 0,87$).

Da totalidade, verificou-se que vinte e oito pacientes apresentaram remissão após cirurgia. Embora insignificante estatisticamente, oito desses eram carreadores das mutações somáticas (61,5%) e vinte não carreadores da mutação (55,5%) (Teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, $p = 0,96$).

4.4.2 Expressão proteica da *USP8* - Imunoistoquímica

Para identificar a localização da proteína *USP8* em corticotropinomas com e sem variação alélica, foi realizada técnica de imunoistoquímica em 20 tecidos tumorais armazenados em emblocados de parafina, sendo que, todos possuíam resultado de sequenciamento do exon 14. Dentre os 20 tecidos analisados, cinco apresentaram mutações no exon 14 do gene *USP8*.

A técnica de imunohistoquímica revelou que em 11/20 tecidos analisados, a expressão da USP8 encontrava-se no citoplasma da célula, sendo que, 2/11 apresentavam variantes alélicas. Nos 9 tecidos restantes a localização da proteína foi identificada majoritariamente no citoplasma mas também no núcleo, sendo que 3 desses apresentavam *USP8* mutante (Anexo 3).

4.5 Banco de dados dos pacientes das oito séries da literatura

Em geral, os testes hormonais de pré-operatório, incluíram: ACTH basal plasmático, cortisol sérico no início da manhã, cortisol urinário de 24h, cortisol salivar à meia-noite e cortisol após DST). A concentração do ACTH e o cortisol sérico foram os testes mais avaliados entre as séries. Em relação aos dados radiológicos, os autores levaram em consideração a classificação dos adenomas em MICs e MACs, o maior diâmetro e a agressividade tumoral. A evolução do hipercortisolismo pós-operatório foi levantada na maioria dos estudos.

4.5.1 Mutações do *USP8* na coorte de pacientes de oito séries da literatura

Um total de 637 pacientes com doença de Cushing de 9 séries publicadas foram revisados⁹⁻¹⁶. Todos realizaram a análise genética para pesquisar a mutação somática do *USP8*. Avaliamos as características clínicas, o padrão hormonal, a imagem radiológica dos tumores hipofisários na ressonância magnética e os resultados relacionados à proporção de remissão e recorrência. Todos os dados estão resumidos na Base de Dados Suplementares (Anexo 4).

Em relação aos dados clínicos gerais entre *USP8*-WT e *USP8*-mutados das 9 séries, dos 637 pacientes analisados, 489 eram do sexo feminino (76,7%), dos quais 211 apresentavam mutação somática do *USP8* (43,1%) (I₂ = 0% 95% C.I. 8,14 - [5,52-12%]). No grupo masculino (n = 148), apenas 22 deles apresentaram mutação do *USP8*

(14,8%). Em apenas uma coorte, não encontramos diferença estatística significativa entre os gêneros⁸. A idade ao diagnóstico, entre os pacientes, apresentou uma grande variabilidade, uma vez que 3 séries apresentavam crianças nas suas coortes (até 12 anos de idade) e adolescentes (com mais de 12 anos até 14 anos de idade). Assim, a faixa mediana de idade nos pacientes com mutação somática do *USP8* variou 15,1 a 46 anos de idade e nos *USP8*-WT variou de 13,1 a 53 anos de idade (I2 = 41% IC95% 0,09 [-0,13; 0,31%]). Apenas um estudo¹⁴ apresentou uma diferença estatística significativa relacionada à idade entre *USP8*-mutado e *USP8*-WT. Embora nesta coorte nenhuma criança tenha sido avaliada, pacientes adultos mais jovens apresentaram maior prevalência de mutação somática do *USP8*. A avaliação pela ressonância magnética identificou 267 MIC e 226 MAC, dos quais 117 (43,8%) e 70 (30,9%), respectivamente, apresentaram mutação do *USP8* (I2 = 83% 95% C.I. 1.59 [0,84; 3,02%]). Três séries mostraram uma diferença significativa, duas delas indicaram que a mutação somática da *USP8* foi mais frequente na MIC e a nossa coorte mostrou o oposto, ocorrendo mais nos MAC [10, 14]. A mediana do diâmetro dos adenomas hipofisários com a mutação somática da *USP8*-mutado foi de 9 mm (variação de 3 a 22 mm) e dos *USP8*-WT a mediana foi de 12 mm (variação de 2 a 64 mm).

O padrão hormonal relatado entre as diferentes séries foi muito semelhante (I2 = 86% 95% C.I. 0.45 [-0.45 - 1.34%]). O ACTH basal plasmático foi analisado em quatro séries, e apenas um deles identificou uma diferença estatística entre *USP8*-mutado e o *USP8*-W, cujas concentrações do ACTH mais baixas foram associadas à mutação somática do *USP8* (I2 = 86% IC95% 1,25). [0,73-1,76%])¹³. Apenas duas séries puderam ser sistematicamente avaliadas por 24 hs de cortisol urinário de acordo com os dados publicados. A corte de Hayashi K e cols bem como nossa apresentaram dados

semelhantes sem diferença significativa entre os grupos (mutado e WD) ($I^2 = 0\%$ 95% C.I. 0.33 [- 0.13 - 0.79%])¹².

Quanto a remissão e recorrência o número de pacientes que apresentaram critérios de remissão foi de 272 de 637 pacientes (42,7%) em relação à presença da mutação no *USP8* -129 de 272 (47,4%) e 143 de *USP8*-WD (52,6%). Dentre as cinco séries analisadas, duas apresentaram diferença estatisticamente significativa, na qual os pacientes com mutação somática apresentaram maior proporção de remissão em relação aos WT ($I^2 = 37\%$ IC95% 1,77 [1,30-2,40%]) e ($I^2 = 0\%$ IC95% 130 [1,12]. - 1,50%])¹² respectivamente. Usando uma análise sistemática, incluindo 4 séries e nossa coorte, a probabilidade de remissão foi maior em pacientes com mutação somática da *USP8* ^{10, 11, 13, 14}. O risco de recorrência foi significativo em pacientes com mutação somática da *USP8* em duas séries ($I^2 = 58\%$ IC95% 3,21 [1,17-8,78%]) e ($I^2 = 58\%$ IC 95% 4,46 [1,31-15,14%]) respectivamente ^{12,14}.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

A frequência de mutações somáticas do USP8, representou 27% da nossa coorte, levemente abaixo da mediana das proporções observadas em todas as séries analisadas (34% IC = 25% - 44%). No entanto, esta menor frequência pode ser explicada a partir da análise da literatura, onde uma coorte chamou nossa atenção, composta por 120 pacientes chineses com DC, onde, pela técnica do sequenciamento total do exoma os autores identificaram mutações somáticas no USP8 em 62,5% da mutação. A análise estatística sem esse grupo específico (120 Chineses) diminuiu a heterogeneidade de I² = 84% para I² = 14% (análise estatística suplementar) e a frequência de mutação somática USP8 mudou para 30% □ CI = 26% - 35% □. Se esta discrepância está relacionada com a etnia precisa ser melhor avaliada em estudos posteriores.

Em relação às características demográficas, endossamos uma frequência desproporcional para mulheres carreadoras de mutações do USP8 em corticotropinomas (razão de risco mediana 1,30-1,19-1,43 □ p <0,0001) versus tipo selvagem (WT) quando todas as séries foram analisadas. No entanto, a nossa coorte, bem como Albani e cols 15 não apresentou a mesma razão feminina / masculina em relação a frequência da mutação somática do USP8. Embora a doença de Cushing seja mais frequente em pacientes do sexo feminino, o papel do estrogênio estimulando o crescimento do tumor e talvez fornecendo a mutação somática têm sido especulado e apoiado pela presença de receptores estrogênicos em células de tumores da hipófise humana, verificados por estudos in vitro sobre o efeito estimulador de estrogênios em células corticotróficas murinas 20,21.

Nossa coorte está de acordo com quase todas as séries relacionadas à idade na apresentação clínica associada a mutação somática da USP8 que mostrou uma grande variabilidade de 6 a 69 anos de idade. No entanto, apenas Albani e cols¹⁵ Em uma coorte de 48 pacientes adultos observaram diferença estatística (mediana de idade: WT 53 anos; USP8 - mutação de 46 anos, $p = 0,02$) em favor de pacientes mais jovens portadores de USP8 mutante.

Quando analisamos todas as séries em relação ao tamanho do tumor e ao comportamento de agressividade, encontramos uma sobreposição entre os corticotropinomas mutados MIC-WT x MIC-USP8 e MAC-WT x MAC-USP8. Os achados superponíveis talvez se devam a como os autores descreveram dados de ressonância magnética, como: mediana e amplitude do tamanho máximo; valor absoluto de tamanho e classificação em MIC ou MAC. Deve-se notar que apenas poucas séries relataram a distribuição entre MIC e MAC entre os pacientes com doença de Cushing. Hayashi K e cols.¹² descreveram de uma maneira abrangente e meticulosa todos os detalhes sobre os corticotropinomas e eles descobriram que o menor tamanho máximo do diâmetro do tumor; os tumores classificados como MIC e os tumores classificados como Knosp 0 apresentaram maior frequência de mutação somática da USP8. Neste estudo, foi possível verificar que as mutações na região de hotspot do gene USP8 coincide com a literatura, acometendo aproximadamente 30% do corticotropinomas de pacientes com a doença de Cushing, em sua maioria mulheres por volta dos 30 anos. No entanto, a correlação entre a presença das variantes alélicas no tecido tumoral, dados laboratoriais e o tamanho do tumor dos pacientes, se diferem.

Na literatura, quando há mutação no gene, o tamanho do tumor e os níveis de ACTH costumam ser menores quando comparado com corticotropinomas sem as

alterações alélicas, com ressalva em casos pediátricos. Nesse sentido, o estudo revelou que os corticotropinomas que apresentavam variantes alélicas são macroadenomas e os pacientes possuíam níveis de ACTH mais elevados. Quanto aos níveis de cortisol urinário, estes pacientes apresentam níveis mais baixos do que os corticotropinomas sem a alteração alélica, coincidindo com o estudo em pacientes pediátricos.

Em relação a técnica de imunoistoquímica, mostrou-se que não é possível afirmar a presença de mutação no tecido tumoral corticotrófico por meio desta técnica.

A proteína USP8 está presente em ambas localizações dependendo da atividade que esteja realizando, ou seja, se a USP8 estiver atuando na clivagem de uma proteína alvo (atividade UB), sua localização será citoplasmática e exercendo a reciclagem do receptor de membrana EGFR (atividade DUB) estará localizada no núcleo celular. No entanto, sabemos que a presença da mutação no gene aumenta atividade proteolítica da USP8/UBPY (DUB), devendo ser encontrada majoritariamente no núcleo 28.

Dessa forma, os resultados evidenciaram que a técnica não é indicada para apontar a presença da variante alélica, uma vez que nem sempre é possível analisar o tecido no momento em que a proteína está concentrada no núcleo, realizando atividade DUB.

Em relação à remissão da DC, tumores com diâmetros menores apresentam estar relacionados com maiores chances de remissão da doença, bem como a presença da mutação USP8. Não há métodos que garantam a melhora da doença, no entanto o acompanhamento de exames laboratoriais no pós-operatório parece ser uma medida diferencial para a melhora do paciente. Em caso de não remissão do paciente, o uso do tratamento medicamentoso pode auxiliar no controle de uma nova progressão tumoral,

bem como inibir a exposição ao hipercortisolismo no intuito de poupar o paciente, melhorando sua qualidade de vida e diminuindo o risco de mortalidade.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo melhorar a nossa compreensão sobre os pacientes portadores de DC portadores ou não da mutação somática do *USP8*, utilizando uma revisão sistemática de um total de 588 pacientes de 8 séries e comparar com nossa coorte. As principais análises foram sobre a frequência de mutação *USP8* entre pacientes com DC, características clínicas, frequência o procedimento cirúrgico.

Nossos dados, bem como a revisão retrospectiva sobre DC associada ou não a mutação no *USP8*, nos mostram um achado heterogêneo entre as séries publicadas, com várias desvantagens devido à falta de um protocolo sistemático para avaliar esses pacientes. Em conclusão, mais estudos prospectivos multicêntricos em uma força-tarefa trarão informações consistentes sobre a influência do gene *USP8* como principal causa genética da doença de Cushing, em relação à apresentação clínico-radiológica e às taxas de remissão / recorrência.

7. Anexos

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA** “*AValiação proteica e gênica da ubiquitin specific protease 8 em corticotropinomas*”

2. **PESQUISADOR:** Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N°:** CRMSP 67.970

CARGO/FUNÇÃO: Chefe da Unidade de Suprarrenal, Assistente da Unidade de Neuroendocrinologia do HCFMUSP e Professora Colaboradora da Faculdade de Medicina da USP, Endocrinologista do ICESP

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42, Laboratório de Genética Médica LIM 25 da Faculdade de Medicina da USP

3. **AValiação DO RISCO DA PESQUISA:**

Este projeto apresenta risco mínimo para os pacientes envolvidos uma vez que consiste em trabalhar apenas com o material cirúrgico, sem contato direto com os pacientes, visando analisar alterações genéticas nos tecidos estudados.

4. **DURAÇÃO DA PESQUISA:** 2 anos

1 – Você está sendo convidado a participar voluntariamente de um estudo do HCFMUSP, que visa compreender melhor a doença de Cushing. Esta doença é causada por um nódulo presente na hipófise uma glândula que fica no interior do cérebro, que leva ao aumento da produção de um hormônio (substância) chamado ACTH. Este hormônio favorece a produção de cortisol pela glândula que fica em cima dos rins denominada de suprarrenal. Para identificarmos se há uma causa genética relacionada à presença do tumor da hipófise é necessário coletar o nódulo durante a cirurgia e realizar o estudo genético do material biológico retirado.

2 – Iremos investigar o DNA do tumor, pois é nele que estão os genes, unidades que determinam as heranças. Se o tumor possuir alteração genética, verificaremos a correlação do gene alterado com as características doença de Cushing. Utilizando uma técnica laboratorial que aponta a presença ou não de alteração do gene denominado USP 8 poderemos verificar com qual frequência neste grupo de doentes esta alteração ocorre e se ela alguma característica desta doença tem relação com o gene alterado.

3 – Esta técnica recebe o nome de sequenciamento genômico, que conta com os avanços tecnológicos de sequenciar o DNA, onde os genes humanos já conhecidos são analisados de forma que se houver alguma alteração será possível visualizá-la e estudá-la.

4 – Este estudo não irá apresentar desconforto físico, uma vez que analisaremos apenas o tumor coletado. A cirurgia para retirada do tumor não faz parte da pesquisa, a cirurgia é uma abordagem de tratamento previamente discutida com seu médico e já realizada.

5 – Os possíveis benefícios em relação a esse estudo seriam o de encontrar uma relação entre a presença de mutações e a causa da doença, para que a mesma possa ser melhor compreendida.

6 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso ao profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso que pode ser encontrada no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM 42 do Hospital das Clínicas da USP, no endereço: Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 155 - PAMB – 2º andar - bloco 06, Cerqueira Cesar - São Paulo/SP - CEP05403-900 – E-

mail: maria.villares@hc.fm.usp.br – Tel: (11) 26613358 /7512. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Rua Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar - tel: (11) 2661-7585 ou (11) 2661-1548 ou (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

7 – 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.

8 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

9– Você possui o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

10 – Não há nenhuma despesa pessoal 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.

11 – Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa deste gene USP8.

12 – Caso aceite fazer parte deste estudo, você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

13 – O material biológico fresco, obtido na cirurgia, para esta pesquisa esta armazenado no Biorrepositório do LIM 25 (laboratório de investigação medica) de acordo com a resolução 441/2011 e o material conservado em parafina esta armazenado no serviço de Patologia do Hospital das Clinicas e da Faculdade de Medicina de São Paulo. Os tecidos pertencem ao sujeito da pesquisa, permanecendo sua guarda sob a responsabilidade institucional e seu gerenciamento será feito pelo pesquisador responsável.

14 – O sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer benefícios ou prejuízos do seu tratamento nesta Instituição, pode retirar o seu nome do consentimento informado da pesquisa, valendo a desistência a partir da data da formalização desta solicitação.

15 – O prazo de armazenamento de material biológico humano no Biorrepositório será de acordo com o cronograma da pesquisa, sendo que o prazo máximo é de 10 anos.

16 – A Renovação da autorização de armazenamento no Biorrepositório deverá ser solicitada pelo pesquisador responsável à Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) mediante justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o seu material durante o período.

17 – Ao final do período de realização da pesquisa, o material biológico humano armazenado no Biorrepositório poderá ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, mediante aprovação da CAPPesq, ou deverá ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o consentimento informado (TCLE), respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa.

18 – O sujeito da pesquisa deve ser informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório.

19 – Não será solicitado patenteamento e não haverá utilização comercial do material biológico humano armazenado no Biorrepositório.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito deste projeto de pesquisa que eu li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “*AValiação proteica e gênica da UBIQUITIN SPECIFIC PROTEASE 8 EM CORTICOTROPINOMAS*”. Eu discuti com Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoço sobre a minha decisão em

participar nesse estudo. 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 recebimento de qualquer gratificação e que tenho a garantia do acesso ao tratamento hospitalar independente de participar ou não deste estudo. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer hora, antes ou durante o termino do mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido durante o atendimento neste Serviço. Assino este termo de Consentimento em duas vias assinadas pelo pesquisador, uma para mim e outra para o responsável da pesquisa.

_____ Data ____/____/____
Assinatura do paciente ou representante legal

_____ Data ____/____/____
Assinatura da testemunha
(Para casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou com deficiência auditiva ou visual)

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

Candida Villares Fragoso

Profa Dra Maria Candida Barisson Villares Fragoso
Responsável pelo Estudo

Ingrid Quevedo Wanichi
Executor do Estudo

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../..... COR:.....
NOME DO PAI:
NOME DA MÃE:
ENDEREÇO: Nº..... APTO:.....
BAIRRO:..... CIDADE:.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL:.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE:..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº..... APTO:.....
BAIRRO:..... CIDADE:.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

Anexo 1 – Características clínicas da coorte de pacientes com DC avaliados pelo sequenciamento de Sanger

F/M	Idade ao diagnóstico (anos)	Diâmetro máximo do tumor (mm)	Classificação do adenoma	ACTH	Cortisol salivar 00h	Cortisol sérico basal	Cortisol após DST	Cortisol urinário 24h	Status da mutação	Remissão / Recorrência
F	37	12	Macroadenoma	68.5 (< 46pg/mL)	1.9 (<0.13 µg/dL)	28.8 (5 - 25 µg/dL)	24.1 (< 2 µg/dL)	1168 (30 - 300 µg/24h)	p.Pro720Arg	Remissão
F	23	2	Microadenoma	85.5 (< 60 pg/mL)	NA	103.9 (7 - 31 µg/dL)	8.6 (< 2 µg/dL)	2339.5 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	38	31	Macroadenoma	164.6 (< 46pg/mL)	0.68 (<0.13 µg/dL)	32.2 (5 - 25 µg/dL)	19.9 (< 2 µg/dL)	704.9 (50 - 310 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
F	69	14	Macroadenoma	46 (< 46pg/mL)	0.25 (<0.13 µg/dL)	19.3 (5 - 25 µg/dL)	7.0 (< 2 µg/dL)	320 (50 - 310 µg/24h)	p.Ser718Pro	Remissão
F	19	10	Macroadenoma	105.3 (< 60 pg/mL)	354 (<130µg/dL)	27 (7 - 31 µg/dL)	NA	598.3 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
M	11	20	Macroadenoma	96 (< 46pg/mL)	0.62 (<0.12 µg/dL)	24.1 (5 - 25 µg/dL)	21 (< 1.8 µg/dL)	878.25 (50 - 310 µg/24h)	Selvagem	Remissão
M	14	11	Macroadenoma	213 (< 46pg/mL)	0.86 (<0.12 µg/dL)	24.7 (5 - 25 µg/dL)	9.4 (< 1.8 µg/dL)	780 (50 - 310 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	8	8	Microadenoma	58.3 (7.2 - 63.3 pg/mL)	NA	26.1 (6.7 - 22.6 µg/dL)	NA	352.5 (3 - 43 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	30	35	Macroadenoma	46 (< 46pg/mL)	0.52 (<0.12 µg/dL)	19.5 (5 - 25 µg/dL)	16.3 (< 1.8 µg/dL)	578.5 (50 - 310 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
F	13	16	Macroadenoma	42 (< 46pg/mL)	0.81 (<0.12 µg/dL)	29.9 (5 - 25 µg/dL)	22.2 (< 1.8 µg/dL)	700.85 (50 - 310 µg/24h)	p.Ser718Pro	Recorrência
F	26	7	Microadenoma	31 (< 46pg/mL)	0.57 (<0.13 µg/dL)	26.7 (5 - 25 µg/dL)	15 (< 2 µg/dL)	533 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	57	64	Macroadenoma	71.55 (7.2 - 63.3 pg/mL)	NA	13.3 (6.7 - 22.6 µg/dL)	< 1 (< 1.8 µg/dL)	2095 (3 - 43 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
F	45	3	Microadenoma	126 (< 46pg/mL)	1.12 (<0.13 µg/dL)	34 (5 - 25 µg/dL)	NA	571 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
F	33	20	Macroadenoma	644 (< 46pg/mL)	0.24 (<0.13 µg/dL)	24.7 (5 - 25 µg/dL)	14,9 (< 2 µg/dL)	113.17 (10 - 90 µg/24h)	p.Ser718Pro	Recorrência
F	33	6	Microadenoma	NA	NA	52.3 (5 - 20 µg/dL)	NA	NA	Selvagem	Recorrência
M	45	0	Microadenoma	50 (< 46pg/mL)	0.54 (<0.12 µg/dL)	17.5 (5 - 25 µg/dL)	5.4 (< 2 µg/dL)	1543.9 (50 - 310 µg/24h)	p.Ser718Pro	Recorrência
F	22	12	Macroadenoma	146 (< 46pg/mL)	0.24 (<0.12 µg/dL)	23.1 (5 - 25 µg/dL)	NA	517 (50 - 310 µg/24h)	p.Pro720Arg	Remissão
F	25	3	Microadenoma	76 (< 46pg/mL)	0.52 (<0.13 µg/dL)	28.7 (5 - 25 µg/dL)	NA	1208 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
F	49	20	Macroadenoma	98.75 (< 46pg/mL)	1.03 (<0.12 µg/dL)	25.9 (5 - 25 µg/dL)	33 (< 1.8 µg/dL)	395 (50 - 310 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
F	30	7	Microadenoma	56.1 (7.2 - 63.3 pg/mL)	0.43 (<0.12 µg/dL)	25.8 (6.7 - 22.6 µg/dL)	NA	427.3 (3 - 43 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	49	3	Microadenoma	48 (< 46pg/mL)	0.26 (<0.13 µg/dL)	18.3 (5 - 25 µg/dL)	NA	721.5 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
F	41	12	Macroadenoma	74 (< 46pg/mL)	1.33 (<0.13 µg/dL)	31.4 (5 - 25 µg/dL)	NA	529.5 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	41	10	Macroadenoma	72 (< 46pg/mL)	0.23(<0.13 µg/dL)	18.5 (5 - 25 µg/dL)	NA	611.5 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	46	10	Macroadenoma	78.5 (< 46pg/mL)	1.83 (<0.12 µg/dL)	47.5 (5 - 25 µg/dL)	NA	01/05/3384 (50 - 310 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
F	35	13	Macroadenoma	36 (< 60 pg/mL)	NA	21.8 (7 - 31 µg/dL)	NA	662 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	35	45	Macroadenoma	36 (< 60 pg/mL)	NA	17.6 (7 - 31 µg/dL)	NA	666 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	24	14	Macroadenoma	NA	NA	60.7 (5 - 20 µg/dL)	NA	NA	Selvagem	Recorrência

Continua

Anexo 1 – Características clínicas da coorte de pacientes com DC avaliados pelo sequenciamento de Sanger

9,	Idade ao diagnóstico (anos)	Diâmetro máximo do tumor (mm)	Classificação do adenoma	ACTH	Cortisol salivar 00h	Cortisol sérico basal	Cortisol após DST	Cortisol urinário 24h	Status da mutação	Remissão/Recorrência
F	42	7	Microadenoma	81,1 (7.2 - 63.3 pg/mL)	0.25 (<0.12 µg/dL)	16.9 (6.7 - 22.6 µg/dL)	4 (< 1.8 µg/dL)	265.2 (3- 43 µg/24h)	Selvagem	Remissão
M	16	13	Macroadenoma	147 (< 60 pg/mL)	NA	22.6 (7 - 31 µg/dL)	NA	770 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	46	12	Macroadenoma	52 (< 46pg/mL)	0.51 (<0.12 µg/dL)	18.6 (5 - 25 µg/dL)	NA	925 (50 - 310 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	27	9	Microadenoma	51 (< 46pg/mL)	0.26 (<0.12 µg/dL)	14.1 (5 - 25 µg/dL)	NA	664.5 (50 - 310 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	29	7	Microadenoma	69.2 (7.2 - 63.3 pg/mL)	1.21 (<0.12 µg/dL)	24.8 (6.7 - 31 µg/dL)	NA	293.7 (3 - 43 µg/24h)	p.Pro720Gln	Remissão
F	14	16	Macroadenoma	68 (< 46pg/mL)	0.74 (<0.13 µg/dL)	28.8 (5 - 25 µg/dL)	<1 (< 2 µg/dL)	1197.5 (30 - 300 µg/24h)	p.Pro720Gln	Remissão
F	51	8	Microadenoma	78 (< 46pg/mL)	0.74 (<0.12 µg/dL)	34.8 (5 - 25 µg/dL)	NA	562.86 (50 - 310 µg/24h)	p.Ser718Cys	Remissão
F	30	11	Macroadenoma	54 (< 46pg/mL)	0.52 (<0.13 µg/dL)	16.1 (5 - 25 µg/dL)	8.7 (< 2 µg/dL)	379.5 (30 - 300 µg/24h)	p.Pro720Arg	Remissão
F	10	11	Macroadenoma	NA	NA	64.3 (5 - 20 µg/dL)	NA	NA	Selvagem	Remissão
F	36	13	Macroadenoma	34 (< 46pg/mL)	0.13 (<0.13 µg/dL)	38.2 (5 - 25 µg/dL)	1.5 (< 2 µg/dL)	775 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	26	11	Macroadenoma	NA	0.51 (<0.12 µg/dL)	11.7 (6.7 - 22.6 µg/dL)	NA	275.45 (3 - 43 µg/24h)	p.Pro720Arg	Remissão
F	37	11	Macroadenoma	59 (< 46pg/mL)	0.59 (<0.13 µg/dL)	29.7 (5 - 25 µg/dL)	19.5 (< 2 µg/dL)	1005.8 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	29	4.4	Microadenoma	78 (< 46pg/mL)	0.43 (<0.13 µg/dL)	13.1 (5 - 25 µg/dL)	NA	707.5 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	14	7	Microadenoma	105.8 (7.2 a 63.30 pg/mL)	2.80 (<0.12 µg/dL)	40.2 (5 - 25 µg/dL)	NA	1947.8 (50 - 310 µg/24h)	Selvagem	Remissão
F	39	12	Macroadenoma	95.5 (< 46pg/mL)	0.13 (<0.13 µg/dL)	22.8 (5 - 25 µg/dL)	12.1 (< 2 µg/dL)	303 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Remissão
M	32	8	Microadenoma	63.6 (< 46pg/mL)	1.41 (<0.12 µg/dL)	27 (5 - 25 µg/dL)	9.3 (< 2 µg/dL)	4743.13 (50 - 310 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
F	19	23	Macroadenoma	157 (< 46pg/mL)	0.74 (<0.13 µg/dL)	41.9 (5 - 25 µg/dL)	NA	1186.46 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
F	35	10	Macroadenoma	73.5 (< 60 pg/mL)	0.2 (<0.13 µg/dL)	27.9 (7 - 31 µg/dL)	NA	778.3 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
F	37	11	Macroadenoma	113 (< 46pg/mL)	355 (<0.13 µg/dL)	43.2 (5 - 25 µg/dL)	12 (< 1.8 µg/dL)	1189.6 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
M	16	10	Macroadenoma	138.3 (< 60 pg/mL)	NA	29.5 (7 - 31 µg/dL)	7.4 (< 1.8 µg/dL)	1398.6 (30 - 300 µg/24h)	Selvagem	Recorrência
F	43	15	Macroadenoma	570 (7.2 - 63.3 pg/mL)	0.19 (<0.12 µg/dL)	16 (5 - 25 µg/dL)	9.8 (< 1.8 µg/dL)	358 (50 - 310 µg/24h)	p.Pro720Arg	Recorrência
F	23	16	Macroadenoma	90.6 (< 46pg/mL)	0.24 (<0.13 µg/dL)	8.9 (5 - 25 µg/dL)	7.7 (< 2 µg/dL)	388 (30 - 300 µg/24h)	p.Ser718Pro	Recorrência

Abreviações: NA, não avaliado; DST, *dexamethasone supression test*; F, feminino; M, masculino; ACTH, hormônio adrenocorticotrófico.

Continua

#	PRESENÇA DE MUTAÇÃO <i>USP8</i>	IMUNOISTOQUÍMICA
1	p. Pro720Arg	CITOPLASMA E NÚCLEO
2	Ausência de mutação	CITOPLASMA
3	Ausência de mutação	CITOPLASMA
4	p. Ser718Pro	CITOPLASMA
5	Ausência de mutação	CITOPLASMA E NÚCLEO
6	Ausência de mutação	CITOPLASMA
9	Ausência de mutação	CITOPLASMA
10	p. Ser718Pro	CITOPLASMA E NÚCLEO
14	p. Ser718Pro	CITOPLASMA E NÚCLEO
19	Ausência de mutação	CITOPLASMA
24	Ausência de mutação	CITOPLASMA
31	Ausência de mutação	CITOPLASMA E NÚCLEO
36	Ausência de mutação	CITOPLASMA E NÚCLEO
42	Ausência de mutação	CITOPLASMA
44	Ausência de mutação	CITOPLASMA
47	Ausência de mutação	CITOPLASMA E NÚCLEO
7	Ausência de mutação	CITOPLASMA
16	p. Ser718Pro	CITOPLASMA
25	Ausência de mutação	CITOPLASMA E NÚCLEO

27	Ausência de mutação	CITOPLASMA E NÚCLEO
----	---------------------	---------------------

Pituitary

Cushing's disease due to somatic USP8-mutated: a systematic review

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PITU-D-19-00079	
Full Title:	Cushing's disease due to somatic USP8-mutated: a systematic review	
Article Type:	Review	
Keywords:	Microcorticotropinomas; macrocorticotropinomas; ubiquitin specific peptidase 8; systematic review, USP8, Cushing's disease	
Corresponding Author:	Maria Candida Barisson Villares Fragoso, Professor, MD, PhD Universidade de Sao Paulo Hospital das Clinicas Sao Paulo, Sao Paulo BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Sao Paulo Hospital das Clinicas	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Ingrid Quevedo Wanichi	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Ingrid Quevedo Wanichi	
	Beatriz Marinho de Paula Mariani	
	Fernando Pereira Frassetto	
	Sheila Siqueira	
	Nina Musolino	
	Malebranche Berardo Carneiro Cunha-Neto	
	Gilberto Ochman	
	Valter Cescato	
	Marcio Carlos Machado	
	Ericka Trarbach	
	Marcello Delano Bronstein	
	Maria Candida Barisson Villares Fragoso, MD, PhD	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (BR) (001)	ScM Ingrid Quevedo Wanichi

8. Referências

8. REFERÊNCIAS

1. Lindholm J, Juul S, Jorgensen JO, Astrup J, Bjerre P, Feldt-Rasmussen U, et al (2001) Incidence and late prognosis of Cushing's syndrome: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 86(1):117-123.
2. Javanmard P, Duan D, Geer EB (2018) Mortality in patients with endogenous Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am Jun* 47(2):313-333.
3. Dekkers OM, Biermasz NR, Pereira AM, Roelfsema F, van Aken MO, Voormolen JH et al (2007) Mortality in patients treated for Cushing's disease is increased, compared with patients treated for nonfunctional pituitary macroadenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 92(3): 976-981.
4. Machado MC, Alcantara AEF, Pereira ACL, Cescato VAS, Mussolino NRC, Mendonca BB et al (2016) Negative correlation between tumour size and cortisol/ACTH ratios in patients with Cushing's disease harbouring microadenomas or macroadenomas. *J Endocrinol Invest* 39: 1401-1409.
5. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Murad MH, Newell-Price J, Savage MO, et al (2015) Treatment of Cushing's syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100(8):2807-31
6. Bertagna X, Guignat L (2013) Approach to the Cushing's disease patient with persistent/recurrent hypercortisolism after pituitary surgery. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98(7): 1307-1318
7. Feelders RA, Hofland LJ (2013) Medical treatment of Cushing's disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98(2): 425-438
8. Sbiera S, Deutschbein T, Weigand I, Reincke M, Fassnacht M, Allolio B (2015) The new molecular landscape of Cushing's disease. *Trends Endocrinol Metab* 26(10): 573-583
9. Reincke M, Sbiera S, Hayakawa A, Theodoropoulou M, Osswald YS, Beuschlein F et al (2015) Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. *Nat Genet* 47(1): 31-38
10. Perez-Rivas LG, Theodoropoulou M, Francesco F, Nusser C, Kawaguchi, Stratakis CA, et al (2015) The Gene of the Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 100(7): 997-1004.
11. Ma ZY, Song ZJ, Chen JH, Wang YF, Li SQ, Zhou LF, et al (2015) Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease. *Cell Res* 25(3): 306-317
12. Hayashi K, Inoshita N, Kawaguchi K, Ardisasmita AI, Suzuki H, Fukuhara N, et al (2016) The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease. *Eur J Endocrinol* 174(2): 213-276
13. Faucz FR, Tirosch A, Tatsi C, Berthon A, Hernandez-Ramirez LC, Settas N, et al (2017) Somatic USP8 gene mutations are a common cause of pediatric cushing disease. *J Clin Endocrinol* 102(8): 2836-2843
14. Losa M, Mortini P, Pagnano A, Detomas M, Cassarino MF, Giraldi FP (2018) Clinical characteristics and surgical outcome in USP8- mutated human adrenocorticotrophic hormone-secreting pituitary adenomas. *Endocrine* 63: 240-246
15. Albani A, Perez-Rivas LG, Dimopoulou C, Zopp S, Colon- Bolea P, Roeber S, et al (2018) The USP8 mutational status may predict long- term remission in patients with Cushing's disease. *Clin Endocrinol* 89: 454-458
16. Weigand I, Knobloch L, Flitsch J, Saeger W, Monoranu CM, Hofner K, et al (2019) Impact of USP8 gene mutations on protein deregulation in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* First online March 07, 2019
17. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG (2003) Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 327: 557-560
18. Newell-Price J, et al (1998) The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev* 19(5): 647-672.
19. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK (2006) Cushing's syndrome. 367(9522): 1605-1617.
20. Chaidarun SS, Swearingen B, Alexander JM (1998) Differential expression of estrogen receptor- β (ER β) in human pituitary tumors: functional interactions with ER and a tumor- specific splice variant. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 3308-3315

21. Oomizu JH, Takeuchi S, Kaqeya T, Mazue T, Takahashi S (2000) Transforming growth factor- α stimulates proliferation of mammotrophs and corticotrophs in the mouse pituitary. *J Endocrinol* 165: 493-501
22. Knosp E, Steiner E, Kitz K, Matula C (1993) Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery* 33:610-618
23. Katznelson L, Bogan JS, Trob JR et al (1998) Biochemical assessment of Cushing`s disease in patients with corticotroph macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 83(5): 1619-1623
24. Woo YS, Isidori AM, Wat WZ et al (2005) Clinical and biochemical characteristics of adrenocorticotropin- secreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 90(8): 4963-4969
25. Selvais P, Donckier J, Buysschaert M et al (1998) Cushing`s disease: a comparison of pituitary corticotroph microadenomas and macroadenomas. *Eur J Endocrinol* 138(2): 153-159
26. Losa M, Barzaghi RLA, Mortini P et al (2000) Determination of the proliferation and apoptotic index in adrenocorticotropin- secreting pituitary tumors: comparison between micro- and macro-adenomas. *Am J Pathol* 156(1):245-251