Cristina Bellotti Formiga Bueno

**Polimorfismos dos genes dos receptores de
dopamina D2 e de somatostatina subtipos 2 e 5 e
resposta ao tratamento medicamentoso de pacientes
portadores de adenomas hipofisários**

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

Área de concentração: Endocrinologia e Metabologia

Orientadora: Dr^a. Andrea Glezer

Coorientadora: Dr^a. Ericka Barbosa Trarbach

Versão corrigida, Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP.

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bueno, Cristina Bellotti Formiga

Polimorfismos dos genes dos receptores de dopamina D2 e de somatostatina subtipos 2 e 5 e resposta ao tratamento medicamentoso de pacientes portadores de adenomas hipofisários / Cristina Bellotti Formiga Bueno. -- São Paulo, 2016.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Andrea Glezer.

Coorientadora: Ericka Barbosa Trarbach.

Descritores: 1.Neoplasias hipofisárias 2.Prolactinoma 3.Adenoma hipofisário secretor de ACTH 4.Adenoma hipofisário secretor de hormônio de crescimento 5.Acromegalia 6.Polimorfismo genético 7.Receptores de somatostatina 8.Receptores de dopamina D2 9.Agonistas de dopamina

USP/FM/DBD-338/16

O estudo foi realizado no LIM-25 – Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), e na Unidade de Neuroendocrinologia do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio de Projeto Regular (2011/19932-5), da CAPES, por meio de bolsa institucional, e da Federico Foundation.

Dedicatória

Aos meus queridos pais, Galdino e Suely.

Aos meus irmãos, Henrique (em memória) e Fernanda.

Aos meus eternos amores, Bruno e Arthur.

Agradecimientos

Agradeço à minha família, aos meus avós José Bellotti dos Santos e Laura Norma Giacomini Bellotti (em memória) pela torcida, rezas e acolhimento nas situações difíceis. Em especial aos meus pais, Galdino José Sítonio Formiga e Suely Teresa Bellotti Formiga, pela minha formação como pessoa e como médica, e pela perseverança em trilhar os primeiros passos dessa jornada. Ao meu irmão, Henrique Bellotti Formiga (em memória), exemplo de estudante e de integridade, pela ajuda constante nos estudos e que não pôde compartilhar esse momento. À minha irmã, Fernanda Bellotti Formiga, minha metade, minha companheira de todas as horas. À minha sogra Solange Maria Teresa Vaz pelo apoio e amor ao meu filho. Ao meu marido principalmente, Bruno Vaz Kerges Bueno, pelo amor, otimismo e paciência em todos os momentos. Ao meu filho, Arthur Formiga Bueno, amor incondicional que me mostra o que realmente importa na vida e me ensina a ser feliz.

Agradeço à minha orientadora, Dr^a. Andrea Glezer, pelo estímulo, amizade eterna, disponibilidade e por acreditar em mim, e à minha coorientadora, Dr^a. Ericka Barbosa Trarbach, pela paciência, desabafos e conhecimento.

Agradeço aos amigos que fiz nesse período, com quem dividi alegrias e preocupações: Diane Paraíba Belchior, Mariana Guzzo, Ludmilla Malveira, Milena Caccelli, Ane Caroline Thé Bonifácio Freire, Thais Sickler, Beatriz Sant'Anna, Paula Paes, Isabella Pacceti e Paulo Amorim.

Ao Prof. Dr. Marcello Delano Bronstein, responsável pela Unidade de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial por seu incentivo e entusiasmo na minha formação como médica endocrinologista. Agradeço pelo apoio pessoal e profissional. A todos os colegas da Unidade de Neuroendocrinologia do mesmo serviço, Raquel Jallad, Marcio Machado Carvalho, Maria Candida Barisson Vilares Fragoso, Felipe Henning Gaia Duarte.

Aos integrantes do LIM-25 – Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em especial a Maria das Graças, pela coleta do sangue dos pacientes em momentos diversos e fora das suas atividades rotineiras. Agradeço também a Luciana Brito, pela realização das análises hormonais no LIM-42 – Laboratório de Hormônios e Genética Molecular, e às Prof^{as}. Dr^{as}. Berenice Bilharinho Mendonça e Ana Claudia Latronico, titulares da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas de São Paulo, pela oportunidade de ter realizado o doutorado neste serviço.

Agradeço aos integrantes da Unidade de Neurofuncional do Instituto de Psiquiatria da FMUSP: Dr^a. Nina Rosa Musolino, Dr. Malebranche Berardo Cunha Neto, Dr. Rafael Loch e Dr. Fabio Eduardo Fernandes da Silva, pela colaboração e parceria neste projeto.

Agradeço aos pacientes, por sua compreensão e participação neste estudo, sem os quais não teria sido possível realizá-lo.

Agradeço por fim a Deus, pela proteção constante e por ter me cercado de todas essas pessoas.

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Resumo

Summary

1	Introdução.....	1
1.1	Adenomas hipofisários	2
1.1.1	Prolactinomas	2
1.1.2	Somatotrofinomas	5
1.1.3	Corticotrofinomas	7
1.1.4	Adenomas Clinicamente Não Funcionantes	11
1.2	Receptor de dopamina subtipo 2.....	14
1.3	Receptores de somatostatina	18
2	Objetivos.....	23
2.1	Objetivo primário.....	24
2.2	Objetivo secundário	24
3	Métodos	25
3.1	Considerações éticas	26
3.2	Pacientes.....	26
3.2.1	Critérios clínicos de resposta ao tratamento	29
a)	Prolactinomas	29
b)	Somatotrofinomas.....	29
c)	Corticotrofinomas.....	30
d)	Adenomas Clinicamente Não Funcionantes	30
e)	Adenomas hipofisários funcionantes	31

3.3	Análise dos polimorfismos	32
3.3.1	Extração de DNA genômico	35
3.3.2	Genotipagem por PCR em tempo real	35
3.3.3	Genotipagem por sequenciamento automático	38
3.4	Análise estatística	40
4	Resultados.....	42
4.1	Prolactinomas	45
4.2	Somatotrofinomas.....	50
4.3	Corticotrofinomas.....	57
4.4	Adenomas Clinicamente Não Funcionantes.....	59
4.5	Adenomas hipofisários funcionantes tratados com cabergolina.....	64
4.6	Estudo caso/controle	65
a)	Prolactinomas.....	65
b)	Somatotrofinomas	65
c)	Adenomas Clinicamente Não Funcionantes	66
d)	Adenomas hipofisários	67
5	Discussão	69
6	Conclusões.....	76
7	Anexos	78
8	Referências.....	99

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC:	Adenilciclase
ACNF:	Adenoma clinicamente não funcionante
ACTH:	Hormônio adrenocorticotrópico
AD:	Agonista dopaminérgico
AIP:	<i>Aryl hydrocarbon receptor interacting protein</i>
AMPC:	Adenosina 3',5' monofosfato cíclico
Arg:	Arginina
BRC:	Bromocriptina
Ca:	Cálcio
CAB:	Cabergolina
CAPES:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAPPesq:	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CRH:	Hormônio liberador de corticotrofina
DAG:	Diacylglicerol
DC:	Doença de Cushing
DL:	Desequilíbrio de ligação
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotideo
DP:	Desvio padrão
DRD1:	Receptor de dopamina subtipo 1
DRD2:	Receptor de dopamina subtipo 2

DRD2:	Gene do receptor de dopamina subtipo 2
DRD2L:	Receptor de dopamina subtipo 2 isoforma longa
DRD2S:	Receptor de dopamina subtipo 2 isoforma curta
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F:	Cortisol
FDR:	<i>False Discovery Rate</i>
FMUSP:	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSH:	Hormônio folículo estimulante
Fu:	Cortisol urinário
G0:	Proteína G estimulatória
GH:	Hormônio de crescimento
Gi:	Proteína G inibitória
GMPc:	Monofosfato cíclico de guanosina
GnRH:	Hormônio liberador de gonadotrofina
Gq:	Subtipo q da subunidade da proteína G α
HCFMUSP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HR:	<i>Hazard ratio</i>
HW:	Hardy-Weinberg
IC:	Intervalo de confiança
IGF-1:	Fator do crescimento semelhante à insulina tipo 1
IP3:	Inositol trifosfato
K:	Potássio
LH:	Hormônio luteinizante
LRS:	Ligante do Receptor de Somatostatina

MAF:	Frequência do alelo raro
MAPK:	Proteína quinase ativada por mitógenos
MGB:	<i>Minor groove binding</i>
MAC:	Macroadenoma
MIC:	Microadenoma
n:	Amostra
OD:	<i>Odds ratio</i>
OCT:	Octreotida
OCT-LAR:	Octreotida de liberação lenta
<i>p53</i> :	Gene p53
Pb:	Pares de base
PCR:	Reação em cadeia da polimerase
PI3K:	Fosfoinositol 3 quinase
PKA:	Proteína quinase A
PKC:	Proteína quinase C
PRL:	Prolactina
PLC:	Fosfolipase C
RDT:	Radioterapia
REV:	Reverso
RM:	Ressonância magnética
RNA:	Ácido ribonucléico
RNA _m :	Ácido ribonucleico mensageiro
RPM:	Rotações por minuto
SNP:	Polimorfismo de base única

SSTR:	Receptor de somatostatina
SSTR1:	Receptor de somatostatina subtipo 1
SSTR2:	Receptor de somatostatina subtipo 2
<i>SSTR2</i> :	Gene do receptor de somatostatina subtipo 2
SSTR2a:	Receptor de somatostatina subtipo 2 isoforma longa
SSTR2b:	Receptor de somatostatina subtipo 2 isoforma curta
SSTR3:	Receptor de somatostatina subtipo 3
SSTR4:	Receptor de somatostatina subtipo 4
SSTR5:	Receptor de somatostatina subtipo 5
<i>SSTR5</i> :	Gene do receptor de somatostatina subtipo 5
T4:	Tetraiodotironina
TC:	Tomografia computadorizada
TCLE:	Termo de consentimento livre e esclarecido
Tm:	Temperatura de Melting
Trp:	Triptofano
TSH:	Hormônio de liberação da tireotropina
TTGO:	Teste de tolerância à sobrecarga oral de glicose
ULNR:	<i>Upper limit normal range</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

=	Igual a
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
µl	Microlitro
L	Litro
M	Mol
mcg	Micrograma
mcg/24h	Micrograma em 24 horas
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimol
ng	Nanograma
ng/mL	Nanograma por mililitro
pmol	Picomol
UI/mL	Unidades internacionais por mililitro
U	Unidade
↑	Aumento
↓	Redução

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema representativo do DRD2 e suas vias de sinalização intracelular.....	15
Figura 2.	Esquema representativo do SSTR2 e SSTR5 e suas vias de sinalização intracelular	19
Figura 3.	Representação esquemática dos genes <i>DRD2</i> (a), <i>SSTR2</i> (b) e <i>SSTR5</i> (c) e localização aproximada de cada polimorfismo avaliado neste estudo	34
Figura 4.	Representação esquemática da genotipagem utilizando o sistema <i>TaqMan</i> ®.	36
Figura 5.	Genotipagem por PCR em tempo real utilizando <i>TaqMan</i> ®.	37
Figura 6.	Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos do gene <i>DRD2</i> em pacientes com prolactinoma determinado por (a) D' e (b) r^2 ...	49
Figura 7.	Fluxograma de tratamento dos pacientes com acromegalia	51
Figura 8.	Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos do gene <i>DRD2</i> em pacientes com somatotrofinoma determinado por (a) D' e (b) r^2	55
Figura 9.	Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos do gene <i>SSTR2</i> em pacientes com somatotrofinoma determinado por (a) D' e (b) r^2	56
Figura 10.	Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos do gene <i>SSTR5</i> em pacientes com somatotrofinoma determinado por (a) D' e (b) r^2	56

Figura 11. Resposta ao tratamento com cabergolina em pacientes com corticotrofinomas	58
Figura 12. Comportamento do volume tumoral de 35 pacientes com adenoma clinicamente não funcionante ao longo do tratamento com cabergolina	61
Figura 13. Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos do gene <i>DRD2</i> em pacientes com adenoma clinicamente não funcionante determinado por (a) D' e (b) r^2	62
Figura 14. Curva de Kaplan-Meier da progressão tumoral em adenoma clinicamente não funcionante em função do rs6275 no gene <i>DRD2</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros laboratoriais e de imagem utilizados na definição de resposta ao tratamento clínico dos adenomas hipofisários	13
Tabela 2. Polimorfismos no gene <i>DRD2</i> (ENST00000362072) e estudos funcionais	17
Tabela 3. Características clínicas, de imagem, histopatológicas e moleculares (<i>SSTR2</i> e <i>SSTR5</i>) relacionadas à resposta ao tratamento com os ligantes do receptor de somatostatina.	20
Tabela 4. Polimorfismos nos genes <i>SSTR2</i> (ENST00000315332) e <i>SSTR5</i> (ENST00000397547) e estudos funcionais.....	22
Tabela 5. Casuística de pacientes com adenomas hipofisários, classificados de acordo com o subtipo tumoral e submetidos ao tratamento clínico	27
Tabela 6. Polimorfismos dos genes <i>DRD2</i> (ENST00000362072), <i>SSTR2</i> (ENST00000315332) e <i>SSTR5</i> (ENST00000397547) avaliados no estudo.....	33
Tabela 7. Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação de polimorfismos nos genes <i>DRD2</i> e <i>SSTR5</i>	38
Tabela 8. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de <i>DRD2</i> , <i>SSTR2</i> e <i>SSTR5</i> nos pacientes com adenomas hipofisários e no grupo controle.....	43
Tabela 9. Análise das características clínicas, laboratoriais e resposta ao tratamento com cabergolina dos pacientes portadores de prolactinoma de acordo com o tamanho tumoral (microprolactinomas e macroprolactinomas)	46

Tabela 10. Correlação entre os critérios hormonal e de redução tumoral, no tratamento com cabergolina, em pacientes com prolactinoma.....	47
Tabela 11. Correlação das características clínicas, laboratoriais e de imagem dos pacientes portadores de prolactinoma, entre os casos sensíveis e resistentes ao tratamento com cabergolina, considerando os critérios hormonal e de redução tumoral	48
Tabela 12. Análise dos polimorfismos do gene <i>DRD2</i> e sua associação com as características clínicas, laboratoriais e resposta ao tratamento com CAB em pacientes com prolactinoma (anexo D) .	49
Tabela 13. Controle hormonal em pacientes com somatotrofinomas em tratamento clínico	54
Tabela 14. Características clínicas dos pacientes com corticotrofinomas tratados com cabergolina	58
Tabela 15. Correlação entre características clínicas e laboratoriais dos pacientes com corticotrofinoma e resposta ao tratamento com cabergolina.....	59
Tabela 16. Descrição das características histopatológicas tumorais, clínicas e de imagem dos pacientes com adenoma clinicamente não funcionante tratados com cabergolina.....	60
Tabela 17. Características clínicas dos pacientes portadores de adenoma clinicamente não funcionante, classificados de acordo com a resposta à cabergolina: estável/redução (sensíveis) ou progressão tumoral (resistência)	62
Tabela 18. Análise dos polimorfismos do gene <i>DRD2</i> e sua associação com as características clínicas, de imagem e resposta ao tratamento com cabergolina em pacientes com adenomas clinicamente não funcionantes (Anexo H)	63

Tabela 19. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de <i>SSTR5</i> em pacientes com somatotrofinoma e grupo controle (Anexo K) ..	66
Tabela 20. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos no gene <i>DRD2</i> nos pacientes com adenoma clinicamente não funcionante e grupo controle (Anexo J).....	66
Tabela 21. Análise de haplótipos no gene <i>DRD2</i> de acordo com a frequência genotípica de adenoma clinicamente não funcionante e grupo controle	67
Tabela 22. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de <i>DRD2</i> no grupo com adenomas hipofisários (prolactinoma, somatotrofinomas, corticotrofinomas e adenoma clinicamente não funcionantes) e grupo controle (Anexo J).....	68

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Aprovação da comissão de ética para análise de projetos de pesquisa	79
Anexo B. Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos pacientes e grupo controle com adenomas hipofisários	80
Anexo C. Questionário aplicado a indivíduos doadores de sangue provenientes da Fundação Pró-Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	88
Anexo D. Análise dos polimorfismos do gene <i>DRD2</i> e sua associação com as características clínicas, laboratoriais e resposta ao tratamento com cabergolina em pacientes com prolactinoma.....	89
Anexo E. Análise dos polimorfismos do gene <i>DRD2</i> e sua associação com as características clínicas, laboratoriais e resposta ao tratamento clínico em pacientes com somatotrofinoma.....	90
Anexo F. Análise dos polimorfismos do gene <i>SSTR2</i> e sua associação com as características clínicas, laboratoriais e resposta ao tratamento clínico em pacientes com somatotrofinoma.....	92
Anexo G. Análise dos polimorfismos do gene <i>SSTR5</i> e sua associação com as características clínicas, laboratoriais e resposta ao tratamento clínico em pacientes com somatotrofinoma.....	93
Anexo H. Análise dos polimorfismos do gene <i>DRD2</i> e sua associação com as características clínicas, de imagem e resposta ao tratamento com cabergolina em pacientes com adenoma clinicamente não funcionante	95
Anexo I. Análise dos polimorfismos do gene <i>DRD2</i> e sua associação com a resposta ao tratamento com cabergolina em pacientes com adenoma hipofisário funcional (prolactinomas, somatotrofinomas e corticotrofinomas).....	96

Anexo J.	Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de <i>DRD2</i> no grupo com adenomas hipofisários (prolactinomas, somatotrofinomas, corticotrofinomas e adenomas clinicamente não funcionantes) e grupo controle	97
Anexo K.	Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de <i>SSTR2</i> e <i>SSTR5</i> nos pacientes com somatotrofinomas e grupo controle	98

Resumo

RESUMO

Bueno CBF. *Polimorfismos dos genes dos receptores de dopamina D2 e de somatostatina subtipos 2 e 5 e resposta ao tratamento medicamentoso de pacientes portadores de adenomas hipofisários* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016. 113p.

Os adenomas hipofisários podem ser tratados clinicamente com agonistas dopaminérgicos (AD) e/ou ligantes dos receptores de somatostatina (LRS). Alguns estudos apontam para o papel de polimorfismos dos genes *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* na eficácia desses tratamentos clínicos. O objetivo do estudo foi avaliar o papel dos polimorfismos no gene *DRD2* em pacientes com prolactinomas (n=118), corticotrofinomas (n=15), adenomas clinicamente não funcionantes (ACNF) (n=35) e somatotrofinomas (n=40), bem como de polimorfismos nos genes *SSTR2* e *SSTR5* em pacientes com somatotrofinomas (n=88), na resposta ao tratamento clínico com AD e LRS. Adicionalmente, comparar a frequência desses polimorfismos em pacientes portadores de adenomas hipofisários, de diferentes naturezas, a indivíduos saudáveis. Os polimorfismos foram genotipados por PCR em tempo real (sistema *TaqMan*) e seqüenciamento automático (método Sanger). Todos os genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em nosso estudo, não houve correlação entre os polimorfismos de *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* e a resposta ao tratamento clínico, com cabergolina (CAB) e/ou octreotida-LAR (OCT-LAR) respectivamente, em pacientes com prolactinomas, somatotrofinomas e corticotrofinomas. Nossos dados estão de acordo com estudos prévios em acromegálicos, no entanto não confirmaram associação de polimorfismo de *DRD2* (rs6275) com resistência à CAB, anteriormente descrita em prolactinomas. Adicionalmente, os polimorfismos rs1800497 (alelo T) e rs1076560 (alelo A) de *DRD2* foram correlacionados a macroadenomas, este último fator preditivo de resistência à CAB em prolactinomas. Quanto aos ACNF, nossos dados são inéditos e o polimorfismo rs6275 (alelo T) de *DRD2* se correlacionou à progressão tumoral nos casos tratados com CAB. Comparando os adenomas hipofisários com indivíduos saudáveis, a presença do alelo raro A de rs1079597 de *DRD2* foi inversamente associada à frequência de ACNF, enquanto que nos outros tipos tumorais não houve diferença. Em conclusão, os polimorfismos rs1079597 e rs6275 de *DRD2* podem estar associados à tumorigênese e à resposta a CAB, no grupo ACNF respectivamente. Outros estudos ainda são necessários para definir o papel das variantes genéticas desses genes como um mecanismo envolvido na resistência aos AD e LRS e na tumorigênese hipofisária.

Descritores: 1.Neoplasias hipofisárias 2.Prolactinoma 3.Adenoma hipofisário secretor de ACTH 4.Adenoma hipofisário secretor de hormônio de crescimento 5.Acromegalia 6.Polimorfismo genético 7.Receptores de somatostatina 8.Receptores de dopamina D2 9.Agonistas de dopamina

Summary

SUMMARY

Bueno CBF. *The influence of dopamine receptor type 2 and somatostatin receptors type 2 and 5 polymorphisms in medical treatment of pituitary adenomas* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016. 113p.

Medical treatment of pituitary adenomas is mainly performed with dopamine agonist (DA) and/or somatostatin ligand receptor (SLR) drugs. In addition to dopamine receptor 2 (*DRD2*) and somatostatin receptors 2 and 5 (*SSTR2* and *SSTR5*) tumor density, results of some studies pointed to the role of polymorphisms in the efficacy of clinical treatment. One of the goals of this study was to evaluate the association between *DRD2* polymorphisms in patients with prolactinomas (n=118), corticotrophinomas (n=15), clinically nonfunctioning pituitary adenomas (CNFPA) (n=35) and somatotrophinoma (n=101) and polymorphisms in *SSTR2* and *SSTR5*, only in the last group; and response to treatment with DA and/or SLR. Another objective was to evaluate the frequency of polymorphisms in patients with different types of pituitary adenomas and compare them to healthy subjects. Polymorphisms were genotyped by real-time PCR (*TaqMan* system) and Sanger sequencing. All genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium. In patients with prolactinomas, somatotrophinomas and corticotrophinomas there was no association between genetic variants in *DRD2* and response to treatment, like data in literature. However, an association between rs6275 (allele T) in *DRD2* and CAB resistance in prolactinomas has been proposed. In addition, there was an association between rs1800497 (allele T) and rs1076560 (allele A) in *DRD2* and macroprolactinomas, this one predictive factor related to CAB resistance. The presence of rs6275 (allele T) in *DRD2* was correlated with tumoral progression in CNFPA treated with CAB, never published previously. Comparing pituitary adenomas and health subjects, the presence of rs1079597 (allele A) was inversely associated with the frequency of CNFPA, otherwise there was no association for others pituitary adenomas. In conclusion, rs1079597 and rs6275 *DRD2* polymorphisms might have an influence in tumorigenesis and CAB efficacy in patients with CNFPA, respectively. However, the results in the literature are conflicting and more studies are necessary to determine the role of these genetic variants like a mechanism involving in dopamine and somatostatin resistance and pituitary tumorigenesis.

Descriptors: 1.Pituitary neoplasms 2.Prolactinoma 3.ACTH-secreting pituitary adenoma 4.Growth Hormone-Secreting Pituitary Adenoma 5.Acromegaly 6.Polymorphism genetic 7.Somatostatin receptor 8.Receptors dopamine D2 9.Dopamine agonists

1 Introdução

1.1 Adenomas hipofisários

Os adenomas hipofisários correspondem a 15% de todas as neoplasias intracranianas ⁽¹⁾ e podem ser classificados quanto às dimensões em microadenomas, macroadenomas ou adenomas gigantes, quando o maior diâmetro tumoral medir, respectivamente, menos de 1,0 centímetro (cm), de 1,0 cm a 4,0 cm, e mais de 4,0 cm. Adicionalmente, podem ser divididos de acordo com o perfil hormonal em adenomas clinicamente não funcionantes (ACNF) e funcionantes. Estes últimos, por sua vez, podem ser secretores de prolactina (PRL) ou prolactinomas, secretores de hormônio de crescimento (GH) ou somatotrofinomas, secretores de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) ou corticotrofinomas, e mais raramente, secretores de hormônio tireotrófico (TSH) ou secretores de gonadotrofinas ⁽²⁾.

1.1.1 Prolactinomas

Os prolactinomas são os adenomas hipofisários mais frequentes, com prevalência de 100 casos por milhão ⁽³⁾. Os microadenomas representam 90% dos casos em mulheres com menos de 50 anos, no entanto, em adolescentes e em indivíduos do sexo masculino, a frequência de tumores maiores e mais invasivos torna-se mais significativa.

O quadro clínico específico, decorrente da hiperprolactinemia, compreende hipogonadismo hipogonadotrófico secundário principalmente à redução na pulsatilidade do GnRH ⁽⁴⁾, bem como a galactorréia.

Os objetivos do tratamento destes adenomas são a normalização das concentrações de PRL, com recuperação do eixo gonadotrófico, e resolução da galactorréia, bem como a redução das dimensões tumorais.

O uso de agonistas dopaminérgicos (AD) é a terapêutica de escolha. No Brasil, há disponíveis a bromocriptina (BRC), antagonista e agonista dos receptores dopaminérgicos tipo 1 (DRD1) e 2 (DRD2), respectivamente, e a cabergolina (CAB), agonista com afinidade seletiva ao DRD2 ⁽³⁾. A normalização da PRL ocorre em 80% a 90% dos microprolactinomas e em 70% dos macroprolactinomas com o uso da BRC, além de haver restauração da função gonadal e redução do volume tumoral ^(5, 6). A CAB é uma droga mais eficaz, promovendo normalização nos níveis de PRL em 92% e 77% dos pacientes com microprolactinoma e macroprolactinoma, respectivamente ⁽⁷⁾. Além disso, a CAB é capaz de promover redução tumoral de mais de 20% do volume inicial em 80% dos casos ^(8, 9). Os efeitos colaterais mais comuns dos AD são náuseas (30%), vômitos (20%), hipotensão postural (25%) e vasoconstrição digital (30%). Distúrbios psiquiátricos, incluindo psicose, também foram descritos. A intolerância à medicação ocorre em cerca de 12% dos casos ⁽¹⁰⁾.

Apesar da grande eficácia dos AD, 10% a 20% dos pacientes com prolactinomas apresentam algum grau de resistência, sendo gênero masculino ^(11, 12), macroadenoma ⁽¹³⁾ e invasividade tumoral ^(14, 15) fatores relacionados à falha do tratamento clínico. Na literatura, há divergência quanto à definição de resistência: alguns autores a definem como ausência de normalização da PRL sérica ⁽¹⁶⁾ e de redução tumoral superior a 50% ⁽¹⁷⁾, em

vigência do tratamento com BRC na dose de 15 mg a 30 mg por dia por, no mínimo, três meses ⁽¹⁸⁾. Sabe-se, porém, que uma resposta adicional ao tratamento clínico pode ser obtida a longo prazo, em especial com o uso de CAB. Para a CAB, também não há uniformidade na definição de resistência. Delgrange et al. (2009) classificaram casos de macroprolactinoma, de acordo com os níveis séricos de PRL e a dose máxima de CAB utilizada: resistentes foram definidos pela não normalização dos níveis séricos de PRL com doses de CAB acima de 3,0 mg por semana, por pelo menos 12 meses ⁽¹⁹⁾.

Além de eficaz, o tratamento clínico pode levar à remissão da hiperprolactinemia, com manutenção de normoprolactinemia após a suspensão da medicação em 21% dos microprolactinomas e em 16% dos macroprolactinomas ⁽²⁰⁾.

O tratamento cirúrgico está indicado em microprolactinomas bem circunscritos e quando há preferência do paciente a essa abordagem, na presença de resistência e/ou intolerância aos AD, deficiência visual persistente, a despeito do tratamento clínico, apoplexia com sintomas neurológicos e fístula líquórica ou tração do quiasma óptico, quando ocorre redução tumoral importante em macroprolactinomas sensíveis aos AD. Em pacientes parcialmente resistentes aos AD, a cirurgia, com o intuito de remoção parcial, é uma estratégia terapêutica interessante na tentativa de controle da hiperprolactinemia com a reintrodução de AD no pós-operatório ^(21, 22).

Nos casos de tumores agressivos e/ou invasivos, em que não houve controle dos níveis de PRL e das dimensões tumorais com o uso de AD e de mais de um procedimento cirúrgico, a radioterapia (RDT) para controle de crescimento tumoral pode ser indicada ⁽²³⁾.

1.1.2 Somatotrofinomas

Os tumores produtores de GH, ou somatotrofinomas, são a principal causa de acromegalia e representam 20% dos adenomas hipofisários, com prevalência de 70 casos por milhão ⁽²⁴⁾. A acromegalia ocorre com igual frequência em homens e mulheres, sendo mais comum entre a quarta e a quinta décadas de vida. Cerca de 77% dos casos são macroadenomas ⁽²⁵⁾. O quadro clínico é insidioso, caracterizado por aumento das extremidades, e a doença ativa aumenta a mortalidade, principalmente por doenças cardiovasculares. A avaliação laboratorial com níveis de GH sérico randômico maiores que 0,4 ng/mL e nível sérico do fator do crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) acima do limite superior para a idade, apontam para o diagnóstico de acromegalia ⁽²⁶⁾. Se houver dúvida diagnóstica, procede-se ao teste de tolerância à glicose oral (TTGO) e nos pacientes com acromegalia em atividade não há supressão da concentração de GH abaixo de 1,0 ng/mL ⁽²⁷⁾. Com metodologias mais sensíveis para determinação do nível sérico de GH, alguns autores sugerem o nível de 0,4 ng/mL como corte para supressão ⁽²⁸⁾. O tratamento da acromegalia tem por objetivo reduzir a morbimortalidade, decorrente da massa tumoral e da hipersecreção hormonal, bem como preservar a função hipofisária normal. Características da massa tumoral e níveis séricos de GH e IGF-1 são os principais determinantes na escolha do tratamento. A cirurgia é o tratamento de escolha em pacientes com microadenomas intrasselares, macroadenomas não invasivos e na presença de sintomas compressivos. Cerca de 80% dos pacientes com microadenomas e 50% com macroadenomas apresentam normalização dos níveis séricos de IGF-1 após adenomectomia transesfenoidal ^(29, 30).

O tratamento clínico, primário ou adjuvante, pode ser realizado com agonista dopaminérgico, ligantes do receptor de somatostatina (LRS) ou antagonista do receptor de GH. O tratamento clínico está indicado para pacientes com macroadenoma e baixa possibilidade de remissão com cirurgia, especialmente por invasão parasselar, para aqueles com comorbidades que dificultem a abordagem cirúrgica e para os que recusam a cirurgia ⁽³¹⁾.

Os objetivos do tratamento incluem redução tumoral e controle hormonal. A maioria dos estudos de eficácia considerava doença controlada na presença de nível sérico de GH randômico menor que 2,5 ng/mL ou normalização dos níveis plasmáticos do IGF-1 para idade ⁽²⁶⁾. No entanto, atualmente, com respeito ao nível de GH sérico, considera-se doença controlada na presença de valores abaixo de 1,0 ng/mL ⁽³²⁾, e nadir do GH após TTGO menor que 0,4 ng/mL em pacientes no pós-operatório ^(27, 33).

Os LRS, octreotida e lanreotida, apresentam meia-vida maior que a somatostatina nativa, porém afinidade mais seletiva aos subtipos de receptores de somatostatina 2 (SSTR2), em especial, e 5 (SSTR5). Compilando-se os dados da literatura com o uso de LRS, tanto para terapia primária quanto para secundária, houve normalização dos níveis de GH (<2,5 ng/mL), de IGF-1 e redução tumoral (de 10% a 30% do volume) em 56%, 55% e 66% dos pacientes, respectivamente. O uso de LRS de longa ação como terapia primária normaliza os níveis séricos de GH em torno de 64% dos pacientes ⁽³⁴⁾.

Ainda que de menor eficácia, os AD têm sido utilizados no tratamento da acromegalia. Com o uso de CAB, houve redução nos níveis de GH sérico para menos de 2,5 ng/mL e normalização dos níveis de IGF-1 em cerca de 30% dos pacientes ^(35, 36). De maior eficácia é a associação entre LRS e AD, com a qual

se obteve normalização dos níveis de IGF-1 após adição de CAB em 52% a 56% dos casos ^(37, 38). Os fatores prognósticos relacionados à resposta à CAB foram níveis séricos de GH discretamente elevados e IGF-1 abaixo de duas vezes o limite superior do método ⁽³⁸⁾.

O pegvisomanto, antagonista do receptor do GH, normalizou os níveis de IGF-1 em 67% (dose média de 17,2 mg por dia) em monoterapia ⁽³⁹⁾ e em 97%, quando em combinação com LRS (dose média de 11,4 mg por dia) ⁽⁴⁰⁾. Apesar da grande eficácia no controle hormonal, esta medicação não atua sob as células tumorais e não é capaz de levar à redução tumoral.

Em casos com baixa probabilidade de remissão com a cirurgia e que não apresentem controle hormonal com o tratamento medicamentoso, a citorredução tumoral cirúrgica (*debulking*), com reintrodução de LRS no pós-operatório, é uma estratégia interessante na presença de resposta parcial, havendo normalização do GH em 31% a 69% dos casos e normalização do IGF-1 em 42% a 89% dos casos ^(41, 42).

A RDT é reservada para pacientes com doença persistente após cirurgia ou recorrência tumoral que apresentem resistência e/ou intolerância ao tratamento medicamentoso.

1.1.3 Corticotrofinomas

O adenoma hipofisário produtor de ACTH, ou corticotrofinoma, representa 15% dos adenomas hipofisários e é a causa mais frequente de síndrome de Cushing endógena, denominado de doença de Cushing (DC) ⁽⁴³⁾. A taxa de

mortalidade da síndrome de Cushing sem tratamento é cinco vezes maior que a da população geral ⁽⁴⁴⁾. Há diversos sinais e sintomas que compõem o quadro clínico, sendo a presença de estrias violáceas (maiores que 1,0 cm), equimoses, pletora e fraqueza muscular proximal os mais específicos da doença ⁽⁴⁵⁾. Diversos testes baseados nas características fisiológicas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal têm sido utilizados para confirmar o diagnóstico da síndrome de Cushing, porém nenhum deles, até o momento, mostrou-se totalmente capaz de diagnosticar todos os casos ⁽⁴⁶⁾. Três testes diagnósticos de primeira linha são atualmente empregados para a confirmação de hipercortisolismo: 1) a medida do cortisol (F) livre em urina de 24 horas; 2) supressão do F sérico, após 1,0 mg de dexametasona; e 3) a avaliação do ritmo circadiano do F, usando a dosagem do F sérico e/ou salivar entre 23 horas e 24 horas ⁽⁴⁴⁾.

Frente à confirmação laboratorial do hipercortisolismo ACTH dependente, segue-se a investigação quanto à sua possível etiologia, por meio de testes dinâmicos (supressão com dexametasona 8,0 mg e teste com CRH), exames de imagem da região selar e, eventualmente, da realização de cateterismo bilateral e simultâneo de seios petrosos inferiores ⁽⁴⁴⁾.

O tratamento de escolha da DC é a remoção cirúrgica do adenoma hipofisário produtor de ACTH. As terapias adicionais são necessárias se houver falência do tratamento primário ou na impossibilidade do tratamento cirúrgico ⁽⁴⁷⁾.

Com relação ao tratamento medicamentoso da DC, há três modalidades de drogas, classificadas de acordo com seu mecanismo de ação: 1) inibidores da esteroidogênese adrenal (mitotane, cetoconazol, metopirona e etomidato);

2) ação direta no tumor hipofisário ou inibidores da secreção de ACTH (CAB, pasireotida); e 3) bloqueador do receptor de cortisol (mifepristona).

Lamberts et al. (1980) observaram redução do nível sérico de ACTH em 30% a 70%, entre 4 horas e 6 horas após o uso de 2,5 mg de BRC ⁽⁴⁸⁾. Com altas doses de BRC (40mg/dia), há descrições de maior percentual de resposta clínica, mas com rara eficácia a longo prazo ^(49, 50). Pivonello et al. (2004) demonstraram haver correlação entre a expressão do DRD2, positiva em cerca de 83% das amostras tumorais, e a normalização do Fu de 24 horas em 40% dos pacientes com DC que não haviam apresentado remissão no pós-operatório ⁽⁵¹⁾. A expressão de DRD2 em corticotrofinomas foi confirmada posteriormente por De Bruin et al. (2009) ⁽⁵²⁾.

Esses dados estimularam a realização de novos estudos avaliando eficácia da CAB no tratamento da DC. Pivonello et al. (2009) avaliaram 20 pacientes com DC sem remissão após tratamento cirúrgico, tratados com CAB (até 7,0 mg por semana). Após três meses, 10 pacientes apresentaram normalização da cortisolúria e cinco pacientes apresentaram resposta parcial (queda de 25% da cortisolúria) ⁽⁵³⁾. Entre os 15 pacientes responsivos, cinco apresentaram escape em até 18 meses. Após 24 meses, 40% dos pacientes (oito pacientes em 20) mantiveram cortisolúria em níveis normais e 20% desses apresentaram diminuição do volume tumoral maior que 25% ⁽⁵³⁾. Godbout et al. (2010) avaliaram a resposta a longo prazo (entre 12 e 60 meses) do uso da CAB, em doses de até 6,0 mg semanais, em 30 pacientes com DC: em 13% houve resposta parcial com três a seis meses de tratamento, definida como cortisol urinário até 25% do limite superior do normal, e em 36% houve resposta completa com normalização da cortisolúria. Após mediana de 37 meses de tratamento, 30% dos pacientes

evoluíram com resposta completa com uma dose média de CAB de 2,1 mg por semana ⁽⁵⁴⁾. Os mecanismos envolvidos na perda de resposta da CAB ainda não foram determinados. Acredita-se que a *down-regulation* de receptores ou, ainda, mecanismos de desensibilização pós-receptor (taquifilaxia) possam estar envolvidos. Vilar et al. (2010) avaliaram a eficácia da CAB, em doses tituladas em até 3,0 mg por semana, por seis meses, em 12 pacientes com DC persistente após tratamento cirúrgico, e houve normalização da cortisolúria em três casos (25%) ⁽⁵⁵⁾. Barbot et al. (2014) avaliaram seis pacientes com DC persistente após cirurgia, tratados com CAB, por seis meses, com titulação de dose de CAB de até 3,0 mg por semana: um paciente apresentou resposta parcial, definida como redução do cortisol urinário em mais de 30%, e dois pacientes (33%) apresentaram normalização da cortisolúria ⁽⁵⁶⁾.

Os LRS de primeira geração apresentam resultados limitados no tratamento da DC, uma vez que há o predomínio da expressão do SSTR5 e menor expressão do SSTR2 pelo hipercortisolismo ⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾. Após os resultados de estudo de fase III ⁽⁶⁰⁾, a pasireotida, um análogo multiligante, foi liberada para o tratamento de DC sem remissão após a cirurgia, ou, quando esta não é possível, tanto na Europa quanto nos Estados Unidos. Nesse estudo, houve normalização dos níveis de cortisol urinário, em seis meses (dose de 900 mcg duas vezes ao dia), em 26% de 162 pacientes.

A adrenalectomia bilateral é uma opção em casos resistentes à cirurgia e ao tratamento farmacológico. Apresenta eficácia no controle do hipercortisolismo, porém associa-se a dependência à terapia de reposição hormonal adrenal, ao risco de insuficiência adrenal ou, ainda, à possibilidade de crescimento do corticotrofinoma ⁽⁶¹⁾.

A RDT é reservada para pacientes com doença persistente após cirurgia que apresentem resistência ao tratamento medicamentoso. Em estudo de revisão, observou-se taxa de remissão de 64% dos casos em 17 meses de seguimento ⁽⁶²⁾.

1.1.4 Adenomas Clinicamente Não Funcionantes

Os ACNF constituem um terço de todos os adenomas hipofisários ⁽⁶³⁾. Por não haver hipersecreção hormonal, o diagnóstico é mais frequente em macroadenomas, quando há sintomas relacionados ao efeito de massa, tais como alterações visuais (67,8%), cefaleia (41,4%) e hipopituitarismo (43,3%) ⁽⁶⁴⁾. O diagnóstico também pode ser realizado incidentalmente, em exames de imagem, como tomografia computadorizada (TC) e RM. A avaliação dos eixos hipofisários é de fundamental importância para definir o tumor como clinicamente não funcionante e para investigar o hipopituitarismo. A indicação do tratamento depende, fundamentalmente, da presença de comprometimento visual, além de hipopituitarismo, invasibilidade, tamanho e velocidade de crescimento tumoral. Portadores de microadenomas podem ser simplesmente acompanhados ⁽⁶⁵⁾.

A cirurgia é o tratamento primário indicado para os macroadenomas com deficiência visual, crescimento tumoral e, de maneira ponderada, considerando risco de apoplexia (8% dos casos) ⁽⁶³⁾. A RDT, indicada como adjuvante à cirurgia, demonstra eficácia em prevenir o crescimento tumoral ⁽⁶³⁾.

O tratamento clínico para esses tumores ainda é controverso. Pivonello et al. (2004) demonstraram a expressão de DRD2 em 67% de 18 casos de

ACNF. Com o uso da CAB em nove destes pacientes, portadores de remanescente tumoral após a cirurgia, houve redução significativa (maior que 25% do volume inicial) em 56% dos pacientes, na dose de 3,0 mg por semana, por um ano; fato correlacionado à expressão do RNA mensageiro do DRD2 ⁽⁶⁶⁾. Em outros estudos, com o uso de CAB após a cirurgia por mais de seis meses, houve estabilidade ou redução tumoral (10% do volume inicial) em aproximadamente 50% dos casos ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾. Recentemente, alguns autores relataram redução do volume tumoral (acima de 25%) em 21%, estabilidade em 72%, e progressão tumoral em 7% de 74 pacientes com ACNF tratados com CAB (dose até 3,5mg por semana), enquanto que no grupo controle observou-se redução tumoral em 5%, estabilidade em 79%, e progressão em 16% dos casos. Os pacientes foram acompanhados por 24 meses e houve diferença entre os grupos quanto à redução ($P<0.01$) e à progressão tumoral ($P=0,02$) ⁽⁷⁰⁾.

Os receptores de somatostatina também estão expressos nos ACNF, principalmente o subtipo SSTR3, seguido pelo SSTR2 ^(71, 72). Andersen et al. (2001) demonstraram que o tratamento combinado de octreotida e CAB, por seis meses, promoveu redução tumoral significativa (maior que 10% do volume) em 60% de 10 pacientes avaliados ⁽⁷³⁾. Colao et al. (2003) observaram que a associação de lanreotida e CAB promoveu redução média de 2,0 cm³ dos remanescentes tumorais ⁽⁷⁴⁾. Devido à falta de dados publicados de estudos controlados, o tratamento clínico para os ACNFs ainda é um tema controverso ⁽⁷⁵⁾.

A Tabela 1 resume os parâmetros utilizados para definir resposta ao tratamento clínico, dos diferentes subtipos de adenomas hipofisários, bem como a taxa de sucesso obtida em estudos publicados e indexados.

Tabela 1. Parâmetros laboratoriais e de imagem utilizados na definição de resposta ao tratamento clínico dos adenomas hipofisários

Subtipo tumoral	Parâmetros de resposta	Droga	Controle hormonal	Parâmetro de redução tumoral	Droga	Redução tumoral
Prolactinoma	PRL normal	CAB	77%-92% ⁽⁷⁾	> 20%*	CAB	80% ^(8, 9)
Somatotrofinoma	GH < 1 ng/mL e IGF-1 normal para idade	LRS	65% com GH <2,5 ng/mL e 63% com IGF-1 normal ^(76, 77)	-		
		CAB	30% com GH < 2ng/mL e IGF-1 normal ^(35, 36)			
		LRS+CAB	52% a 56% IGF-1 normal ^(37, 38)			
Corticotrofinoma	Fu normal	CAB	25% a 40% ⁽⁵²⁻⁵⁵⁾	-		
ACNF	-	-	-	> 25%*	CAB	21%-56% ^(63, 66, 67, 70)
				> 10%*		47%-53% ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾
				> 2mm**		38% ^(68, 78)

(*) Volume tumoral; (**) Maior diâmetro tumoral na ressonância magnética da região selar; ACNF – adenoma clinicamente não funcionante; CAB – cabergolina; Fu – cortisol urinário de 24 horas; GH – hormônio de crescimento; IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; LRS – ligante do receptor de somatostatina; mm – milímetros; PRL – prolactina. Entre parênteses estão citadas as respectivas referências dos estudos.

1.2 Receptor de dopamina subtipo 2

A dopamina, por meio do receptor subtipo 2 (DRD2), regula inúmeras funções fisiológicas, entre elas a síntese e a liberação de PRL. O gene que codifica esse receptor está localizado no cromossomo 11, região 11q23.2, sendo composto por oito éxons. O DRD2 é membro da superfamília de receptores acoplados à proteína G, que, uma vez ativado, aciona a proteína G inibitória, reduzindo os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) e de cálcio intracelulares ⁽⁷⁹⁾ (Figura 1).

Consequentemente, após a ativação do receptor em lactotrófos, normais ou tumorais, ocorre redução da síntese e da secreção da PRL, redução da proliferação celular e aumento da apoptose. O *splicing* alternativo do éxon seis do *DRD2* gera as isoformas curta (DRD2S) e longa (DRD2L) do receptor, diferindo entre si por uma sequência de 29 aminoácidos. Ambas as isoformas são coexpressas no mesmo tipo celular e exibem propriedades farmacológicas e sinalizadoras similares. No entanto, a isoforma curta foi correlacionada a menores níveis de AMPc, sugerindo maior efetividade na ligação à proteína G inibitória ⁽⁸⁰⁾.

AC – adenilciclase; AMPc – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; Ca^{2+} – cálcio; G0 – proteína G estimulatória; Gi – proteína G inibitória; MAPK – proteína quinase de ativação mitogênica; K+ – potássio. Adaptado de Filopanti et al. (2010) ⁽⁸¹⁾.

Figura 1. Esquema representativo do DRD2 e suas vias de sinalização intracelular

O uso de agonistas do DRD2 é amplamente utilizado em diversas doenças neurológicas, incluindo doença de Parkinson, esquizofrenia e dependência química ⁽⁸²⁾. Nos prolactinomas, é o tratamento de escolha por sua alta eficácia e tolerabilidade. O principal mecanismo de resistência aos AD é a redução da expressão do DRD2 nas células tumorais ⁽⁸³⁾. Alguns autores apontam também para menor expressão da isoforma curta ^(84, 85). Outros mecanismos relacionados à resistência aos AD são defeitos pós-receptor ⁽⁸⁶⁾ e menor expressão da filamina (proteína de ancoragem) ⁽⁸⁷⁾.

Adicionalmente, estudos avaliaram o papel de diferentes polimorfismos de base única do gene *DRD2*, ou próximo a ele, na resistência ao AD. A presença de rs1800497 (alelo C), no gene da ankirina localizado 3' *downstream*

ao *DRD2* e de rs1076560 (alelo C) estavam em forte desequilíbrio de ligação (DL) nos portadores de microadenoma em um grupo de 203 pacientes com prolactinomas ⁽⁸⁸⁾. A associação entre esses alelos e o maior número de sítios de ligação do *DRD2*, descrita em amostras de núcleo caudado ⁽⁸⁹⁾, reforçam a maior frequência de polimorfismos em microprolactinomas, frequentemente mais responsivos ao tratamento com CAB. Esses mesmos autores demonstraram associação entre rs6275 (alelo T) e resistência à CAB, considerando como critérios a ausência de normalização da PRL, com doses da medicação maiores que 3,0 mg por semana, bem como a ausência de redução tumoral, considerada como diferença menor que 30% no maior diâmetro. Por fim, houve maior frequência do haplótipo composto por rs1800497 (alelo C), rs1079597 (alelo G), rs6275 (alelo C) e rs1076560 (alelo G) nos pacientes que normalizaram os níveis séricos de PRL com CAB (34,5% contra 11,3% e $P=0,021$) ⁽⁸⁸⁾. Hansen et al. (2005) avaliaram 21 pacientes com hiperprolactinemia (sete com prolactinoma) e encontraram associação entre rs6275 (alelo T) e maiores níveis séricos de PRL ⁽⁹⁰⁾. Estudo funcional com esse polimorfismo sugere que tal variante não influencia a estabilidade do RNA mensageiro in vitro ⁽⁹¹⁾. Além disso, estudos em populações psiquiátricas foram controversos, havendo associação do alelo T com o uso de álcool ⁽⁹²⁾ e ausência de correlação com a presença de esquizofrenia ⁽⁹³⁾.

Ilhan et al. (2015) não encontraram associação entre o polimorfismo rs1800497 e responsividade ao tratamento com CAB em pacientes com prolactinoma ⁽⁹⁴⁾. Os resultados dos estudos funcionais com as variantes alélicas também são controversos: há descrição de associação do alelo T com menor densidade de *DRD2* em núcleo estriado ⁽⁹⁵⁻⁹⁹⁾, enquanto que não houve diferença em outro estudo ⁽¹⁰⁰⁾.

A variante polimórfica do *DRD2*, rs1799732, situada na região promotora parecem ter também consequência funcional no receptor. Estudo *in vitro* têm relacionado esse polimorfismo à maior densidade do DRD2⁽⁹⁶⁾ (Tabela 2).

Tabela 2. Polimorfismos no gene *DRD2* (ENST00000362072) e estudos funcionais

Nomenclatura ^{&}	rs ID	Maior / Menor alelos	Tipo	Troca proteína	Consequência funcional
p.Glu713Lys	rs1800497	C/T	Missense (<i>ANKK1</i>)	Glutamina por Lisina	T: ↓ligação ao receptor em núcleos caudado e estriado ¹ (95-99, 101, 102) T: ausência de associação com menor ligação em núcleo caudado em esquizofrênicos ¹ (100)
c.-31-882G>A	rs1079597	G/A (REV)	Intrônicas	Não	A: ↓densidade do receptor no núcleo estriado ¹ (96) A: ausência de associação com menor ligação em núcleo caudado esquizofrênicos ¹ (100)
c.939T>C	rs6275	C/T	Silenciosa	Não	T: não interfere na estabilidade do RNAm ² (91)
c.811-83G>T	rs1076560	C/A	Intrônicas	Não	C: ↑ expressão do DRD2S no cérebro ¹ (103-105)
c.-486_-485insC	rs1799732	C/- (REV)	Regulatória	Não	-insC: ↑ da densidade de DRD2 em indivíduos saudáveis ¹ (96)

([&])Nomenclatura oficial (*Human Genome Variation Society*(<http://www.hgvs.org/mutnomen/>));rs ID – identificação oficial do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>); (¹) Estudos *in vivo* utilizando ligantes marcados para o DRD2; (²) Estudo com células transfectadas *in vitro*; AMPc – adenosina 3',5' monofosfato cíclico; ANKK1 – gene da ankirina; DRD2S – isoforma curta do receptor de dopamina subtipo 2; REV – reverso; RNAm – ácido ribonucleico mensageiro; ↑ - aumento; ↓ redução

1.3 Receptores de somatostatina

Os receptores de somatostatina (SSTR), também pertencentes à superfamília de receptores acoplados a proteínas G, são classificados em cinco diferentes subtipos: SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 e SSTR5. A somatostatina nativa possui afinidade a todos os subtipos de SSTR, enquanto que ligantes do receptor de somatostatina (LRS) de primeira geração (octreotida e lanreotida) ligam-se preferencialmente ao SSTR2, com menor afinidade ao SSTR5 e afinidade quase nula ao SSTR1 e SSTR4 ⁽¹⁰⁶⁾. O análogo multiligante (pasireotida) apresenta maior afinidade aos receptores de somatostatina em comparação ao octreotida, em especial ao SSTR5, o que representa importância no tratamento atual da DC ^(107, 108).

O gene que codifica o SSTR2 é constituído por dois éxons, enquanto que, o gene do SSTR5 contém apenas um éxon. Esses genes estão localizados nos cromossomos 17 (17q24) e 16 (16p13.3), respectivamente. O SSTR2 apresenta duas isoformas, longa (SSTR2a) e curta (SSTR2b), derivadas por *splicing* alternativo. Quanto à sua função, o SSTR2 induz apoptose por mecanismos independentes do gene *p53*, além de inibir a secreção de GH ⁽¹⁰⁹⁾. O SSTR5 também está relacionado à diminuição da proliferação celular e à inibição da secreção de GH (110) (Figura 2).

Receptores SSTR2 e SSTR5 acoplados à proteína G inibitória (Gi) inibem a adenil ciclase e reduz o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). SSTR2 via fosfoinositol 3 quinase (PI3K) inibe a proliferação celular. SSTR5 inibe a monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) ativando a via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) inibindo a proliferação celular. ➔ Efeito estimulatório; ┐ Efeito inibitório; DAG – diacilglicerol; G0 – proteína G estimulatória; Gq – subtipo da subunidade da proteína G α ; IP3 – inositol 3 fosfato; PKA – proteína quinase A; PKC – proteína quinase C; PLC – fosfolipase C. Adaptado de Theodoropoulou et al. (2013) ⁽¹¹⁰⁾.

Figura 2. Esquema representativo do SSTR2 e SSTR5 e suas vias de sinalização intracelular

Em relação aos pacientes portadores de adenomas produtores de GH, cerca de 45% não apresentam controle hormonal com o uso do LRS (111). Algumas características clínicas, de imagem, histopatológicas e moleculares

relacionadas à resposta ao tratamento com LRS em somatotrofinomas estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Características clínicas, de imagem, histopatológicas e moleculares (*SSTR2* e *SSTR5*) relacionadas à resposta ao tratamento com os ligantes do receptor de somatostatina.

Característica	Determinante	Descrição
Clínica	Sexo	Mulheres apresentam <i>up-regulation</i> do <i>SSTR2</i> secundário ao estrogênio ⁽¹¹²⁾
	Idade	Jovens apresentam tumores mais agressivos ⁽¹¹²⁾
Imagem	Tamanho tumoral	Macroadenomas e presença de invasividade reduzem a chance de resposta aos LRS ⁽³¹⁾
	Intensidade na RM	Hiperintensidade em T2 sugere adenoma esparsamente granuloso na imunohistoquímica e resistência aos LRS ⁽¹¹³⁾
Histopatologia	Granulação	Adenomas esparsamente granulados apresentam resistência aos LRS ⁽¹¹⁴⁾
	Expressão <i>SSTR2</i>	Expressão do <i>SSTR2</i> (avaliado pelo RNAm e níveis protéicos) se correlacionou positivamente à resposta aos LRS ^(112, 115)
Molecular	Mutação do <i>SSTR5</i> (Arg240Trp)	Presença da mutação gerou perda da inibição do GH e aumento da proliferação celular com o tratamento com octreotida ⁽¹¹⁶⁾
	<i>SSTR5</i> TMD4 e <i>SSTR5</i> TMD5	Isoformas truncadas se correlacionam a redução da resposta ao octreotida em somatotrofinomas ⁽¹¹⁷⁾
	rs169068 e rs3751830	Polimorfismos associados à resistência aos LRS ⁽¹¹⁸⁾
	Mutação gene AIP	Mutações familiares ou esporádicas predizem resposta não favorável ao tratamento com LRS ⁽¹¹²⁾
SSTR	Dessensibilização	Descrição de pequeno papel na resposta aos LRS ⁽¹¹⁹⁾
	Expressão heterogênea	Redução da densidade do SSTR pode explicar alta proporção dos pacientes parcialmente resistentes aos LRS ⁽¹²⁰⁾

AIP - *aryl hydrocarbon receptor interacting protein*; Arg – arginina; LRS – ligante do receptor de somatostatina; RM – ressonância magnética; RNAm – ácido ribonucleico mensageiro; *SSTR2* – receptor de somatostatina subtipo 2; *SSTR5* – receptor de somatostatina subtipo 5; Trp - triptofano. Adaptado de Cuevas-Ramos et al. (2014) ⁽¹⁰⁸⁾.

O papel dos polimorfismos dos genes *SSTR2* e *SSTR5* na resposta ao tratamento com LRS em pacientes acromegálicos foi avaliado em dois estudos ^(118, 121). Ciganoka et al. (2011) avaliaram o papel dos polimorfismos do *SSTR5* na resposta ao tratamento medicamentoso em 46 pacientes acromegálicos. Os autores observaram maior frequência do polimorfismo rs169068 (alelo C) nos pacientes, quando comparados a 475 indivíduos normais, pareados por sexo e idade. Adicionalmente, o alelo de risco T para o polimorfismo rs34037914 estava ausente no grupo de pacientes que apresentaram redução tumoral, e a presença do mesmo alelo esteve associada ao maior número de procedimentos cirúrgicos ao longo do tratamento ⁽¹²¹⁾.

Em outro estudo, polimorfismos do gene *SSTR5* foram avaliados em 66 pacientes acromegálicos, e houve associação entre rs169068 (alelo C) e níveis basais menores de IGF-1. Na avaliação de haplótipos, observaram a associação entre a presença de rs169068 (alelo C) e homozigose para o alelo C do polimorfismo rs3751830, e níveis séricos basais menores de GH. Não houve associação dos polimorfismos com resposta ao tratamento com LRS e com a expressão de *SSTR2* e *SSTR5*, avaliada por imunohistoquímica, em 10 amostras tumorais da mesma casuística ⁽¹¹⁸⁾. A perda da heterozigosidade no gene do *SSTR5* na presença do alelo T de rs169068 já havia sido descrita em uma amostra tumoral de 10 pacientes com tireotrofinoma e somatotrofinoma, e correlacionada com agressividade tumoral ⁽¹²²⁾.

As características dos polimorfismos de *SSTR2* e *SSTR5* e as prováveis consequências funcionais de acordo com estudos *in vitro*, quando disponíveis, estão resumidas na Tabela 4.

Tabela 4. Polimorfismos nos genes *SSTR2* (ENST00000315332) e *SSTR5* (ENST00000397547) e estudos funcionais

Nomenclatura ^{&}	rs ID	Maior / Menor Alelos	Tipo	Troca proteína	Consequência funcional
Gene <i>SSTR2</i>					
c.-92-49C>G	rs1466113	G/C	Intrônica	Não	C: ↓ transcrição de <i>SSTR2</i> carcinoma de pâncreas ⁽¹²³⁾
c.-92-75A>G	rs998571	T/C (REV)	Intrônica	Não	C: sem efeito na transcrição de <i>SSTR2</i> carcinoma de pâncreas ⁽¹²³⁾
Gene <i>SSTR5</i>					
c.-27-436C>T	rs3751830	C/T	Regulatória	Não	ND
p.Pro109Ser	rs4988487	C/T	Missense	Prolina por Serina	ND
p.Pro335Leu	rs169068	C/T	Missense	Prolina por Leucina	T/T: ↑ proliferação celular T/T: ↓ inibição proliferação celular por análogo <i>SSTR5</i> em cultura de células tumorais ⁽¹²⁴⁾
c.1044A>G	rs642249	G/A	Silenciosa	Não	ND

([&])Nomenclatura oficial (*Human Genome Variation Society*) (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>); rs ID – identificação oficial do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>); ND – não descrita; REV – reverso; ↑ - aumento; ↓ - redução

Os resultados das análises sobre a influência dos polimorfismos dos genes *DRD2* na resposta ao tratamento com AD, e dos genes *SSTR2* e *SSTR5* na resposta ao tratamento com LRS em pacientes com tumores hipofisários ainda são escassos e inconclusivos, sendo necessários estudos adicionais. Dessa forma, a avaliação de uma grande coorte de pacientes com prolactinomas e somatotrofinas, além da inclusão de corticotrofinomas e ACNF, sem descrição prévia, faz-se necessária para o estudo de associação e causalidade para polimorfismos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo primário

Associação dos polimorfismos nos genes *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* à resposta ao tratamento com CAB e OCT-LAR em pacientes portadores de adenomas hipofisários (prolactinomas, somatotrofinomas, corticotrofinomas e ACNF).

2.2 Objetivo secundário

Avaliar as frequências dos polimorfismos nos genes *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* em pacientes com prolactinomas, somatotrofinomas, corticotrofinomas e ACNF e compará-las a um grupo controle.

3 Métodos

3.1 Considerações éticas

Este projeto 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 (HCFMUSP) (processo nº0770/11) (Anexo A) e foi realizado cumprindo-se os princípios éticos pertinentes aos estudos em seres humanos. Os indivíduos foram incluídos no estudo após seu consentimento, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B).

3.2 Pacientes

A coorte deste estudo foi composta por pacientes portadores de adenomas hipofisários, acompanhados na Unidade de Neuroendocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP): 148 casos de prolactinomas, 142 casos de corticotrofinomas, 165 casos de somatotrofinomas e 70 pacientes com ACNF, dos quais 56 acompanhados pela Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os pacientes foram analisados separadamente, de acordo com o subtipo tumoral. Além disso, pacientes com prolactinomas, somatotrofinomas e

corticotrofinomas foram incluídos em um mesmo grupo de adenomas funcionantes, avaliados do ponto de vista hormonal para resposta ao tratamento com CAB. Finalmente, um sexto grupo de pacientes foi composto de portadores de quaisquer subtipos tumorais (prolactinoma, somatotrofinoma, corticotrofinoma e ACNFs), com o intuito de comparar as freqüências das variantes genéticas entre o grupo portadores de adenoma hipofisários e o grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5. Casuística de pacientes com adenomas hipofisários, classificados de acordo com o subtipo tumoral e submetidos ao tratamento clínico

Grupos	Total (n)	Avaliados quanto à resposta ao tratamento clínico
		(n)
Prolactinoma	148	118
Somatotrofinoma	165	101
Corticotrofinoma	142	15
ACNF	70	35
Adenomas hipofisários	525*	169**

(*) Grupo total comparado com indivíduos saudáveis; (**) Grupo composto por adenomas funcionantes (prolactinomas, somatotrofinomas e corticotrofinomas) tratados com CAB. ACNF – adenoma clinicamente não funcionante; n – amostra.

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão, clínicos e laboratoriais, para portador de cada subtipo de adenomas de hipófise:

- 1) Prolactinoma: hiperprolactinemia sem outra causa identificada com lesão hipofisária sugestiva de adenoma;

- 2) Acromegalia: quadro clínico sugestivo, associado ao GH basal acima de 0,4 ng/mL, GH não supressível ao TTGO (GH > 1,0 ng/mL) e/ou IGF-1 elevado para idade, com lesão hipofisária;
- 3) Doença de Cushing: quadro clínico sugestivo, associado ao hipercortisolismo dependente de ACTH, com imagem hipofisária sugestiva de tumor hipofisário e/ou cateterismo de seios petrosos com gradiente centro-periferia compatível com a doença central;
- 4) ACNF: adenoma de hipófise confirmado por anatomopatológico, após procedimento cirúrgico, ausência de hipersecreção hormonal ou discreta hiperprolactinemia.

Os pacientes submetidos à RDT, antes ou durante o tratamento clínico, foram excluídos da análise de resposta ao tratamento medicamentoso.

A partir do prontuário médico foram coletados, retrospectivamente, dados relativos à idade no momento da coleta (atual), idade ao diagnóstico, gênero, níveis séricos de PRL, GH, IGF-1, ACTH e níveis urinários de cortisol ao diagnóstico, tamanho tumoral, evolução pós-operatória, quando pertinente, além da resposta ao tratamento clínico, quando indicado.

O grupo controle inicialmente foi composto por 394 indivíduos provenientes da Fundação Pró-Sangue do Hospital das Clínicas da FMUSP, avaliados através de entrevista clínica que contemplava as principais queixas relacionadas a doenças hipofisárias (Anexo C), bem como da avaliação laboratorial com dosagens de PRL, TSH, T4 livre, LH, FSH, estradiol, testosterona total e livre, GH e IGF-1, gentilmente realizadas no LIM-42 – Laboratório de Hormônios e Genética Molecular do HCFMUSP. Desses, 45

indivíduos foram excluídos por alteração hormonal. O grupo controle foi composto, então, por 349 indivíduos (243 homens e 106 mulheres; média da idade 36 ± 11 anos), submetidos à coleta de sangue periférico para a extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico e avaliação da frequência dos polimorfismos dos genes *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5*.

3.2.1 Critérios clínicos de resposta ao tratamento

a) Prolactinomas

Há um amplo espectro de respostas ao tratamento de prolactinomas com AD, não havendo uniformidade na literatura médica quanto à sua definição (19, 125, 126). Os pacientes do estudo foram classificados como sensíveis por dois critérios: 1) hormonal, quando da normalização dos níveis séricos de PRL com dose menor ou igual a 3,0 mg por semana de CAB, utilizada por no mínimo seis meses; e 2) tumoral, quando da redução tumoral em ao menos 30% do maior diâmetro, nas mesmas condições de tratamento clínico, tal como proposto por Filopanti et al. (2008) ⁽⁸⁸⁾.

Pacientes que foram submetidos ao tratamento clínico com CAB, antes e depois de tratamento cirúrgico, foram classificados em sensíveis ou resistentes, de acordo com os resultados do pré-operatório.

b) Somatotrofinomas

Os pacientes com acromegalia foram submetidos ao tratamento clínico primário e/ou secundário após o tratamento cirúrgico. Nos somatotrofinomas, o tratamento medicamentoso foi instituído com octreotida LAR (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 1,5 mg por semana por três meses, atingindo a dose máxima de 3,5 mg por semana nos casos não controlados.

A eficácia ao tratamento medicamentoso com LRS e/ou AD foi determinada por dois parâmetros: 1) dosagem de GH abaixo de 1,0 ng/mL; e 2) IGF-1 dentro dos valores normais ajustados para a idade. Os pacientes foram avaliados de acordo com cada critério isoladamente e a associação dos dois parâmetros. Foram considerados sensíveis os pacientes que atingiram ao menos um desses dois critérios laboratoriais. Os pacientes que foram submetidos ao tratamento clínico antes e depois de tratamento cirúrgico foram classificados em sensíveis ou resistentes, de acordo com os resultados do pré-operatório.

c) Corticotrofinomas

O tratamento com CAB foi utilizado em pacientes com corticotrofinoma que não apresentaram controle da doença após um ou mais procedimentos cirúrgicos. A eficácia ao tratamento clínico foi definida pela normalização dos níveis de Fu em 24 horas, após seis meses do uso de CAB, com doses de 1,0 mg a 3,5 mg por semana.

d) Adenomas Clinicamente Não Funcionantes

Pacientes portadores de ACNF que apresentavam remanescentes tumorais ao menos seis meses do procedimento cirúrgico foram tratados com CAB, de 1,5 mg a 3,5 mg por semana, por no mínimo seis meses, e avaliados

por meio de exame de RM da região selar em seis, 12, 18 e 24 meses, sempre pelo mesmo radiologista, Dr. Fabio Eduardo Fernandes da Silva, da Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria da FMUSP. Foram classificados em respondedores, para os casos em que houve redução do volume tumoral acima de 25% ou estabilidade tumoral, e não respondedores, para aqueles em que houve aumento do volume tumoral em ao menos 25% do valor inicial ⁽⁷⁰⁾.

e) Adenomas hipofisários funcionantes

Pacientes portadores de prolactinomas (118), somatotrofinomas (36) e corticotrofinomas (15) foram agrupados como adenomas hipofisários funcionantes a fim de avaliarmos a correlação entre os polimorfismos do gene *DRD2* e a resposta hormonal a CAB. Os critérios de resposta a CAB forma específicos para cada subtipo tumoral: normalização dos níveis séricos de PRL com doses menores que 3,5 mg por semana para prolactinomas; níveis séricos de GH menores que 1,0 ng/mL e níveis séricos normais para faixa etária de IGF-1 para somatotrofinomas; e normalização do Fu 24 horas para corticotrofinomas. Dos portadores de somatotrofinomas submetidos ao tratamento com CAB, quatro apresentavam controle de GH antes do início do tratamento e não foram incluídos nesta avaliação.

3.3 Análise dos polimorfismos

Os polimorfismos foram referidos pelo seu número de identificação (rs ID) do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) e escolhidos de acordo com a “estratégia do polimorfismo candidato”, em que poucos polimorfismos de interesse funcional previamente estudados são selecionados para o estudo ⁽¹²⁷⁾, e de acordo com polimorfismos já descritos na literatura ^(118, 121). O estudo do polimorfismo rs1799732, inédito em pacientes com prolactinomas e situado na região promotora de *DRD2*, baseou-se na presença de estudo funcional, demonstrando que a ausência da inserção do alelo C estava relacionada à maior densidade de *DRD2* no núcleo estriado de voluntários normais ⁽⁹⁶⁾, bem como à maior frequência do alelo raro em pacientes esquizofrênicos ⁽¹²⁸⁾. Foram excluídos os polimorfismos com frequência do alelo raro (MAF) menor que 5%.

A genotipagem dos polimorfismos rs1079597, rs1076560, rs1800497 e rs6275, no gene *DRD2* (cromossomo 11), rs998571 e rs1466113, no gene *SSTR2* (cromossomo 17), e rs3751830 e rs4988487, no gene *SSTR5* (cromossomo 16), foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando o sistema *TaqMan*[®] (*Applied Biosystems*). Para os polimorfismos rs1799732, no gene *DRD2*, rs169068 e rs642249, no gene *SSTR5*, não foi possível customizar ensaio de detecção, pois na região estão presentes outros polimorfismos muito próximos aos de interesse. Assim, tais polimorfismos foram avaliados por PCR seguidos de sequenciamento automático (Tabela 6).

Tabela 6. Polimorfismos dos genes *DRD2* (ENST00000362072), *SSTR2* (ENST00000315332) e *SSTR5* (ENST00000397547) avaliados no estudo

Gene	Cromossomo	rs ID	Alelos	MAF* (%)	Ensaio <i>TaqMan</i> ®
<i>DRD2</i>	11q23.2	rs1799732	C/- (REV)	24	**
		rs1800497	C/T	29	C___7486676_10
		rs1079597	G/A (REV)	23	C___2278884_10
		rs1076560	C/A	19	C___2278888_10
		rs6275	C/T	47	C___2601173_20
<i>SSTR2</i>	17q25.1	rs998571	T/C	25	C___2167503_10
		rs1466113	G/C	30	C___2167504_10
<i>SSTR5</i>	16p13.3	rs3751830	C/T	26	C__27476900_10
		rs4988487	C/T	8	C__25472926_20
		rs169068	C/T	48	**
		rs642249	G/A	6	**

(*)MAF – frequência do alelo raro; (**)Polimorfismos avaliados por sequenciamento automático; REV – reverso; rs ID – identificação oficial do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)

A Figura 3 apresenta a localização esquemática de cada um dos polimorfismos avaliados e de seus respectivos *loci*.

Figura 3. Representação esquemática dos genes *DRD2* (a), *SSTR2* (b) e *SSTR5* (c) e localização aproximada de cada polimorfismo avaliado neste estudo

3.3.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído utilizando-se o método *salting out*, a partir de 10 mL de sangue periférico coletado em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ⁽¹²⁹⁾. A concentração do DNA nas amostras foi medida por leitura em espectrofotômetro, sendo assegurada a boa qualidade das amostras pela razão 260/280 ~1.8 e a razão 260/230 entre 1,8 e 2,2.

3.3.2 Genotipagem por PCR em tempo real

Na genotipagem por PCR em tempo real foram utilizados ensaios comerciais do tipo *TaqMan*®. Cada ensaio consiste em duas sondas marcadas com fluoróforos, cada uma específica para um dos alelos (tipo selvagem ou mutante), e oligonucleotídeos que flanqueiam a região polimórfica. A molécula fluorescente repórter (FAM™ ou VIC®) está fixada na extremidade 5' da sonda, enquanto que na extremidade 3' estão presentes uma molécula MGB (*minor groove binding*) e um composto *quencher*, capaz de inibir a fluorescência do repórter (Figura 4). O MGB aumenta a temperatura de *melting* (T_m) do *primer* sem a necessidade de aumentar o tamanho da sonda; dessa forma, sondas pequenas com a diferença de apenas um par de bases apresentam uma grande diferença na T_m, permitindo a discriminação alélica mais acurada.

Durante a reação de PCR, a sonda é degradada pela ação exonucleásica 5'3' da polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente, causando a liberação do sinal (Figura 4). Como cada sonda é marcada com uma fluorescência diferente, é possível determinar o genótipo da amostra pela leitura da fluorescência emitida (Figura 5).

A sonda só emite o sinal fluorescente após ser anelada e clivada durante a reação de PCR. DNA – ácido desoxirribonucléico; MGB – *minor groove binding*. Adaptado do protocolo *TaqMan Genotyping*, disponível em <http://www.appliedbiosystems.com.br>

Figura 4. Representação esquemática da genotipagem utilizando o sistema *TaqMan®*.

Para as reações de PCR em tempo real foram utilizados 3 µL de master Mix Taqman (2X), 0,125 µL *TaqMan SNP Genotyping Assay* (40X), 5 ng de DNA extraído dos indivíduos do estudo e 2 µL de água ultrapura. As amostras foram amplificadas em equipamento *Step One Plus™* (*Applied Biosystems Inc.*, Foster City, CA, EUA) de acordo com o protocolo a seguir: 95°C/10 minutos (ativação enzimática) seguidos de 40 ciclos a 95°C /15 segundos (denaturação) e 60°C/ 1 minuto (anelamento/ extensão). Os ensaios *TaqMan* utilizados para cada polimorfismo avaliado estão descritos na Tabela 6. A discriminação e a plotagem dos genótipos foram realizadas pelo *Step One™ Software* versão

2.2.2 (*Applied Biosystems Inc.*, Foster City, CA, EUA). Todos os genótipos foram verificados pela visualização dos sinais fluorescentes nos gráficos da curva de amplificação, o que também permitiu a identificação de muitos genótipos classificados como indeterminados pelo programa (Figura 5). Em torno de 20% das amostras foram checadas por seqüenciamento automático com 100% de correlação.

(a) Curva de amplificação de um genótipo heterozigoto; (b) Gráfico de discriminação alélica, onde o círculo azul representa o homozigoto para o alelo 2, o círculo vermelho representa o homozigoto para o alelo 1 e o círculo verde representa o heterozigoto 1/2; X, genótipo não determinado; quadrado, controle negativo. ΔRn – delta de fluorescência

Figura 5. Genotipagem por PCR em tempo real utilizando *TaqMan*®.

3.3.3 Genotipagem por sequenciamento automático

As regiões contendo os polimorfismos rs1799732, no gene *DRD2*, e rs642249 e rs169068, no gene *SSTR5*, foram amplificadas por PCR utilizando-se pares de oligonucleotídeos específicos desenhados com o auxílio do programa Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) (Tabela 7).

Tabela 7. Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação de polimorfismos nos genes *DRD2* e *SSTR5*

Polimorfismos	Oligonucleotídeo	Sequência 5' → 3'	Amplificado (pb)
rs1799732	DRD2_A-F	CAACCCTTGGCTTCTGAGTC	318
	DRD2_A-R	GGTTCGGCACTGAAGCTG	
rs169068/ rs642249	SSTR5 –F	GAGGGCGGTACCTGCAAC	681
	SSTR5 - R	CTTCAGCCAGCTCTGTCCTC	

pb – pares de bases; F- oligo *forward* (direto); R - oligo reverso

Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 µL, onde foram utilizados 20 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 10 pmol do par oligonucleotídeos, 0,3 U de enzima *GoTaq®* DNA polimerase (Promega) e tampão da reação fornecido pelo fabricante. A reação de amplificação foi realizada em termociclador *Verity® System (Applied Biosystems)* e consistiu nas seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por um minuto e

extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% após coloração com *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotechnology) na proporção 5:1 e visualizados por transiluminação em luz ultravioleta.

Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática, utilizando-se o produto comercial EXO-SAP IT (*Affymetrix*). A reação de sequenciamento foi realizada adicionando-se a 1,0 µL do produto purificado 0,5 µL de *Big Dye Terminator* versão 3.1 (*Applied Biosystems*), 5 pmol do oligonucleotídeo direto e água desionizada estéril para um volume final de 10 uL. A reação foi levada a um termociclador a 96°C por dois minutos, seguindo-se 35 ciclos: 96°C por 15 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

Ao término da reação, o produto foi precipitado por 15 minutos em uma mistura de 25:1:1 de isopropanol 100%:acetato de sódio 3M:EDTA 125 mM. Após centrifugação a 4200 rotações por minuto (rpm) a 4°C por 45 minutos, o material foi lavado por duas vezes com 35 uL de etanol 70% e o tubo foi deixado secar sobre a bancada ao abrigo da luz. Os produtos foram então ressuspensos em 3,0 uL de formamida e submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer 3130 XL automatic DNA sequencer* (*Perkin Elmer*). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências do *SSTR5* e do *DRD2* depositadas na base de dados do *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/>) com o auxílio do programa *Sequencher Portable* (*GeneCodes Inc*).

3.4 Análise estatística

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para cada marcador genético utilizando três testes diferentes: qui-quadrado, teste exato e razão de verossimilhança ($P > 0,05$). O desequilíbrio de ligação (DL) entre os marcadores foi estudado pelo teste Qui-quadrado e valores de $P < 0,01$ foram adotados.

As variáveis contínuas foram avaliadas quanto à média e desvio padrão (DP), ou à mediana e intervalo, conforme a presença de distribuição paramétrica ou não paramétrica (teste Mann-Whitney-Wilcoxon), respectivamente.

A correlação entre as variantes genéticas e a resposta ao tratamento clínico foi realizada por regressão logística ⁽¹³⁰⁾, ajustando para fatores interferentes (gênero, idade ao diagnóstico, tamanho tumoral, níveis séricos de PRL, GH e IGF-1 ao diagnóstico), e foi aplicada a correção para múltiplos testes baseada no grau de DL entre os polimorfismos pelo método de Benjamini e Hocheberg (*False Discovery Rate* – FDR) ⁽¹³¹⁾, a fim de controlar as chances de falso positivo e de ajuste para pequenas amostras ⁽¹³²⁾. O valor de P abaixo de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Foi considerada associação independente quando o valor de P perdeu a significância após o ajuste pelo FDR. Os resultados da avaliação prospectiva de progressão tumoral foram expressos de acordo com o *Hazard ratio* (HR), para o modelo de Cox, e *Odds Ratio* (OR), para o modelo de regressão logística nominal, com seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%.

A associação entre os polimorfismos e variáveis clínicas foi estudada pelo teste exato de Fisher e por regressão logística (caso de sexo e tamanho tumoral). As variáveis quantitativas foram estudadas por meio do teste de Mann-

Whitney-Wilcoxon (idade e nível sérico de PRL, GH, IGF-1 ao diagnóstico). A seleção de variáveis clínicas, em modelos de regressão logística e associação com resposta ao tratamento, foram realizadas com o método de eliminação retrógrada para determinar a melhor associação entre polimorfismos e resposta ao tratamento. Os modelos reduzidos, incluindo apenas as variáveis significativas ($P < 0,05$), foram submetidos à regressão logística pelo teste *Firth's penalized-likelihood logistic regression*⁽¹³²⁾. As análises foram realizadas com o programa estatístico R (<http://cran.r-project.org/doc/manuals/R-intro.pdf>) e com assessoria estatística da equipe da Prof^a. Dr^a Julia Pavan Soler do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo.

4 Resultados

Todos os polimorfismos avaliados nos genes *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* não desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P>0,05$), tanto nos grupos de pacientes portadores de adenomas hipofisários quanto no grupo de indivíduos saudáveis, fornecendo subsídios para posteriores análises estatísticas.

A tabela 8 resume a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* estudados nos pacientes com adenomas hipofisários e em indivíduos saudáveis.

Tabela 8. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* nos pacientes com adenomas hipofisários e no grupo controle

<i>DRD2</i>					
rs1079597	GG	AG	AA	A/*	G/*
Prolactinoma	94 (64)	46 (31)	7 (5)	53 (36)	140 (95)
Somatotrofinoma	116 (70)	46 (28)	3 (2)	49 (30)	162 (98)
ACNF	39 (54)	30 (44)	1(2)	31 (44)	69 (98)
Adenomas hipofisários	352 (67)	154 (30)	16 (3)	170 (33)	506 (97)
Controle	242 (69)	94 (27)	13 (4)	107 (31)	336 (69)
rs1076560	CC	AC	AA	A/*	C/*
Prolactinoma	93 (68)	41 (30)	2 (2)	43 (32)	134 (68)
Somatotrofinoma	106 (69)	44 (28)	5 (3)	49 (31)	150 (69)
ACNF	41 (59)	29 (41)	-	29 (41)	70 (100)
Adenomas hipofisários	337 (69)	139 (29)	11 (2)	150 (31)	476 (98)
Controle	226 (70)	83 (26)	12 (4)	95 (30)	309 (96)
rs1800497	CC	CT	TT	T/*	C/*
Prolactinoma	78 (53)	57 (39)	13 (9)	70 (47)	135 (91)
Somatotrofinoma	94 (57)	62 (38)	9 (5)	71 (43)	156 (95)
ACNF	34 (49)	31 (44)	5 (7)	36 (51)	65 (93)
Adenomas hipofisários	297 (57)	194 (37)	31 (6)	225 (43)	491 (94)
Controle	172 (49)	147 (42)	30 (9)	177 (51)	319 (91)

Continua...

Tabela 8 (conclusão). Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* nos pacientes com adenomas hipofisários e no grupo controle

<i>DRD2</i>					
rs6275	CC	CT	TT	T/*	C/*
Prolactinoma	59 (44)	57 (42)	19 (14)	76 (56)	116 (86)
Somatotrofinoma	72 (44)	74 (45)	18 (11)	92 (56)	146 (89)
ACNF	20 (29)	38 (54)	12 (17)	50 (71)	58 (83)
Adenomas hipofisários	206 (41)	230 (46)	67 (13)	297 (59)	436 (87)
Controle	150 (43)	157 (45)	42 (12)	199 (57)	307 (88)
rs1799732	insCinsC	-insC	-/-	-/*	insC/*
Prolactinoma	98 (66)	43 (29)	7 (5)	50 (34)	141 (95)
Somatotrofinoma	116 (71)	43 (26)	5 (3)	48 (29)	159 (97)
ACNF	49 (70)	17 (24)	4 (6)	21 (30)	66 (94)
Adenomas hipofisários	354 (69)	137 (27)	23 (4)	160 (31)	491 (96)
Controle	196 (72)	72 (26)	5 (2)	77 (28)	268 (98)
<i>SSTR2</i>					
rs998571	TT	TC	CC	C/*	T/*
Somatotrofinoma	84 (51)	66 (40)	15 (9)	81 (49)	150 (91)
Controle	174 (50)	138 (40)	37 (11)	175 (50)	312 (89)
rs1466113	CC	CG	GG	C/*	G/*
Somatotrofinoma	66 (40)	77 (47)	22 (13)	99 (60)	143 (87)
Controle	142 (41)	161 (46)	46 (13)	207 (59)	303 (87)
<i>SSTR5</i>					
rs3751830	CC	CT	TT	T/*	C/*
Somatotrofinoma	56 (34)	75 (45)	34 (21)	109 (66)	131 (79)
Controle	156 (45)	144 (41)	49 (14)	193 (55)	300 (86)
rs4988487	CC	CT	TT	T/*	C/*
Somatotrofinoma	145 (88)	19 (12)	1 (1)	20 (12)	164 (99)
Controle	316 (91)	31 (9)	2 (1)	33 (9)	347 (99)
rs169068	CC	CT	TT	T/*	C/*
Somatotrofinoma	51 (31)	69 (42)	45 (27)	114 (69)	120 (73)
Controle	83 (24)	163 (48)	96 (28)	259 (76)	246 (72)
rs642249	AA	AG	GG	G/*	A/*
Somatotrofinoma	158 (96)	7 (4)	0	7 (4)	165 (100)
Controle	328 (96)	14 (4)	0	14 (4)	342 (100)

ACNF – adenoma clinicamente não funcionante; valores nominais e (%); genótipo /* pelo menos um alelo em homo ou heterozigose

4.1 Prolactinomas

Foram avaliados 148 pacientes com prolactinoma, sendo 29 homens e 119 mulheres, com média da idade ao diagnóstico de 29 ± 20 anos, idade atual de 42 ± 19 anos e níveis séricos de PRL ao diagnóstico de 273 (variando de 38 a 9910) ng/mL, 59 casos (40%) com microadenomas e 89 casos (60%) com macroadenomas.

As variáveis clínicas que se correlacionaram com macroadenoma foram gênero masculino ($P < 0,001$) e maiores níveis séricos de PRL ao diagnóstico (mediana 97 contra 363 ng/mL; $P < 0,001$) (Tabela 9). Trinta pacientes foram excluídos da análise de resposta ao tratamento: 17 não fizeram uso de CAB, 11 foram intolerantes e/ou usaram CAB por menos de seis meses, e dois foram submetidos à RDT previamente a avaliação de resposta ao tratamento clínico.

Um total de 118 pacientes fez uso de CAB durante o acompanhamento clínico: 24 homens e 94 mulheres, com média da idade ao diagnóstico de 29 ± 11 anos, 43 casos (46%) com microadenomas e 75 casos (64%) com macroadenomas. A mediana dos níveis séricos de PRL ao diagnóstico foi de 179 (variando de 38 a 9910) ng/mL e a dose de CAB utilizada variou de 0,25 mg a 7,5 mg por semana, no período de 26 a 252 meses. Nesse grupo de pacientes com prolactinoma tratados com CAB, 24 (20%) não apresentaram normalização dos níveis séricos de PRL com doses menores ou iguais a 3,0 mg por semana de CAB, por no mínimo seis meses, e foram classificados como resistentes. Comparando os casos de microadenomas e macroadenomas, observou-se maior frequência de resistência a CAB, segundo o critério hormonal nos macroadenomas (28% contra 7%, $P = 0,006$). Dos 118 pacientes

tratados com CAB, havia imagens disponíveis da região selar antes e durante o tratamento em 82 casos. Estes foram avaliados, então, quanto ao critério de redução tumoral com o uso de CAB, havendo resposta em 55 casos (67%) e resistência em 27 casos (33%). Destes, cinco casos (18%) apresentavam lesão com importante componente cístico (Tabela 9).

Tabela 9. Análise das características clínicas, laboratoriais e resposta ao tratamento com cabergolina dos pacientes portadores de prolactinoma de acordo com o tamanho tumoral (microprolactinomas e macroprolactinomas)

		Microadenoma	Macroadenoma	P
Gênero F:M n (%)		56:3 (95:5)	63:26 (71:29)	<0,001
Idade (anos)		31±10	28±11	0,092
PRL (ng/mL)		97 (39-500)	363 (38-9910)	<0,001
Controle hormonal n (%) (n=118)	Sensível	40 (93)	54 (72)	0,006
	Resistente	3 (7)	21 (28)	
Controle tumoral n (%) (n=82)	Sensível	21 (68)	34 (67)	0,92
	Resistente	10 (32)	17 (33)	

F – feminino; M – masculino; n – amostra; PRL – prolactina sérica; P<0,05

Dentre os 82 pacientes que puderam ser avaliados, de acordo com os dois critérios (hormonal e redução tumoral), houve concordância em 44 casos quanto à sensibilidade e em sete casos quanto à resistência. A discordância com normalização dos níveis séricos de PRL e a ausência de redução tumoral significativa ocorreram em 21 casos e pode ser justificada pela presença de importante componente cístico, ou ainda, fibrose no leito tumoral. Em dez casos, apesar de redução tumoral significativa, não houve normalização dos

níveis séricos de PRL, o que poderia ocorrer com tempo adicional de tratamento. Os dados são detalhados na Tabela 10.

Tabela 10. Correlação entre os critérios hormonal e de redução tumoral, no tratamento com cabergolina, em pacientes com prolactinoma

Critérios	Hormonal	
	Sensibilidade (n=65)	Resistência (n=17)
Redução tumoral		
Sensibilidade (n=54)	44	10
Resistência (n=28)	21	7

n – amostra

No presente estudo, maiores níveis séricos de PRL ao diagnóstico (mediana 470 contra 179 ng/mL; $P < 0,001$) e a frequência de macroadenoma (87% contra 13%; $P = 0,005$) foram fatores independentes relacionados à resistência à CAB, quanto ao critério de não normalização dos níveis de PRL. A idade ao diagnóstico, na análise quantitativa, bem como o gênero não se correlacionou à resposta ao tratamento. No entanto, a variável idade ao diagnóstico foi considerada de forma dicotômica, com corte em 32 anos (sensibilidade de 87,5% e especificidade de 41,5%) para o modelo com maior poder estatístico, e observou-se que a chance de resistência ao tratamento com CAB aumentou em média 4,2 vezes ($P = 0,008$; $IC_{95\%} = [1,4; 16]$), para indivíduos com menos de 32 anos. Adicionalmente, a menor idade ao diagnóstico se associou a sensibilidade à CAB, quando a resposta avaliada foi redução tumoral ($P = 0,02$) (Tabela 11).

Tabela 11. Correlação das características clínicas, laboratoriais e de imagem dos pacientes portadores de prolactinoma, entre os casos sensíveis e resistentes ao tratamento com cabergolina, considerando os critérios hormonal e de redução tumoral

	Normalização da PRL (n=118)			Redução tumoral (n=82)		
	Sensível (n=94)	Resistente (n=24)	P	Sensível (n=55)	Resistente (n=27)	P
Gênero (F:M) n	78:16	16:8	0,08	43:12	21:6	0,96
Idade (anos)	30±10	25±10	0,052	27±9	33±13	0,02
PRL sérica (ng/mL)	179 (38-2600)	470 (72-9910)	<0,001	173 (39-8200)	166 (44-6000)	0,77
Mic:Macro %	43:57	13:87	0,005	38:62	37:63	0,92

F – feminino; M – masculino; Mac – macroadenoma; Mic – microadenoma; n – amostra; PRL – prolactina sérica; P<0,05

Não foram encontradas associações entre as variantes genéticas e resposta ao tratamento com CAB (Anexo D). No entanto, houve associação dos polimorfismos rs1076560 (alelo A) e rs1800497 (alelo T) e a presença de macroadenoma, $p=0,02$ (OR 2,4 (IC95%=[1,1;5,5]) e $p=0,02$ (OR 2,2 (IC95%=[1,1;5,5])), respectivamente (Tabela 12 e Anexo D). Ambas variantes genéticas encontram-se em forte DL ($D' = 0,9$ e $r^2 = 0,53$) nessa população. O polimorfismo rs1799732 se mostrou em fraco DL com os outros polimorfismos estudados ($D'<0,23$; $r^2<0,03$) (Figura 6).

Tabela 12. Análise dos polimorfismos do gene *DRD2* e sua associação com as características clínicas, laboratoriais e resposta ao tratamento com CAB em pacientes com prolactinoma (anexo D)

rs1076560	AA/AC	CC	OR	IC95%	Poder (%)	P ^a	P ^b
Tumor (micro:macro)	11:32	43:50	2,4	1,1-5,1	59	0,022	0,022
rs1800497	TT/CT	CC					
Tumor (micro:macro)	21:49	38:40	2,1	1,1-4,3	60	0,020	0,022

IC – intervalo de confiança; Macro – macroadenoma; Micro – microadenoma; OR – *odds ratio* para o alelo raro em modelo dominante; Poder – poder do estudo; P^a – sem ajuste para múltiplos testes; P^b – com ajuste para múltiplos testes (FDR); P<0,05.

Figura 6. Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos do gene *DRD2* em pacientes com prolactinoma determinado por (a) D' e (b) r^2

4.2 Somatotrofinomas

Incluimos 165 pacientes portadores de acromegalia: 101 mulheres e 64 homens, com idade ao diagnóstico entre 11 anos e 82 anos (mediana de 43 anos) e idade atual entre 23 anos e 92 anos (mediana de 49 anos). Os macroadenomas perfizeram 93% dos casos.

O tratamento primário foi cirúrgico em 108 casos (65%), clínico com OCT-LAR em 32 casos (19%), e com CAB em 11 pacientes (7%), além de RDT em 3% deles, com perda do seguimento em 1% dos casos. Observou-se que 13 casos (12%) apresentaram controle da doença com cirurgia e seis pacientes com cirurgia seguida de RDT. Dentre 32 pacientes que utilizaram OCT-LAR como tratamento primário, quatro casos (12%) obtiveram controle de GH e IGF-1 e 19 pacientes sem controle da doença foram submetidos à cirurgia transesfenoidal, dos quais nenhum controlou a doença. Em seguida, esses pacientes foram submetidos ao tratamento medicamentoso: 16 pacientes com OCT-LAR (GH < 1,0ng/mL e IGF-1 normal para idade em 12%), dois pacientes com CAB sem controle, e um paciente com tratamento combinado OCT-LAR e CAB sem controle hormonal. Os pacientes que normalizaram GH e IGF-1 com o tratamento clínico apenas após a cirurgia foram considerados como não respondedores.

Dentre os 165 pacientes acromegálicos avaliados, 41 foram excluídos da análise de resposta ao tratamento por terem sido submetidos à RDT prévia.

A sequência de tratamento dos pacientes acromegálicos está detalhada na Figura 7. O paciente que utilizou mais de uma droga em momentos diferentes foi avaliado quanto à resposta em cada período específico.

BRC- bromocriptina; CAB – cabergolina; LRS – ligante do receptor de somatostatina; n – amostra; RDT – radioterapia; () número de pacientes; sem dado – pacientes que perderam o seguimento ou não têm os dois parâmetros de resposta à CAB; Sensíveis= GH<1,0 ng/dl e IGF-1 normal para a idade; (*)3 pacientes em tratamento com LRS isolado não apresentavam dados de controle após o uso de LRS então a amostra avaliada para resposta ao tratamento neste grupo totalizou 75

Pacientes com somatotrofinomas (n=165) com tratamento primário: cirurgia (n=108); clínico (n=50); radioterapia (n=5); sem tratamento (n=2)

Figura 7. Fluxograma de tratamento dos pacientes com acromegalia

BRC- bromocriptina; CAB – cabergolina; LRS – ligante do receptor de somatostatina; n – amostra; RDT – radioterapia; () número de pacientes; sem dado – pacientes que perderam o seguimento ou não têm os dois parâmetros de resposta à CAB; Sensíveis= GH<1,0 ng/dl e IGF-1 normal para a idade; (*)3 pacientes em tratamento com LRS isolado não apresentavam dados de controle após o uso de LRS então a amostra avaliada para resposta ao tratamento neste grupo totalizou 75

Pacientes com somatotrofinomas (n=165) com tratamento primário: cirurgia (n=108); clínico (n=50); radioterapia (n=5); sem tratamento (n=2)

Figura 7. Fluxograma de tratamento dos pacientes com acromegalia (continua)

BRC- bromocriptina; CAB – cabergolina; LRS – ligante do receptor de somatostatina; n – amostra; RDT – radioterapia; () número de pacientes; sem dado – pacientes que perderam o seguimento ou não têm os dois parâmetros de resposta à CAB; Sensíveis= GH<1,0 ng/dl e IGF-1 normal para a idade; (*)3 pacientes em tratamento com LRS isolado não apresentavam dados de controle após o uso de LRS então a amostra avaliada para resposta ao tratamento neste grupo totalizou 75

Pacientes com somatotrofinomas (n=165) com tratamento primário: cirurgia (n=108); clínico (n=50); radioterapia (n=5); sem tratamento (n=2)

Figura 7. Fluxograma de tratamento dos pacientes com acromegalia (conclusão)

Foram considerados pacientes respondedores aqueles que apresentaram GH sérico menor que 1,0 ng/mL e/ou IGF-1 normal para a idade no tratamento com OCT-LAR, CAB ou ambos, primário ou apenas após o procedimento cirúrgico:

- 1) OCT-LAR somente: Com o uso de OCT-LAR isoladamente em 75 casos, houve controle do GH em 30 casos (40%), normalização de IGF-1 em 23 casos (31%) e de ambos em 17 casos (23%);
- 2) CAB somente: Com o uso de CAB isoladamente em 40 casos, houve controle do GH sérico em 10 casos (25%), normalização de IGF-1 em sete casos (17%) e de ambos em três casos (7%);
- 3) OCT-LAR e CAB conjuntamente: O tratamento combinado OCT-LAR e CAB em 54 casos promoveu controle do GH sérico em 25 casos (46%), normalização de IGF-1 em 19 (35%) e de ambos em 13 (24%) (Tabela 13).

Tabela 13. Controle hormonal em pacientes com somatotrofinomas em tratamento clínico

Parâmetros de resposta ao tratamento	OCT-LAR isolado (n=75)	OCT-LAR + CAB (n=54)	CAB isolado (n=40)
GH < 1,0 ng/mL	30 (40%)	25 (46%)	10 (25%)
IGF-1 normal*	23 (31%)	19 (35%)	7 (17%)
GH < 1,0 ng/mL e IGF-1 normal*	17 (23%)	13 (24%)	3 (7%)

CAB – cabergolina; GH – hormônio de crescimento; IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; n – amostra; OCT-LAR – octreotida-LAR; (*) Ajustado para idade

Não foi observada correlação entre as características fenotípicas (gênero, idade, GH e IGF-1 ao diagnóstico) dos pacientes com somatotrofinomas e resposta aos tratamentos avaliados (OCT-LAR, CAB e combinado) ($P > 0,05$).

Devido ao predomínio de macroadenomas na amostra, o tamanho tumoral inicial não pode ser avaliado como variável na resposta ao tratamento.

Na análise por gene, observou-se forte DL para os polimorfismos rs1079597, rs1076560 e rs1800497 de *DRD2* na população de pacientes com somatotrofinomas ($D' > 0,76$; $r^2 > 0,51$). O polimorfismo rs10799732 encontra-se em equilíbrio de ligação com os outros polimorfismos (Figura 8).

Figura 8. Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos do gene *DRD2* em pacientes com somatotrofinoma determinado por (a) D' e (b) r^2

Em relação aos polimorfismos de *SSTR2*, o DL é parcialmente forte, uma vez que o valor de D' nesta amostra encontra-se elevado (0,99), apesar de r^2 estar em torno de 0,24 ($P < 2,22 \times 10^{-16}$) (Figura 9).

A análise do DL entre os polimorfismos do gene *SSTR5* em pacientes com somatotrofinomas demonstra-se moderada ($D' > 0,9$ e r^2 baixo) apesar do valor de $P < 0,03$ se encontrar significativo entre eles (Figura 10).

Figura 9. Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos do gene *SSTR2* em pacientes com somatotrofinoma determinado por (a) D' e (b) r^2

Figura 10. Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos do gene *SSTR5* em pacientes com somatotrofinoma determinado por (a) D' e (b) r^2

Não houve associação entre as variantes genéticas de *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* em pacientes com somatotrofinomas com variáveis clínicas (gênero, idade, níveis séricos de GH e IGF-1 ao diagnóstico) e a resposta aos tratamentos avaliados (Anexos E, F e G).

4.3 Corticotrofinomas

Foram incluídos 142 pacientes portadores de DC, sendo 26 homens e 116 mulheres, com média da idade ao diagnóstico de 32 ± 11 anos, idade atual 44 ± 13 anos, e mediana do ULNR do Fu em 24 horas ao diagnóstico 213 (102-3267) (valor de referência ULNR<100). Quanto ao exame de imagem selar, 59 pacientes apresentavam microadenomas, 33 pacientes apresentavam macroadenomas e 50 pacientes apresentavam imagem selar duvidosa na RM e obtiveram o diagnóstico pelo cateterismo de seios petrosos ou pelo anatomopatológico de adenoma hipofisário com imunohistoquímica positiva para ACTH. O tratamento clínico com CAB foi instituído em 15 pacientes não controlados com a cirurgia transesfenoidal. A dose de CAB variou entre 1,5 mg e 3,5 mg por semana e a dosagem de Fu em 24 horas foi realizada antes, em três meses e em seis meses do tratamento. Pacientes que apresentaram normalização dos níveis de Fu em 24 horas aos seis meses foram considerados sensíveis. O número reduzido da amostra sob tratamento com CAB impossibilitou a correlação com os polimorfismos do gene *DRD2* (Tabela 14).

Tabela 14. Características clínicas dos pacientes com corticotrofinomas tratados com cabergolina

Tratamento com CAB (n=15)	
Sexo F:M (n)	11:4
Idade ao diagnóstico (anos)	23 ± 8
Micro:Macro (n)	10:5
Fu 24horas ao diagnóstico (ULNR)	185 (113-393)

CAB – cabergolina (mg/semana); F – feminino; Fu 24 horas – cortisol urinário em 24h; M – masculino; Macro – macroadenoma; Micro – microadenoma; n – amostra; ULNR – *upper limit normal range* (valor de referência <100). P<0,05

A normalização do Fu em 24 horas foi obtida em seis pacientes (40%) após seis meses de tratamento com CAB (Figura11).

ULNR Fu 24h – *upper limit normal range* do cortisol urinário em 24h (valor de referência <100);

- - - Elevação do Fu 24 horas com o tratamento; — Queda do Fu 24 horas com o tratamento

Figura 11. Resposta ao tratamento com cabergolina em pacientes com corticotrofinomas

Não houve diferença quanto às características dos pacientes (gênero, idade, Fu em 24 horas ao diagnóstico e tamanho tumoral) entre os grupos respondedores e resistentes à CAB (Tabela 15).

Tabela 15. Correlação entre características clínicas e laboratoriais dos pacientes com corticotrofinoma e resposta ao tratamento com cabergolina

Características	Resposta à CAB		P
	Sim (n=6)	Não (n=9)	
Gênero (F:M)	6:0	5:4	0,056
Idade ao diagnóstico (anos)	26 ± 8	21 ± 8	0,22
Fu 24 horas ao diagnóstico (ULNR)	249 (133-780)	350 (202-465)	0,64
Mic:Mac (n)	3:3	7:2	0,26

CAB – cabergolina; F – feminino; Fu 24 horas – cortisol urinário em 24 horas; n – amostra; M – masculino; Mac – macroadenoma; Mic – microadenoma; n – amostra; ULNR – *upper limit normal range* (valor referência <100). P<0,05

4.4 Adenomas Clinicamente Não Funcionantes

Foram incluídos 70 pacientes portadores de ACNF, sendo 43 homens e 57 mulheres, com média de idade ao diagnóstico de 51 ± 13 anos e idade atual de 57 ± 13 anos, sendo todos os casos de macroadenomas. Os pacientes foram submetidos ao tratamento cirúrgico primário. O diagnóstico de ACNF foi confirmado pela ausência de hipersecreção hormonal associado ao anatomopatológico e à imunohistoquímica.

O tratamento clínico com CAB foi introduzido em 35 pacientes que apresentaram imagem sugestiva de remanescentes tumorais, ao menos seis

meses após o procedimento cirúrgico. Os pacientes foram acompanhados prospectivamente a cada seis meses, do ponto de vista clínico e de imagem com RM, por 24 meses (Tabela 16). A dose inicial de CAB foi 1,5 mg por semana e aumentada até 3,5 mg por semana, de acordo com a ausência de resposta ao tratamento e tolerância do paciente na avaliação de seis meses, sendo a dose então mantida até 24 meses de tratamento. A resposta foi avaliada, de acordo com o volume tumoral a curto prazo (de seis a 12 meses de tratamento) e a longo prazo (de 18 a 24 meses de tratamento), sendo considerados respondedores aqueles que apresentaram redução ou estabilidade tumoral. A medicação foi suspensa nos pacientes que apresentaram aumento acima de 25% do volume tumoral, considerados resistentes ao tratamento com a CAB.

Tabela 16. Descrição das características histopatológicas tumorais, clínicas e de imagem dos pacientes com adenoma clinicamente não funcionante tratados com cabergolina

Características		ACNF n=35
Gênero F:M (n)		20:15
Idade ao diagnóstico (anos)		48 ± 12
Volume tumoral ao diagnóstico cm ³		13 (0,67-61)
Imunohistoquímica n (%)	LH/FSH	6 (18)
	<i>Null Cell</i>	21 (60)
	PRL	2 (6)
	TSH	3 (8)
	LH/FSH+TSH	3 (8)

ACNF – adenoma clinicamente não funcionante; CAB – cabergolina; F – feminino; FSH – hormônio folículo estimulante; LH – hormônio luteinizante; M – masculino; n – amostra; PRL – prolactina; TSH – hormônio tireotrófico. *NullCell* – imunohistoquímica negativa para todos os hormônios hipofisários

Na avaliação de resposta ao tratamento de curto prazo em 35 casos, observou-se redução tumoral em nove pacientes (26%), estabilidade tumoral em 20 pacientes (57%), e progressão tumoral em seis pacientes (17%). Na análise de longo prazo, disponível em 30 casos, houve redução tumoral em cinco pacientes (17%), estabilidade tumoral em 20 pacientes (67%) e progressão tumoral em cinco pacientes (17%) (Figura 12). Observou-se correlação entre menor idade ao diagnóstico (38 anos contra 50 anos; $P=0,03$) e progressão tumoral (Tabela 17).

— redução/estabilidade tumoral; - - - aumento tumoral; m - meses

Figura 12. Comportamento do volume tumoral de 35 pacientes com adenoma clinicamente não funcionante ao longo do tratamento com cabergolina

Tabela 17. Características clínicas dos pacientes portadores de adenoma clinicamente não funcionante, classificados de acordo com a resposta à cabergolina: estável/redução (sensíveis) ou progressão tumoral (resistência)

	Estável/Redução (n=29)	Progressão (n=6)	P
Sexo F:M (n)	15:14	5:1	0,20
Idade ao diagnóstico (anos)	50 ± 12	38 ± 10	0,03
Volume tumoral pré CAB cm ³	4,18 ± 4,40	2,77 ± 4,18	0,30

CAB – cabergolina; F – feminino; M – masculino; n – amostra. Amostras cujas distribuições não passaram no teste de normalidade foram logaritimizadas, sendo utilizados os dados em log para o teste. $P < 0,05$

Na avaliação do DL nos pacientes com ACNF, observamos a mesma tendência de segregação que nos outros adenomas hipofisários avaliados para os polimorfismos de *DRD2* (prolactinoma e somatotrofinoma). Os polimorfismos rs1800497, rs1076560, rs1079597 estão em forte DL ($D' > 0,87$ e $r^2 > 0,58$) e o polimorfismo rs1799732 se mostrou em fraco DL com os outros polimorfismos estudados (Figura 13).

Figura 13. Desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos do gene *DRD2* em pacientes com adenoma clinicamente não funcionante determinado por (a) D' e (b) r^2

Nenhuma associação foi encontrada entre os polimorfismos e as variáveis gênero e volume do tumor antes de iniciar o tratamento com CAB. A variável volume do tumor ao diagnóstico não foi avaliada. Observou-se que pacientes heterozigotos para o polimorfismo rs1076560 apresentaram menor idade ao diagnóstico que os homozigotos para CC ($P=0,03$), entretanto, essa associação não se confirmou após ajuste para múltiplos testes ($P=0,15$) (Tabela 18).

Na análise prospectiva de variantes genéticas e resposta à CAB, observou-se que o alelo raro T do polimorfismo rs6275 associou-se com a progressão do tumor ao longo do estudo ($P_{\text{ajustado}}=0,05$; OR 12 [IC95%1,51-380]). A presença do intervalo de confiança elevado pode ser explicada pelo baixo poder do estudo (0,15), pela reduzida quantidade de pacientes avaliados e pela baixa incidência de progressão tumoral, comprometendo esse dado (Tabela 18 e Anexo H). A curva de Kaplan-Meier (Figura 14) reforça a associação desse polimorfismo com a progressão tumoral.

Tabela 18. Análise dos polimorfismos do gene *DRD2* e sua associação com as características clínicas, de imagem e resposta ao tratamento com cabergolina em pacientes com adenomas clinicamente não funcionantes (Anexo H)

rs1076560		AA	AC	CC			P^a	P^b
Idade (anos)		-	40±12	51±12			0,03	0,15
rs6275		TT	CT	CC	HR (IC 95%)	Poder (%)	P^a	P^b
Progressão do tumor	Sim (n=5)	1 (20)	4 (80)	0	12,17 (1,5-380)	15	0,01	0,05
n (%)	Não (n=28)	6 (21)	14 (50)	8 (29)				

IC – intervalo de confiança; OR – *odds ratio*; HR – *hazard ratio* para o alelo raro (alelo T) em modelo codominante determinado por regressão proporcional de Cox ajustado para sexo, idade atual e idade ao diagnóstico; n – amostra; P^a – sem ajuste para múltiplos testes; P^b – com ajuste para múltiplos testes (FDR); $P<0,05$

Genótipos: CC (n=8), CT (n=18), TT (n=7); n – amostra

Figura 14. Curva de Kaplan-Meier da progressão tumoral em adenoma clinicamente não funcionante em função do rs6275 no gene *DRD2*

4.5 Adenomas hipofisários funcionantes tratados com cabergolina

Apesar de mecanismos diferentes estarem envolvidos no controle hormonal de cada subtipo tumoral, optou-se em agrupar os pacientes com adenomas hipofisários em uso de CAB, avaliados quanto ao controle hormonal, e analisar os polimorfismos de *DRD2*, quanto à resposta ao tratamento. Neste grupo, foram incluídos 169 pacientes (prolactinoma n=118; somatotrofinoma n=36; e corticotrofinoma n=15). Observou-se predomínio de sexo feminino (73%) e de macroadenomas (68%), com média de idade ao

diagnóstico de 32 ± 13 anos. Houve controle hormonal com tratamento clínico com CAB em 61% dos casos.

Não se observou correlação entre a resposta ao tratamento e os polimorfismos de *DRD2* (Anexo I).

4.6 Estudo caso/controle

O grupo controle, caracterizado por indivíduos saudáveis com função hipofisária normal, foi composto por 349 indivíduos com idade entre 17 anos e 66 anos, sendo 243 homens e 106 mulheres, com média da idade 36 ± 11 anos. As frequências genótípicas desse grupo foram comparadas às frequências de cada subtipo de adenoma hipofisário corrigido para idade atual e gênero.

a) Prolactinomas

Não foi observada diferença na frequência genotípica dos polimorfismos de *DRD2* entre pacientes com prolactinomas e grupo controle (Anexo J).

b) Somatotrofinomas

Não se observou correlação entre as variantes genéticas de *DRD2* e *SSTR2* e a presença de somatotrofinomas, quando comparado ao grupo controle (Anexo J e K), no entanto, a presença de pelo menos um alelo raro T de rs3751830 no *SSTR5* aumentou em média 1,6 vezes ($P=0,02$; $C95\%=[1,1;2,3]$) a chance de doença. Vale ressaltar que, essa associação perdeu a significância de 5% após a correção para múltiplos testes ($P=0,23$), (Tabela 19 e Anexo K).

Tabela 19. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de *SSTR5* em pacientes com somatotrofinoma e grupo controle (Anexo K)

rs3751830	CC	TT/CT	OR	IC95%	Poder (%)	P ^a	P ^b
Somatotrofinoma	56	109	1,56	1,0-2,3	55	0,021	0,231
Controle	156	193					

IC – intervalo de confiança; n – amostra; OR – *odds ratio* para o alelo raro (alelo T) em modelo dominante; Poder – poder do estudo; P^a – sem ajuste para múltiplos testes; P^b – com ajuste para múltiplos testes (FDR); P ajustado para sexo e idade atual<0,05

c) Adenomas Clinicamente Não Funcionantes

Na correlação entre variantes genéticas de *DRD2* e presença de ACNF, observou-se que a presença de pelo menos um alelo raro A de rs1079597 foi inversamente associada à prevalência de adenoma (P=0,008), mantendo a significância estatística após o ajuste para múltiplos testes (P=0,04) (Tabela 20 e Anexo J).

Tabela 20. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos no gene *DRD2* nos pacientes com adenoma clinicamente não funcionante e grupo controle (Anexo J)

rs1079597	GG	AG	AA	OR	IC95%	Poder (%)	P ^a	P ^b
ACNF	39 (54)	30 (44)	1(2)	0,38	0,18-0,77	30	0,008	0,04
Controle	242 (69)	94 (27)	13 (4)					

IC – intervalo de confiança; n – amostra; OR – *odds ratio* para o alelo raro (alelo A) em modelo codominante; Poder – poder do estudo; P^a – sem ajuste para múltiplos testes; P^b – com ajuste para múltiplos testes (FDR); P ajustado para sexo e idade atual<0,05

Adicionalmente, na análise de haplótipos dos polimorfismos de *DRD2*, não houve associação com a presença de tumor (Tabela 21).

Tabela 21. Análise de haplótipos no gene *DRD2* de acordo com a frequência genotípica de adenoma clinicamente não funcionante e grupo controle

DRD2	ACNF (n=70)	Controle (n=349)	OR	IC95%	P ^a	P ^b
2CGCCC	30	37	1,00	1,00	-	
2CAATC	14	14	1,02	(0,95 – 1,10)	0,44	0,51
1CAATC	20	11	1,18	(0,92 – 1,53)	0,18	0,49
2CGCCT	30	24	1,03	(0,97 – 1,09)	0,28	0,49
1CGCCT	4	8	0,99	(0,88 – 1,09)	0,81	0,81
2CGCTC	0,8	0,7	0,90	(0,82 – 1,00)	0,05	0,35
1CGCTC	2	3	0,94	(0,81 – 1,09)	0,40	0,51
1CGCTT	2	1,6	1,09	(0,93 – 1,27)	0,28	0,49

Os haplótipos representam os alelos dos polimorfismos rs1799732, rs1079597, rs1076560, rs6275, e 1800497, respectivamente; IC – intervalo de confiança; OR – *Odds ratio* (OR) para a presença de adenoma clinicamente não funcionante para cada haplótipo, quando comparado com o OR do haplótipo mais frequente (2CGCCC) considerado igual a 1; P^a – sem ajuste para múltiplos testes; P^b – com ajuste para múltiplos testes (FDR); P<0,05

d) Adenomas hipofisários

Os pacientes portadores de prolactinoma, somatotrofinoma, corticotrofinoma e ACNF foram incluídos em um mesmo grupo, totalizando 525 casos, para a análise da frequência dos polimorfismos de *DRD2* no grupo doença, comparados ao grupo controle, ajustado para sexo e idade atual. Observou-se que a presença do alelo raro T de rs1800497 reduziu a chance de

tumor em relação aos homozigotos para CC ($P=0,049$) na análise individual, independente do subtipo tumoral. Essa associação não se confirmou após o ajuste para múltiplos testes (Tabela 22 e Anexo J).

Tabela 22. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de *DRD2* no grupo com adenomas hipofisários (prolactinoma, somatotrofinomas, corticotrofinomas e adenoma clinicamente não funcionantes) e grupo controle (Anexo J)

rs1800497	CC	CT	TT	OR	IC95%	Poder (%)	P ^a	P ^b
Adenomas hipofisários	297	194	31	0,77	0,61-0,95	54	0,049	0,09
Controles	242	94	13					

IC – intervalo de confiança; n – amostra; OR – *odds ratio* para o alelo raro (alelo T) em modelo dominante; Poder – poder do estudo; P^a – sem ajuste para múltiplos testes; P^b – com ajuste para múltiplos testes (FDR); P ajustado para sexo e idade atual < 0,05

5 Discussão

O tratamento medicamentoso dos adenomas hipofisários é uma importante modalidade terapêutica, principalmente os AD para os prolactinomas e os LRS para a acromegalia. Recentemente, os polimorfismos de *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* foram envolvidos nos mecanismos de resistência ao tratamento com CAB e OCT-LAR, respectivamente.

Em nosso estudo, com relação aos prolactinomas, não houve correlação entre os polimorfismos do *DRD2* e resposta a CAB, considerando tanto a normalização dos níveis de PRL como a redução tumoral. Em estudo recente que avaliou pacientes com prolactinomas tampouco foi encontrada tal associação ⁽⁹⁴⁾, no entanto Filopanti et al. (2008), utilizando o mesmo critério de resistência à CAB, encontraram associação entre rs6275 (alelo T) e resistência ao tratamento ⁽⁸⁸⁾. Adicionalmente, outro estudo, com número reduzido de pacientes (sete portadores de prolactinoma), observou maior frequência do mesmo polimorfismo associado a pacientes hiperprolactinêmicos, quando comparados a indivíduos saudáveis ⁽⁹⁰⁾. Todavia, esse polimorfismo não se correlacionou a alterações de estabilidade do RNAm ⁽⁹¹⁾ ou expressão do receptor ⁽¹⁰³⁾ em tecido de autópsia de indivíduos saudáveis, em estudos funcionais.

Em nossa análise da correlação dos polimorfismos do gene *DRD2* com as características clínicas dos pacientes com prolactinomas, houve associação entre os polimorfismos rs1076560 (alelo A) e rs1800497 (alelo T) e a presença de macroadenomas. Em análise de haplótipos, Filopanti et al. (2008)

encontraram forte DL entre rs1076560 (alelo C) e rs1800497 (alelo C) em pacientes com microprolactinomas ⁽⁸⁸⁾, enquanto que, em nosso estudo, houve associação do menor alelo desses polimorfismos com macroadenomas. Corroborando com esses achados, estudos funcionais mostraram que a presença do alelo T do polimorfismo rs1800497 foi relacionada à menor ligação do AD marcado em núcleos estriado ⁽⁹⁵⁾, caudado ⁽⁸⁹⁾ e putâmen ⁽⁹⁹⁾. Adicionalmente, o polimorfismo rs1076560 (alelo A) foi associado à redução da expressão da isoforma curta de DRD2 em pacientes com esquizofrenia ^(103, 104). Com efeito, dados da literatura demonstram que a maior expressão da isoforma curta do DRD2 parece estar relacionada à eficácia no tratamento com AD ^(84, 85), portanto a maior frequência de rs1076560 (alelo A) e rs1800497 (alelo T) em macroprolactinomas sugere que essas variantes genéticas podem influenciar a ligação e a eficácia do AD ao DRD2 ⁽¹³⁾.

Em nossa casuística, idade abaixo de 32 anos, níveis séricos elevados de PRL ao diagnóstico e macroadenomas se correlacionaram com resistência à CAB, de acordo com estudos prévios que demonstram que o gênero masculino ⁽¹¹⁾, macroadenoma ⁽¹³⁾, e invasividade tumoral ^(14, 15) são variáveis relacionadas a resistência aos AD. Colao et al. (2010) relataram maior prevalência de resistência à CAB entre crianças e adolescentes, nos quais a prevalência de macroadenomas é sabidamente maior ⁽¹³³⁾. Desta forma, a relação entre menor faixa etária e resistência à CAB pode ser simplesmente devido à maior frequência de macroadenomas. Por outro lado, em nosso estudo, apesar da prevalência de macroadenomas ser maior nos homens (90% contra 53% nas mulheres), o gênero masculino não se correlacionou com resistência aos AD.

Em relação aos pacientes acromegálicos, metanálise recente demonstrou que 56% apresentaram controle de GH (abaixo de 2,5 ng/mL) e 55% apresentaram normalização do IGF-1, com o uso de LRS ^(34, 111). São fatores preditivos de resposta aos LRS: gênero feminino ⁽¹¹²⁾, menor nível de GH e de IGF-1 basais ^(111, 134), presença de hipointensidade tumoral nas aquisições em T2 da RM de hipófise ^(135, 136) e, principalmente, expressão de SSTR2 no tecido tumoral ⁽¹²⁰⁾. No entanto, em nosso estudo, nenhuma variável fenotípica (gênero, idade e níveis séricos de GH e IGF-1 ao diagnóstico) foi correlacionada à resposta aos tratamentos avaliados (OCT-LAR, CAB e combinado). Não realizamos avaliação quanto às características tumorais na ressonância magnética ou expressão de SSTR2.

Os polimorfismos de *DRD2* nos pacientes acromegálicos não se associaram nem às características fenotípicas nem à resposta ao tratamento com CAB, isolada ou em combinação com OCT-LAR. A frequência genotípica desses polimorfismos foi semelhante no grupo de pacientes comparados ao grupo de indivíduos saudáveis. Não há estudos prévios demonstrando a participação de variantes genéticas no desenvolvimento tumoral e na resposta ao tratamento com AD em acromegálicos, sendo esse dado inédito.

Em relação aos LRS, em nosso estudo não encontramos associação entre os polimorfismos de *SSTR2* e *SSTR5* e resposta terapêutica, quanto ao controle hormonal, o que está de acordo com as conclusões de outros dois estudos ^(118, 121).

Alguns autores têm sugerido que o polimorfismo rs998571, relacionado à redução da transcrição do *SSTR2*, possa estar envolvido na tumorigênese do adenocarcinoma de pâncreas ⁽¹²³⁾. Além disso, uma vez que o polimorfismo

rs3751830 do gene *SSTR5* está localizado em uma sequência reconhecida pelo Hmx1 (fator de transcrição que pertence à família das proteínas *homeodomain* ⁽¹³⁷⁾), sugere-se que possa afetar a transcrição do *SSTR5*.

Adicionalmente, a análise do haplótipo composto por rs169068 (alelo C) e rs3751830 (alelo T) parece ter influência nos níveis de GH e IGF1 séricos ao diagnóstico ⁽¹¹⁸⁾, não reproduzido neste estudo.

Em nosso estudo, 83% dos pacientes portadores de ACNF apresentaram resposta à CAB, seja estabilidade (57%) ou redução (27%) tumoral. Nosso resultado condiz com os estudos anteriores que mostraram redução ou estabilidade tumoral em 38% e 49% dos casos ^(68, 78).

No grupo de pacientes com ACNF, a presença do heterozigoto CT de rs6275 se associou à falta de resposta à CAB, sugerida pela progressão do volume tumoral. Não há, até o presente momento, estudos de polimorfismos de *DRD2* em portadores de ACNF em uso de AD. Interessante e intrigante notar que a presença do alelo T foi associada à resistência à CAB em prolactinomas ⁽⁸⁸⁾. Em nosso estudo houve essa associação nos casos de ACNF, porém não nos prolactinomas. Os estudos funcionais, quanto a esse polimorfismo, são controversos. Em dois deles, não houve alteração na estabilidade do RNAm de *DRD2* em células transfectadas com a presença da variante T ⁽⁹¹⁾ e na expressão de *DRD2* em córtex pré-frontal e núcleo estriado ⁽¹⁰³⁾, provenientes de autópsias de indivíduos saudáveis. Em contrapartida, em estudos com usuários de drogas, que apresentam o sistema dopaminérgico menos ativo, portadores de pelo menos um alelo T de rs6275 necessitaram de doses maiores de metadona, quando comparados aos homozigotos CC, sugerindo que esse genótipo se correlacione a menor atividade de *DRD2* ⁽¹³⁸⁾.

Em doenças raras, como os adenomas hipofisários, a amostra limitada pode gerar maior dificuldade na interpretação da análise estatística. A fim de aumentar o tamanho amostral, incluímos os pacientes portadores de prolactinomas, corticotrofinomas e somatotrofinomas em um único grupo de adenomas hipofisários funcionantes, avaliados do ponto de vista hormonal, quanto à resposta ao tratamento com CAB. Incluímos 15 pacientes portadores de corticotrofinomas nesse grupo e que não puderam ser avaliados isoladamente devido ao pequeno número amostral. Não houve correlação entre os polimorfismos de *DRD2* e resposta à CAB, reforçando os achados negativos dos grupos de prolactinomas e somatotrofinomas, avaliados individualmente. No entanto, devemos levar em conta as diferenças inerentes a cada tipo tumoral na interpretação deste resultado.

A frequência dos polimorfismos de *DRD2* para cada subtipo tumoral (prolactinomas, somatotrofinomas, corticotrofinomas e ACNF, exceto corticotrofinoma) e um grupo incluindo todos os subtipos tumorais foi comparada com grupo controle de indivíduos saudáveis, ajustados para gênero e idade atual. O desenvolvimento de hiperplasia lactotrófica e prolactinomas em roedores *knockout* para *DRD2* apontam para um possível papel regulador da dopamina na proliferação de lactotrófos ^(139, 140). No entanto, em nosso estudo não houve diferença na frequência dos polimorfismos do *DRD2*, tanto no grupo de pacientes com prolactinoma, quanto nos outros grupos, quando comparados ao controle, com exceção do rs1079597 no qual o alelo raro A foi inversamente associado com a prevalência de ACNF. Em estudo recente, incluindo prolactinomas, somatotrofinomas e ACNFs, tampouco houve diferença na frequência dos polimorfismos de *DRD2*, quando comparados ao

grupo controle ⁽¹⁴¹⁾. Um estudo funcional envolvendo esse polimorfismo demonstrou menor densidade de DRD2 em núcleo estriado em indivíduos saudáveis ⁽⁹⁶⁾, em contrapartida Laruelle et al. (1998) não demonstraram associação entre a presença do alelo A e mudanças na afinidade de ligação entre o DRD2 e seus agonistas, em pacientes esquizofrênicos ⁽¹⁰⁰⁾.

A presença do polimorfismo rs1800497 (alelo T) de *DRD2* reduziu a chance da presença de tumor quando os adenomas hipofisários foram agrupados. No entanto, essa associação não se manteve após ajuste estatístico, e esse dado ainda não foi reproduzido na literatura. Existem diversos estudos funcionais demonstrando associação do alelo T com menor ligação ao DRD2 em núcleos caudado e estriado, o que poderia justificar seu potencial mecanismo funcional no desenvolvimento tumoral ^(95-99, 101, 102).

O papel dos polimorfismos de *SSTR2* e *SSTR5* no desenvolvimento de tumores produtores de GH é controverso: em um estudo não se observaram diferenças na frequência dos polimorfismos desses genes entre o grupo de pacientes acromegálicos e o de indivíduos saudáveis ⁽¹¹⁸⁾, enquanto que a presença do alelo raro rs642249 foi associada à acromegalia, em outra publicação ⁽¹²¹⁾. Em nosso estudo, que incluiu maior número de pacientes acromegálicos que os dois estudos prévios, não houve diferença na frequência dos polimorfismos de *SSTR2* e *SSTR5* entre os pacientes acromegálicos e indivíduos saudáveis.

6 Conclusões

Não encontramos associação entre os polimorfismos de *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* e a resposta ao tratamento clínico, com CAB e OCT-LAR, respectivamente, bem como no desenvolvimento tumoral em pacientes com prolactinomas, somatotrofinomas e corticotrofinomas. Nossos dados apontam para um possível papel do polimorfismo rs6275 (alelo T) de *DRD2* na progressão tumoral dos pacientes com adenoma clinicamente não funcionante com o tratamento com cabergolina. O polimorfismo rs1079597 (alelo A) de *DRD2* foi mais freqüente no grupo de pacientes com adenoma clinicamente não funcionante, quando comparados ao controle, sugerindo sua participação no desenvolvimento tumoral. Mais estudos são necessários para definir o papel das variantes genéticas desses genes como um mecanismo envolvido na resistência aos AD e LRS bem como na tumorigênese hipofisária.

7 Anexos

Anexo A. 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

Nº Protocolo: 0770/11

Título: INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES DOS RECEPTORES DE DOPAMINA D2 E DE SOMATOSTATINA SST2 E SST5 NAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E NA RESPOSTA AO TRATAMENTO DE PACIENTES PORTADORES DE ADENOMAS HIPOFISÁRIOS

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Marcello D. Bronstein

Pesquisador Executante: Cristina Bellotti Forniga Bueno

Co-autores: Andrea Glezer, Ericka B. Trarbach, Marcio Carlos Machado, Raquel Soares Jallad, Maria Candida Barisson Villares Fragoso

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

A 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, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 21/03/2012, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

 Professora Dra. Benerice Balthazinha de Mendonça
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Endocrinologia

CAPPesq, 22 de Março de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGENIO GARCEZ LEME
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo B. Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos pacientes e grupo controle com adenomas hipofisários

Anexo B1 – Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos pacientes com adenomas hipofisários

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
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 (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Influência de polimorfismos dos genes dos receptores de dopamina D2 e de somatostatina SST2 e SST5 nas manifestações clínicas e na resposta ao tratamento de pacientes portadores de adenomas hipofisários

2. PESQUISADOR: Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN
CARGO/FUNÇÃO: Médico

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº15798

UNIDADE DO HCFMUSP: UNIDADE DE NEUROENDOCRINOLOGIA DO
SERVIÇO DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA – DIVISÃO DE CLÍNICA
MÉDICA I

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	X	RISCO MAIOR	☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 MESES

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, que visa pesquisar a presença de alterações genéticas em pacientes com tumores da hipófise. 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 prolactina (prolactinoma). No entanto, o quadro clínico, a elevação hormonal e a resposta ao tratamento variam entre pacientes com o mesmo tipo de tumor”.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Para este estudo, além dos exames de rotina, será coletado tubo seco, contendo cerca 10mL de sangue.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço;

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: dor e arroxamento eventuais no local da punção para a coleta do exame de sangue;

5 – 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;

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

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você ou seu responsável legal terão acesso ao profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal, Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN, pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 5º andar, bloco 4B ambulatório de Endocrinologia, telefones: 3069-6745 3069-6293 / 3069-6624. 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 – 5º andar – tel.: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: 3069-6442, ramal 26 E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – 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;

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

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

11 – 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.

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Influência de polimorfismos dos genes dos receptores de dopamina D2 e de somatostatina SST2 e SST5 nas manifestações clínicas e na resposta ao tratamento de pacientes portadores de adenomas hipofisários”

Eu discuti com o Dr. Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN 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 que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Eu ou o indivíduo ao qual sou o responsável legal concordamos voluntariamente em participar deste estudo e poderemos retirar o nosso consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que possamos ter adquirido, ou no atendimento neste Serviço.

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do paciente/representante legal

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

(Para casos de pacientes analfabetos, semianalfabetos 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 B2 – Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado ao grupo controle

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

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

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 (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Influência de polimorfismos dos genes dos receptores de dopamina D2 e de somatostatina SST2 e SST5 nas manifestações clínicas e na resposta ao tratamento de pacientes portadores de adenomas hipofisários

2. PESQUISADOR: Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN
CARGO/FUNÇÃO: Médico INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 15798
UNIDADE DO HCFMUSP: UNIDADE DE NEUROENDOCRINOLOGIA DO
SERVIÇO DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA – DIVISÃO DE CLÍNICA
MÉDICA I

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	X	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 MESES

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

1 – Você está sendo convidado a participar voluntariamente de um estudo para fazer parte de um grupo controle de indivíduos saudáveis que será comparado aos indivíduos com tumor de hipófise acompanhados no ambulatório de endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2 – Desenho do estudo e objetivo(s) “o objetivo do estudo visa pesquisar a presença de alterações genéticas em indivíduos saudáveis voluntários e indivíduos com tumores da hipófise. Os tumores hipofisários podem ou não produzir hormônios. Dependendo do tipo de hormônio produzido o indivíduo apresenta uma doença diferente como o aumento do hormônio do crescimento (acromegalia), aumento do cortisol (doença de Cushing), aumento da prolactina (prolactinoma). No entanto, o quadro clínico, a elevação hormonal e a resposta ao tratamento variam entre pacientes com o mesmo tipo de tumor”.

3 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Para este estudo serão coletados cerca de 20 mL de sangue em tubos secos para avaliação dos hormônios da hipófise e das alterações genéticas. O resultado dos exames realizados estará disponível no setor de laudos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço;

5 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: dor e arroxamento eventuais no local da punção para a coleta do exame de sangue;

6 – 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 indivíduos com adenomas hipofisários e dos indivíduos saudáveis voluntários;

7 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o indivíduo pode optar: não há;

8 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você ou seu responsável legal terão acesso ao profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 5º andar, bloco 4B ambulatório de Endocrinologia, telefones: 3069-6745 3069-6293 / 3069-6624. 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 – 5º andar – tel.: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442, ramal 26 E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

9 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo ao acesso à esta Instituição;

10 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros indivíduos, não sendo divulgado a identificação de nenhum indivíduo;

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

12 – 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.

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

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

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Influência de polimorfismos dos genes dos receptores de dopamina D2 e de somatostatina

SST2 e SST5 nas manifestações clínicas e na resposta ao tratamento de pacientes portadores de adenomas hipofisários”.

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 este serviço quando necessário. Eu ou o indivíduo ao qual sou o responsável legal concordamos voluntariamente em participar deste estudo e poderemos retirar o nosso consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que possamos ter adquirido, ou no atendimento neste Serviço.

_____ Data ____/____/____

Assinatura do paciente/representante legal

Assinatura da testemunha

_____ Data ____/____/____

(Para casos de pacientes analfabetos, semianalfabetos 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 C. Questionário aplicado a indivíduos doadores de sangue provenientes da Fundação Pró-Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Iniciais

Gênero

F ☐ M ☐

Data de nascimento

Idade

Raça

☐ branco ☐ negro

☐ amarelo ☐ ameríndio

Peso

Altura

Idade da menarca

Última menstruação

Uso de anticoncepcional hormonal

Gestações

Número de filhos

Uso de medicação – se sim descrever ☐ sim ☐ não

Qual:

Tabagismo

☐ sim ☐ não

História familiar de doença hormonal ☐ sim ☐ não

(tireoide, hipófise, crescimento)

História pessoal de doença hormonal ☐ sim ☐ não

(tireoide, hipófise, crescimento)

Anexo D. Análise dos polimorfismos do gene *DRD2* e sua associação com as características clínicas, laboratoriais e resposta ao tratamento com cabergolina em pacientes com prolactinoma

rs1079597		AA/AG	GG	P
Gênero (F:M)		44:9	74:20	0,68
Idade (anos)		29±12	30±11	0,56
PRL (ng/mL)		200 (38-9910)	162 (39-8200)	0,52
Tumor (micro:macro)		16:37	43:51	0,08
Resposta à CAB	Normalização da PRL (n=118) (S:R)	32:10	62:14	0,90
	Redução tumoral (n=82) (S:R)	11:16	16:39	0,14
rs1076560		AA/AC	CC	P
Gênero (F:M)		37:6	70:23	0,22
Idade (anos)		29±11	29±11	0,85
PRL (ng/mL)		200 (38-9910)	179 (39-8200)	0,66
Tumor (micro:macro)		11:32	43:50	0,02
Resposta à CAB	Normalização da PRL (n=118) (S:R)	24:10	64:11	0,35
	Redução tumoral (n=82) (S:R)	10:13	14:40	0,06
rs1800497		TT/CT	CC	P
Gênero (F:M)		58:12	61:17	0,61
Idade (anos)		30±11	29±11	0,63
PRL (ng/mL)		200 (38-9910)	140 (39-8200)	0,20
Tumor (micro:macro)		21:49	38:40	0,02
Resposta à CAB	Normalização da PRL (n=118) (S:R)	42:12	52:12	0,99
	Redução tumoral (n=82) (S:R)	14:22	13:33	0,37
rs6275		TT/CT	CC	P
Gênero (F:M)		57:19	49:10	0,35
Idade (anos)		29±10	29±11	0,67
PRL (ng/mL)		179 (38-9910)	195 (44-6890)	0,16
Tumor (micro:macro)		33:43	20:39	0,29
Resposta à CAB	Normalização da PRL (n=118) (S:R)	54:10	33:11	0,42
	Redução tumoral (n=82) (S:R)	12:32	12:20	0,36
rs1799732		-/-insC	insCinsC	P
Gênero (F:M)		40:10	79:19	0,89
Idade (anos)		28±9	30±12	0,74
PRL (ng/mL)		190 (41-9910)	178 (38-8200)	0,45
Tumor (micro:macro)		19:31	40:58	0,85
Resposta à CAB	Normalização da PRL (n=118) (S:R)	32:8	62:16	0,73
	Redução tumoral (n=82) (S:R)	8:20	19:35	0,69

CAB – cabergolina; F – feminino; M – masculino; micro – microadenoma; macro – macroadenoma; PRL – prolactina; R – resistente; S – sensível; P<0,05.

Anexo E. Análise dos polimorfismos do gene *DRD2* e sua associação com as características clínicas, laboratoriais e resposta ao tratamento clínico em pacientes com somatotrofinoma

rs1079597		AA/AG	GG	P
Gênero (F:M) (n)		33:16	68:48	0,29
Idade (anos)		41±27	42±13	0,79
GH (ng/mL)		15 (0,6-220)	14 (0,8-580)	0,82
IGF-1*		304 (120-667)	305 (102-768)	0,92
Tumor (micro:macro) (n)		3:46	8:107	0,79
Resposta ao tratamento/Parâmetros (n) (sim:não)				
CAB	GH	4:8	6:18	0,94
	IGF-1	5:7	2:26	0,07
	GH + IGF-1	2:10	1:23	1,00
OCT-LAR + CAB	GH	7:10	18:17	0,31
	IGF-1	5:12	14:23	0,28
	GH + IGF-1	3:14	10:25	0,10
rs1076560		AA/AC	CC	P
Gênero (F:M) (n)		34:15	61:45	0,15
Idade (anos)		39±29	43±14	0,18
GH (ng/mL)		23 (1,6-183)	13 (0,6-580)	0,13
IGF-1*		285 (138-667)	310 (102-768)	0,73
Tumor (micro:macro) (n)		2:47	9:96	0,47
Resposta ao tratamento – Parâmetros (n) (sim:não)				
CAB	GH	3:7	6:17	0,83
	IGF-1	4:7	2:24	0,09
	GH + IGF-1	1:9	1:22	1,00
OCT-LAR + CAB	GH	3:10	20:14	0,05
	IGF-1	4:9	14:22	0,29
	GH + IGF-1	1:12	11:23	0,08
rs1800497		TT/CT	CC	P
Gênero (F:M) (n)		46:25	55:39	0,41
Idade (anos)		41±19	42±16	0,98
GH (ng/mL)		13 (0,6-580)	14 (1,1-182)	0,93
IGF-1*		291 (120-768)	318 (102-728)	0,57
Tumor (micro:macro) (n)		4:67	7:86	0,60
Resposta ao tratamento – Parâmetros (n) (sim:não)				
CAB	GH	5:12	5:14	0,76
	IGF-1	5:13	2:20	0,37
	GH + IGF-1	2:15	1:18	1,00
OCT-LAR + CAB	GH	10:12	15:15	0,89
	IGF-1	8:15	11:20	0,44
	GH + IGF-1	5:17	8:22	0,41

Continua...

rs6275		TT/CT	CC	P
Gênero (F:M) (n)		51:41	49:23	0,10
Idade (anos)		42±16	41±20	0,67
GH (ng/mL)		13 (0,8-580)	15 (0,6-220)	0,77
IGF-1*		63 (102-728)	333 (120-768)	0,98
Tumor (micro:macro) (n)		4:88	7:64	0,20
Resposta ao tratamento – Parâmetros (n) (sim:não)				
CAB	GH	6:17	4:9	0,49
	IGF-1	4:21	3:12	0,51
	GH + IGF-1	2:21	1:12	1,00
OCT-LAR + CAB	GH	11:14	14:12	0,12
	IGF-1	9:17	10:17	0,27
	GH + IGF-1	5:20	8:18	0,16
rs1799732		-/-insC	insCinsC	P
Gênero (F:M) (n)		28:20	72:44	0,65
Idade (anos)		45±26	40±13	0,06
GH (ng/mL)		15 (0,8-580)	13 (0,6-220)	0,35
IGF-1*		300 (136-768)	316 (102-667)	0,78
Tumor (micro:macro) (n)		0:48	11:104	0,06
Resposta ao tratamento – Parâmetros (n) (sim:não)				
CAB	GH	3:9	7:17	0,23
	IGF-1	2:10	5:23	0,77
	GH + IGF-1	1:11	2:22	1,00
OCT-LAR + CAB	GH	9:10	16:16	0,89
	IGF-1	7:12	12:22	0,31
	GH + IGF-1	4:15	9:23	0,25

CAB – cabergolina; F – feminino; GH – hormônio de crescimento; IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; LRS – ligante do receptor de somatostatina; M – masculino; macro – macroadenoma; micro – microadenoma; n – amostra; OCT-LAR – octreotida de depósito; (*)IGF-1 – valores expressos em *upper limit normal range* (ULNR); P<0,05.

Anexo F. Análise dos polimorfismos do gene *SSTR2* e sua associação com as características clínicas, laboratoriais e resposta ao tratamento clínico em pacientes com somatotrofinoma

rs998571	Parâmetros	CC/CT	TT	P
Gênero (F:M) (n)		52:29	49:35	0,43
Idade (anos)		42±18	42±17	0,94
GH (ng/mL)		14 (1,1-580)	14 (0,6-183)	0,80
IGF-1*		334 (102-768)	300 (120-667)	0,06
Tumor (micro:macro) (n)		3:77	0:76	0,19
Resposta ao tratamento/Parâmetros (n) (sim:não)				
OCT-LAR	GH	15:18	15:24	0,54
	IGF-1	14:22	9:30	0,16
	GH + IGF-1	9:26	8:31	0,59
OCT-LAR + CAB	GH	15:13	10:14	0,91
	IGF-1	10:19	9:16	0,51
	GH + IGF-1	8:20	5:19	0,73
rs1466113		CC/CG	GG	P
Gênero (F:M) (n)		66:33	35:31	0,07
Idade (anos)		42±15	41±22	0,92
GH (ng/mL)		13 (1,1-182)	16 (0,6-580)	0,70
IGF-1*		299 (102-667)	333 (138-768)	0,11
Tumor (micro:macro) (n)		6:93	5:60	0,43
Resposta ao tratamento/Parâmetros (n) (sim:não)				
OCT-LAR	GH	17:24	13:18	0,67
	IGF-1	12:31	11:21	0,31
	GH + IGF-1	7:35	10:22	0,10
OCT-LAR + CAB	GH	12:13	13:14	0,90
	IGF-1	7:19	12:16	0,22
	GH + IGF-1	5:20	8:19	0,43

CAB – cabergolina; F – feminino; GH – hormônio de crescimento; IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; LRS – ligante do receptor de somatostatina; M – masculino; macro – macroadenoma; micro – microadenoma; n – amostra; OCT-LAR – octreotida de depósito; (*)IGF-1 – valores expressos em *upper limit normal range* (ULNR); P<0,05.

Anexo G. Análise dos polimorfismos do gene *SSTR5* e sua associação com as características clínicas, laboratoriais e resposta ao tratamento clínico em pacientes com somatotrofinoma

rs3751830		TT/CT	CC	P
Gênero (F:M) (n)		63:46	38:18	0,20
Idade (anos)		42±14	40±25	0,48
GH (ng/mL)		13 (0,6-580)	18 (0,8-220)	0,64
IGF-1*		305 (102-768)	313 (136-728)	0,68
Tumor (micro:macro) (n)		7:101	4:52	0,76
Resposta ao tratamento/Parâmetros (n) (sim:não)				
OCT-LAR	GH	20:28	10:14	0,67
	IGF-1	16:34	7:18	0,40
	GH + IGF-1	13:37	4:20	0,36
OCT-LAR + CAB	GH	13:16	12:11	0,47
	IGF-1	9:21	10:14	0,54
	GH + IGF-1	7:22	6:17	0,66
rs4988487		TT/CT	CC	P
Gênero (F:M) (n)		15:5	86:59	0,17
Idade (anos)		37±7	42±1	0,17
GH (ng/mL)		20 (1,1-143)	14 (0,6-580)	0,74
IGF-1*		263 (102-672)	313 (107-768)	0,42
Tumor (micro:macro) (n)		1:19	10:134	0,88
Resposta ao tratamento/Parâmetros (n) (sim:não)				
OCT-LAR	GH	2:10	28:32	0,33
	IGF-1	3:10	20:42	0,71
	GH + IGF-1	1:11	16:46	0,47
OCT-LAR + CAB	GH	3:4	22:23	0,60
	IGF-1	3:4	16:31	0,97
	GH + IGF-1	1:6	12:33	0,88

Continua...

rs169068		TT/CT	CC	P
Gênero (F:M) (n)		71:43	30:21	0,67
Idade (anos)		42±1,3	41±2,5	0,91
GH (ng/mL)		15 (0,8-580)	13 (0,6-149)	0,35
IGF-1*		304 (120-721)	321 (102-768)	0,62
Tumor (micro:macro) (n)		8:105	3:48	0,76
Resposta ao tratamento/Parâmetros(n) (sim:não)				
OCT-LAR	GH	18:28	12:14	0,36
	IGF-1	14:35	9:17	0,21
	GH + IGF-1	10:38	7:19	0,27
OCT-LAR + CAB	GH	20:19	5:8	0,11
	IGF-1	14:26	5:9	0,73
	GH + IGF-1	10:29	3:10	0,71
rs642249		AA/AG	GG	P
Gênero (F:M) (n)		51:41	49:23	0,10
Idade (anos)		36±3,9	42±0,9	0,34
GH (ng/mL)		26 (1,6-183)	14 (0,6-580)	0,42
IGF-1*		309 (106-728)	305 (102-768)	0,74
Tumor (micro:macro) (n)		0:7	11:146	0,75
Resposta ao tratamento/Parâmetros (n) (sim:não)				
OCT-LAR	GH	0:1	30:41	0,99
	IGF-1	0:1	23:51	0,99
	GH + IGF-1	0:1	17:56	0,99
OCT-LAR + CAB	GH	0:3	25:24	0,99
	IGF-1	1:2	18:33	0,40
	GH + IGF-1	0:3	13:36	0,99

CAB – cabergolina; F – feminino; GH – hormônio de crescimento; IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; LRS – ligante do receptor de somatostatina; M – masculino; macro – macroadenoma; micro – microadenoma; n – amostra; OCT-LAR – octreotida de depósito; (*)IGF-1 – valores expressos em *upper limit normal range* (ULNR); P<0,05.

Anexo H. Análise dos polimorfismos do gene *DRD2* e sua associação com as características clínicas, de imagem e resposta ao tratamento com cabergolina em pacientes com adenoma clinicamente não funcionante

rs1079597		AA	AG	GG	P
Gênero (F:M) (n)		0:1	16:14	25:12	0,22
Idade (anos)		-	50±14	52±12	0,53
Progressão do tumor (%)	Sim (n=6)	0	50	50	0,60
	Não (n=29)	0	31	69	
rs1076560		AA	AC	CC	P
Gênero (F:M) (n)		0:0	12:12	25:9	0,06
Idade (anos)		-	40±12	51±12	0,03*
Progressão do tumor (%)	Sim (n=4)	0	50	50	0,75
	Não (n=25)	0	26	74	
rs1800497		TT	CT	CC	P
Gênero (F:M) (n)		1:1	27:19	14:5	0,48
Idade (anos)		54±9	51±14	51±11	0,93
Progressão do tumor (%)	Sim (n=6)	0	50	50	0,17
	Não (n=27)	4	40	56	
rs6275		TT	CT	CC	P
Gênero (F:M) (n)		5:6	23:13	13:6	0,43
Idade (anos)		52±14	54±14	46±14	0,09
Progressão do tumor (%)	Sim (n=5)	20	80	0	0,01**
	Não (n=28)	21	50	29	
rs1799732		-/-	-/insC	insC/insC	P
Gênero (F:M) (n)		2:2	10:5	25:18	0,77
Idade (anos)		50±11	50±11	52±14	0,93
Progressão do tumor (%)	Sim (n=4)	17	33	50	0,98
	Não (n=25)	4	31	65	

F – feminino; M – masculino; n – amostra; Sim – aumento do volume tumoral em 24 meses; Não – estabilidade e redução do volume tumoral em 24 meses; P – sem ajuste para múltiplos testes. **P ajustado para múltiplos testes (FDR): (*)P_{ajustado}=0,15 e (**)P_{ajustado}=0,05. P<0,05**

Anexo I. Análise dos polimorfismos do gene *DRD2* e sua associação com a resposta ao tratamento com cabergolina em pacientes com adenoma hipofisário funcionante (prolactinomas, somatotrofinomas e corticotrofinomas)

rs1079597		AA/AG	GG	P
Controle hormonal* (n)	Sim	36	67	0,87
	Não	23	43	
rs1076560		AA/AC	CC	P
Controle hormonal* (n)	Sim	27	69	0,36
	Não	22	39	
rs1800497		TT/CT	CC	P
Controle hormonal* (n)	Sim	47	56	0,83
	Não	31	35	
rs6275		TT/CT	CC	P
Controle hormonal* (n)	Sim	61	35	0,10
	Não	34	29	
rs1799732		-/-insC	insC/insC	P
Controle hormonal* (n)	Sim	34	69	0,50
	Não	20	46	

n – amostra; (*) prolactinoma (normalização dos níveis séricos de prolactina); somatotrofinoma (GH <1,0 ng/mL e IGF-1 normal para idade); corticotrofinoma (normalização do cortisol urinário em 24h); P – ajustado para sexo, tamanho tumoral e idade ao diagnóstico <0,05.

Anexo J. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de *DRD2* no grupo com adenomas hipofisários (prolactinomas, somatotrofinomas, corticotrofinomas e adenomas clinicamente não funcionantes) e grupo controle

rs1079597	GG	AG	AA	AA/AG	P
Prolactinoma	94 (64)	46 (31)	7 (5)	53 (36)	0,40
Somatotrofinoma	116 (70)	46 (28)	3 (2)	49 (30)	0,91
ACNF	39 (54)	30 (44)	1(2)	31 (46)	0,008*
Adenomas hipofisários	352 (67)	154 (30)	16 (3)	170 (33)	0,48
Controle	242 (69)	94 (27)	13 (4)	107 (31)	
rs1076560	CC	AC	AA	AA/AC	P
Prolactinoma	93 (68)	41 (30)	2 (2)	43 (32)	0,69
Somatotrofinoma	106 (69)	44 (28)	5 (3)	49 (31)	0,69
ACNF	41 (59)	29 (41)	-	29 (41)	0,08
Adenomas hipofisários	337 (69)	139 (29)	11 (2)	150 (31)	0,89
Controle	226 (70)	83 (26)	12 (4)	95 (30)	
rs1800497	CC	CT	TT	TT/CT	P
Prolactinoma	78 (53)	57 (39)	13 (9)	70 (47)	0,38
Somatotrofinoma	94 (57)	62 (38)	9 (5)	71 (43)	0,25
ACNF	34 (49)	31 (44)	5 (7)	36 (51)	0,41
Adenomas hipofisários	297 (57)	194 (37)	31 (6)	225 (43)	0,049**
Controle	172 (49)	147 (42)	30 (9)	177 (51)	
rs6275	CC	CT	TT	TT/CT	P
Prolactinoma	59 (44)	57 (42)	19 (14)	76 (56)	0,97
Somatotrofinoma	72 (44)	74 (45)	18 (11)	92 (56)	0,79
ACNF	20 (29)	38 (54)	12 (17)	50 (71)	0,52
Adenomas hipofisários	206 (41)	230 (46)	67 (13)	297 (59)	0,71
Controle	150 (43)	157 (45)	42 (12)	199 (57)	
rs1799732	insCinsC	-insC	-/-	-/-/insC	P
Prolactinoma	98 (66)	43 (29)	7 (5)	50 (34)	0,69
Somatotrofinoma	116 (71)	43 (26)	5 (3)	48 (29)	0,59
ACNF	49 (70)	17 (24)	4 (6)	21 (30)	0,86
Adenomas hipofisários	354 (69)	137 (27)	23 (4)	160 (31)	0,77
Controle	196 (72)	72 (26)	5 (2)	77 (28)	

ACNF – adenoma clinicamente não funcionante; valores nominais e (%); P correspondente à avaliação entre grupo controle versus subtipo de adenoma hipofisário na avaliação em dominância (alelo raro em homo e heterozigose versus homozigose alelo frequente) ajustado para idade atual e sexo <0,05; **P ajustado para múltiplos testes (FDR): (*)P_{ajustado}=0,04 e (**)P_{ajustado}=0,09.**

Anexo K. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de *SSTR2* e *SSTR5* nos pacientes com somatotrofinomas e grupo controle

Anexo K1 – Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de *SSTR2* em pacientes com somatotrofinomas e grupo controle

rs998571	TT	TC	CC	CC/CT	P
Somatotrofinoma	84 (51)	66 (40)	15 (9)	81 (49)	0,96
Controle	174 (50)	138 (40)	37 (11)	175 (50)	
rs1466113	CC	CG	GG	CC/CG	P
Somatotrofinoma	66 (40)	77 (47)	22 (13)	99 (60)	0,78
Controle	142 (41)	161 (46)	46 (13)	207 (59)	

valores nominais e (%); P correspondente à avaliação entre grupo controle versus somatotrofinoma em dominância (alelo raro em homo e heterozigose versus homozigose alelo frequente) ajustado para idade atual e sexo <0,05

Anexo K2 – Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de *SSTR5* em pacientes com somatotrofinomas e e grupo controle

rs3751830	CC	CT	TT	TT/CT	P
Somatotrofinoma	56 (34)	75 (45)	34 (21)	109 (66)	0,021*
Controle	156 (45)	144 (41)	49 (14)	193 (55)	
rs4988487	CC	CT	TT	TT/CT	P
Somatotrofinoma	145 (88)	19 (12)	1 (1)	20 (12)	0,54
Controle	316 (91)	31 (9)	2 (1)	33 (9)	
rs169068	CC	CT	TT	TT/CT	P
Somatotrofinoma	51 (31)	69 (42)	45 (27)	114 (69)	0,35
Controle	83 (24)	163 (48)	96 (28)	259 (76)	
rs642249	AA	AG	GG	GG/AG	P
Somatotrofinoma	158 (96)	7 (4)	-	7 (4)	0,72
Controle	328 (96)	14 (4)	-	14 (4)	

valores nominais e (%); P correspondente à avaliação entre grupo controle versus somatotrofinoma em dominância (alelo raro em homo e heterozigose versus homozigose alelo frequente) ajustado para idade atual e sexo <0,05; (*) **P ajustado para múltiplos testes (FDR) = 0,231.**

8 Referências

1. Scheithauer BW, Gaffey TA, Lloyd RV, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, et al. Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas. *Neurosurgery*. 2006;59(2):341-53; discussion -53.
2. Levy A. Molecular and trophic mechanisms of tumorigenesis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(1):23-50, vii.
3. Colao A. Pituitary tumours: the prolactinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009;23(5):575-96.
4. **Bronstein MD**. Disorders of prolactin secretion and prolactinomas. 11 ed. Missouri: Elsevier; 2005.
5. Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A. Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocr Rev*. 2006;27(5):485-534.
6. Molitch ME. Medical treatment of prolactinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1999;28(1):143-69, vii.
7. Verhelst J, Abs R, Maiter D, van den Bruel A, Vandeweghe M, Velkeniers B, et al. Cabergoline in the treatment of hyperprolactinemia: a study in 455 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(7):2518-22.
8. Colao A, Di Sarno A, Landi ML, Cirillo S, Sarnacchiaro F, Faccioli G, et al. Long-term and low-dose treatment with cabergoline induces macroprolactinoma shrinkage. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(11):3574-9.
9. 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. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(6):2247-52.
10. Mancini T, Casanueva FF, Giustina A. Hyperprolactinemia and prolactinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(1):67-99, viii.
11. Delgrange E, Trouillas J, Maiter D, Donckier J, Tourniaire J. Sex-related difference in the growth of prolactinomas: a clinical and proliferation marker study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(7):2102-7.

12. Delgrange E, Vasiljevic A, Wierinckx A, François P, Jouanneau E, Raverot G, et al. Expression of estrogen receptor alpha is associated with prolactin pituitary tumor prognosis and supports the sex-related difference in tumor growth. *Eur J Endocrinol*. 2015;172(6):791-801.
13. Colao A, Sarno AD, Cappabianca P, Briganti F, Pivonello R, Somma CD, et al. Gender differences in the prevalence, clinical features and response to cabergoline in hyperprolactinemia. *Eur J Endocrinol*. 2003;148(3):325-31.
14. Delgrange E, Duprez T, Maiter D. Influence of parasellar extension of macroprolactinomas defined by magnetic resonance imaging on their responsiveness to dopamine agonist therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64(4):456-62.
15. Zada G, Woodmansee WW, Ramkissoon S, Amadio J, Nose V, Laws ER. Atypical pituitary adenomas: incidence, clinical characteristics, and implications. *J Neurosurg*. 2011;114(2):336-44.
16. Pellegrini I, Rasolonjanahary R, Gunz G, Bertrand P, Delivet S, Jedynak CP, et al. Resistance to bromocriptine in prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;69(3):500-9.
17. Duranteau L, Chanson P, Lavoinne A, Horlait S, Lubetzki J, Kuhn JM. Effect of the new dopaminergic agonist CV 205-502 on plasma prolactin levels and tumour size in bromocriptine-resistant prolactinomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1991;34(1):25-9.
18. Molitch ME. Dopamine resistance of prolactinomas. *Pituitary*. 2003;6(1):19-27.
19. 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. *Eur J Endocrinol*. 2009;160(5):747-52.
20. Dekkers OM, Lagro J, Burman P, Jørgensen JO, Romijn JA, Pereira AM. Recurrence of hyperprolactinemia after withdrawal of dopamine agonists: systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(1):43-51.
21. 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. *Eur J Endocrinol*. 2012;167(5):651-62.

22. Primeau V, Raftopoulos C, Maiter D. Outcomes of transsphenoidal surgery in prolactinomas: improvement of hormonal control in dopamine agonist-resistant patients. *Eur J Endocrinol*. 2012;166(5):779-86.
23. Johnston DG, Hall K, Kendall-Taylor P, Ross WM, Crombie AL, Cook DB, et al. The long-term effects of megavoltage radiotherapy as sole or combined therapy for large prolactinomas: studies with high definition computerized tomography. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1986;24(6):675-85.
24. Alexander L, Appleton D, Hall R, Ross WM, Wilkinson R. Epidemiology of acromegaly in the Newcastle region. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1980;12(1):71-9.
25. Mestron A, Webb SM, Astorga R, Benito P, Catala M, Gaztambide S, et al. Epidemiology, clinical characteristics, outcome, morbidity and mortality in acromegaly based on the Spanish Acromegaly Registry (Registro Espanol de Acromegalia, REA). *Eur J Endocrinol*. 2004;151(4):439-46.
26. Giustina A, Barkan A, Casanueva FF, Cavagnini F, Frohman L, Ho K, et al. Criteria for cure of acromegaly: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(2):526-9.
27. Katznelson L, Laws ER, Melmed S, Molitch ME, Murad MH, Utz A, et al. Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11):3933-51.
28. Vieira Neto L, Abucham J, Araujo LA, Boguszewski CL, Bronstein MD, Czepielewski M, et al. [Recommendations of Neuroendocrinology Department from Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism for diagnosis and treatment of acromegaly in Brazil]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011;55(9):725-6.
29. Ahmed S, Elsheikh M, Stratton IM, Page RC, Adams CB, Wass JA. Outcome of transphenoidal surgery for acromegaly and its relationship to surgical experience. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999;50(5):561-7.
30. Laws ER, Vance ML, Thapar K. Pituitary surgery for the management of acromegaly. *Horm Res*. 2000;53 Suppl 3:71-5.
31. Melmed S. Medical progress: Acromegaly. *N Engl J Med*. 2006;355(24):2558-73.
32. Kim EH, Oh MC, Lee EJ, Kim SH. Predicting long-term remission by measuring immediate postoperative growth hormone levels and oral glucose tolerance test in acromegaly. *Neurosurgery*. 2012;70(5):1106-13; discussion 13.

-
33. Giustina A, Chanson P, Bronstein MD, Klibanski A, Lamberts S, Casanueva FF, et al. A consensus on criteria for cure of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7):3141-8.
 34. Carmichael JD, Bonert VS, Nuño M, Ly D, Melmed S. Acromegaly clinical trial methodology impact on reported biochemical efficacy rates of somatostatin receptor ligand treatments: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(5):1825-33.
 35. Colao A, Ferone D, Marzullo P, Di Sarno A, Cerbone G, Sarnacchiaro F, et al. Effect of different dopaminergic agents in the treatment of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(2):518-23.
 36. Abs R, Verhelst J, Maiter D, Van Acker K, Nobels F, Coolens JL, et al. Cabergoline in the treatment of acromegaly: a study in 64 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(2):374-8.
 37. 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.
 38. Sandret L, Maison P, Chanson P. Place of cabergoline in acromegaly: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(5):1327-35.
 39. Freda PU, Gordon MB, Kelepouris N, Jonsson P, Koltowska-Haggstrom M, van der Lely AJ. Long-term treatment with pegvisomant as monotherapy in patients with acromegaly: experience from ACROSTUDY. *Endocr Pract.* 2015;21(3):264-74.
 40. Neggers SJ, Franck SE, de Rooij FW, Dallenga AH, Poublon RM, Feelders RA, et al. Long-term efficacy and safety of pegvisomant in combination with long-acting somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(10):3644-52.
 41. Karavitaki N, Turner HE, Adams CB, Cudlip S, Byrne JV, Fazal-Sanderson V, et al. Surgical debulking of pituitary macroadenomas causing acromegaly improves control by lanreotide. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68(6):970-5.
 42. Jallad RS, Musolino NR, Kodaira S, Cescato VA, Bronstein MD. Does partial surgical tumour removal influence the response to octreotide-LAR in acromegalic patients previously resistant to the somatostatin analogue? *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67(2):310-5.

43. Pivonello R, De Martino MC, De Leo M, Lombardi G, Colao A. Cushing's Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(1):135-49, ix.
44. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(5):1526-40.
45. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(5):1526-40.
46. Newell-Price J. Diagnosis of Cushing's syndrome: comparison of the specificity of first-line biochemical tests. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4(4):192-3.
47. Tritos NA, Biller BM, Swearingen B. Management of Cushing disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(5):279-89.
48. Lamberts SW, Klijn JG, de Quijada M, Timmermans HA, Uitterlinden P, de Jong FH, et al. The mechanism of the suppressive action of bromocriptine on adrenocorticotropin secretion in patients with Cushing's disease and Nelson's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980;51(2):307-11.
49. Mercado-Asis LB, Yasuda K, Murayama M, Mune T, Morita H, Miura K. Beneficial effects of high daily dose bromocriptine treatment in Cushing's disease. *Endocrinol Jpn*. 1992;39(4):385-95.
50. Morris D, Grossman A. The medical management of Cushing's syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;970:119-33.
51. Pivonello R, Ferone D, de Herder WW, Kros JM, De Caro ML, Arvigo M, et al. Dopamine receptor expression and function in corticotroph pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(5):2452-62.
52. de Bruin C, Pereira AM, Feelders RA, Romijn JA, Roelfsema F, Sprij-Mooij DM, et al. Coexpression of dopamine and somatostatin receptor subtypes in corticotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1118-24.
53. 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. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(1):223-30.

-
54. Godbout A, Manavela M, Danilowicz K, Beauregard H, Bruno OD, Lacroix A. Cabergoline monotherapy in the long-term treatment of Cushing's disease. *Eur J Endocrinol*. 2010;163(5):709-16.
 55. Vilar L, Naves LA, Azevedo MF, Arruda MJ, Arahata CM, Moura E Silva L, et al. Effectiveness of cabergoline in monotherapy and combined with ketoconazole in the management of Cushing's disease. *Pituitary*. 2010;13(2):123-9.
 56. Barbot M, Albiger N, Ceccato F, Zilio M, Frigo AC, Denaro L, et al. Combination therapy for Cushing's disease: effectiveness of two schedules of treatment: should we start with cabergoline or ketoconazole? *Pituitary*. 2014;17(2):109-17.
 57. Lamberts SW, Zuyderwijk J, den Holder F, van Koetsveld P, Hofland L. Studies on the conditions determining the inhibitory effect of somatostatin on adrenocorticotropin, prolactin and thyrotropin release by cultured rat pituitary cells. *Neuroendocrinology*. 1989;50(1):44-50.
 58. Ambrosi B, Bochicchio D, Fadin C, Colombo P, Faglia G. Failure of somatostatin and octreotide to acutely affect the hypothalamic-pituitary-adrenal function in patients with corticotropin hypersecretion. *J Endocrinol Invest*. 1990;13(3):257-61.
 59. Batista DL, Zhang X, Gejman R, Ansell PJ, Zhou Y, Johnson SA, et al. The effects of SOM230 on cell proliferation and adrenocorticotropin secretion in human corticotroph pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(11):4482-8.
 60. 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. *N Engl J Med*. 2012;366(10):914-24.
 61. Bertagna X, Guignat L. Approach to the Cushing's disease patient with persistent/recurrent hypercortisolism after pituitary surgery. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(4):1307-18.
 62. Pivonello R, De Leo M, Cozzolino A, Colao A. The Treatment of Cushing's Disease. *Endocr Rev*. 2015;36(4):385-486.
 63. Molitch ME. Nonfunctioning pituitary tumors and pituitary incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(1):151-71, xi.

-
64. Ferrante E, Ferraroni M, Castrignanò 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. *Eur J Endocrinol*. 2006;155(6):823-9.
 65. Freda PU, Beckers AM, Katznelson L, Molitch ME, Montori VM, Post KD, et al. Pituitary incidentaloma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(4):894-904.
 66. 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. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(4):1674-83.
 67. 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.
 68. Greenman Y, Tordjman K, Osher E, Veshchev I, Shenkerman G, Reider-Groswasser II, et al. Postoperative treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists decreases tumour remnant growth. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;63(1):39-44.
 69. 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(3):173-8.
 70. Batista R, Cunha-Neto M, Musolino N, Borba C, Cescato V, Silva G, et al. Cabergoline therapy in clinically nonfunctioning pituitary adenoma: results of a clinical trial. 18th European Congress of Endocrinology. Munich, Germany: European Society of Endocrinology; 2016.
 71. Taboada GF, Luque RM, Bastos W, Guimarães RF, Marcondes JB, Chimelli LM, et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*. 2007;156(1):65-74.
 72. Colao A, Lastoria S, Ferone D, Varrella P, Marzullo P, Pivonello R, et al. The pituitary uptake of (111)In-DTPA-D-Phe1-octreotide in the normal pituitary and in pituitary adenomas. *J Endocrinol Invest*. 1999;22(3):176-83.

73. Andersen M, Bjerre P, Schrøder HD, Edal A, Høilund-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. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;54(1):23-30.
74. Colao A, Filippella M, Di Somma C, Manzi S, Rota F, Pivonello R, et al. Somatostatin analogs in treatment of non-growth hormone-secreting pituitary adenomas. *Endocrine*. 2003;20(3):279-83.
75. Greenman Y, Stern N. Non-functioning pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009;23(5):625-38.
76. Ben-Shlomo A, Melmed S. Somatostatin agonists for treatment of acromegaly. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;286(1-2):192-8.
77. Colao A, Pivonello R, Auriemma RS, Briganti F, Galdiero M, Tortora F, et al. Predictors of tumor shrinkage after primary therapy with somatostatin analogs in acromegaly: a prospective study in 99 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2112-8.
78. Greenman Y, Cooper O, Yaish I, Robenshtok E, Sagiv N, Jonas-Kimchi T, et al. Treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists. *Eur J Endocrinol*. 2016;175(1):63-72.
79. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev*. 2001;22(6):724-63.
80. 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. *EMBO J*. 1989;8(13):4025-34.
81. Filopanti M, Lania AG, Spada A. Pharmacogenetics of D2 dopamine receptor gene in prolactin-secreting pituitary adenomas. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010;6(1):43-53.
82. Le Foll B, Gallo A, Le Strat Y, Lu L, Gorwood P. Genetics of dopamine receptors and drug addiction: a comprehensive review. *Behav Pharmacol*. 2009;20(1):1-17.
83. Passos VQ, Fortes MA, Giannella-Neto D, Bronstein MD. Genes differentially expressed in prolactinomas responsive and resistant to dopamine agonists. *Neuroendocrinology*. 2009;89(2):163-70.

-
84. Caccavelli L, Feron F, Morange I, Rouer E, Benarous R, Dewailly D, et al. Decreased expression of the two D2 dopamine receptor isoforms in bromocriptine-resistant prolactinomas. *Neuroendocrinology*. 1994;60(3):314-22.
 85. Wu ZB, Zheng WM, Su ZP, Chen Y, Wu JS, Wang CD, et al. Expression of D2RmRNA isoforms and ERmRNA isoforms in prolactinomas: correlation with the response to bromocriptine and with tumor biological behavior. *J Neurooncol*. 2010;99(1):25-32.
 86. Caccavelli L, Morange-Ramos I, Kordon C, Jaquet P, Enjalbert A. Alteration of G alpha subunits mRNA levels in bromocriptine resistant prolactinomas. *J Neuroendocrinol*. 1996;8(10):737-46.
 87. 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. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):967-77.
 88. Filopanti M, Barbieri AM, Angioni AR, Colao A, Gasco V, Grottoli S, et al. Dopamine D2 receptor gene polymorphisms and response to cabergoline therapy in patients with prolactin-secreting pituitary adenomas. *Pharmacogenomics J*. 2008;8(5):357-63.
 89. Ritchie T, Noble EP. Association of seven polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene with brain receptor-binding characteristics. *Neurochem Res*. 2003;28(1):73-82.
 90. Hansen KA, Zhang Y, Colver R, Tho SP, Plouffe L, McDonough PG. The dopamine receptor D2 genotype is associated with hyperprolactinemia. *Fertil Steril*. 2005;84(3):711-8.
 91. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet*. 2003;12(3):205-16.
 92. Meyers JL, Nyman E, Loukola A, Rose RJ, Kaprio J, Dick DM. The association between DRD2/ANKK1 and genetically informed measures of alcohol use and problems. *Addict Biol*. 2013;18(3):523-36.
 93. Liu L, Fan D, Ding N, Hu Y, Cai G, Wang L, et al. The relationship between DRD2 gene polymorphisms (C957T and C939T) and schizophrenia: a meta-analysis. *Neurosci Lett*. 2014;583:43-8.

-
94. Ilhan M, Kahraman OT, Turan S, Turgut S, Karaman O, Zeybek U, et al. Does DRD2 polymorphism influence the clinical characteristics of prolactinoma? *Ann Endocrinol (Paris)*. 2015;76(5):614-9.
 95. Eisenstein SA, Bogdan R, Love-Gregory L, Corral-Frías NS, Koller JM, Black KJ, et al. Prediction of striatal D2 receptor binding by DRD2/ANKK1 TaqIA allele status. *Synapse*. 2016.
 96. Jönsson EG, Nöthen MM, Grünhage F, Farde L, Nakashima Y, Propping P, et al. Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol Psychiatry*. 1999;4(3):290-6.
 97. Noble EP, Blum K, Ritchie T, Montgomery A, Sheridan PJ. Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with receptor-binding characteristics in alcoholism. *Arch Gen Psychiatry*. 1991;48(7):648-54.
 98. Pohjalainen T, Rinne JO, Någren K, Lehtikainen P, Anttila K, Syvälahti EK, et al. The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol Psychiatry*. 1998;3(3):256-60.
 99. Thompson J, Thomas N, Singleton A, Piggott M, Lloyd S, Perry EK, et al. D2 dopamine receptor gene (DRD2) Taq1 A polymorphism: reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele. *Pharmacogenetics*. 1997;7(6):479-84.
 100. Laruelle M, Gelernter J, Innis RB. D2 receptors binding potential is not affected by Taq1 polymorphism at the D2 receptor gene. *Mol Psychiatry*. 1998;3(3):261-5.
 101. Hirvonen MM, Laakso A, Någren K, Rinne JO, Pohjalainen T, Hietala J. C957T polymorphism of dopamine D2 receptor gene affects striatal DRD2 in vivo availability by changing the receptor affinity. *Synapse*. 2009;63(10):907-12.
 102. Hirvonen MM, Lumme V, Hirvonen J, Pesonen U, Någren K, Vahlberg T, et al. C957T polymorphism of the human dopamine D2 receptor gene predicts extrastriatal dopamine receptor availability in vivo. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33(4):630-6.

103. Zhang Y, Bertolino A, Fazio L, Blasi G, Rampino A, Romano R, et al. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(51):20552-7.
104. Bertolino A, Fazio L, Caforio G, Blasi G, Rampino A, Romano R, et al. Functional variants of the dopamine receptor D2 gene modulate prefronto-striatal phenotypes in schizophrenia. *Brain*. 2009;132(Pt 2):417-25.
105. Bertolino A, Taurisano P, Pisciotto NM, Blasi G, Fazio L, Romano R, et al. Genetically determined measures of striatal D2 signaling predict prefrontal activity during working memory performance. *PLoS One*. 2010;5(2):e9348.
106. Bronstein MD. Acromegaly: molecular expression of somatostatin receptor subtypes and treatment outcome. *Front Horm Res*. 2006;35:129-34.
107. Petersenn S, Schopohl J, Barkan A, Mohideen P, Colao A, Abs R, et al. Pasireotide (SOM230) demonstrates efficacy and safety in patients with acromegaly: a randomized, multicenter, phase II trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2781-9.
108. Cuevas-Ramos D, Fleseriu M. Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(3):R223-40.
109. Teixeira R, Rios R, Costoya JA, Castro R, Bello JL, Devesa J, et al. Activation of human somatostatin receptor 2 promotes apoptosis through a mechanism that is independent from induction of p53. *Cell Physiol Biochem*. 2002;12(1):31-8.
110. Theodoropoulou M, Stalla GK. Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol*. 2013;34(3):228-52.
111. Howlett TA, Willis D, Walker G, Wass JA, Trainer PJ, (UKAR-3) UARSG. Control of growth hormone and IGF1 in patients with acromegaly in the UK: responses to medical treatment with somatostatin analogues and dopamine agonists. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(5):689-99.
112. Gadelha MR, Kasuki L, Korbonits M. Novel pathway for somatostatin analogs in patients with acromegaly. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(5):238-46.

113. Heck A, Ringstad G, Fougner SL, Casar-Borota O, Nome T, Ramm-Pettersen J, et al. Intensity of pituitary adenoma on T2-weighted magnetic resonance imaging predicts the response to octreotide treatment in newly diagnosed acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77(1):72-8.
114. 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.
115. 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. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(2):781-92.
116. Ballarè E, Persani L, Lania AG, Filopanti M, Giammona E, Corbetta S, et al. Mutation of somatostatin receptor type 5 in an acromegalic patient resistant to somatostatin analog treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(8):3809-14.
117. Lania A, Mantovani G, Spada A. Genetic abnormalities of somatostatin receptors in pituitary tumors. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;286(1-2):180-6.
118. Filopanti M, Ronchi C, Ballarè E, Bondioni S, Lania AG, Losa M, et al. Analysis of somatostatin receptors 2 and 5 polymorphisms in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(8):4824-8.
119. Hofland LJ, Lamberts SW. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocr Rev*. 2003;24(1):28-47.
120. Casarini AP, 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.
121. Ciganoka D, Balcere I, Kapa I, Peculis R, Valtère A, Nikitina-Zake L, et al. Identification of somatostatin receptor type 5 gene polymorphisms associated with acromegaly. *Eur J Endocrinol*. 2011;165(4):517-25.
122. Filopanti M, Ballarè E, Lania AG, Bondioni S, Verga U, Locatelli M, et al. Loss of heterozygosity at the SS receptor type 5 locus in human GH- and TSH-secreting pituitary adenomas. *J Endocrinol Invest*. 2004;27(10):937-42.

-
123. Torrisani J, Bouisson M, Puente E, Capellà G, Laurent-Puig P, Berger A, et al. Transcription of SST2 somatostatin receptor gene in human pancreatic cancer cells is altered by single nucleotide promoter polymorphism. *Gastroenterology*. 2001;120(1):200-9.
 124. Zhou G, Gingras MC, Liu SH, Sanchez R, Edwards D, Dawson D, et al. SSTR5 P335L monoclonal antibody differentiates pancreatic neuroendocrine neuroplasms with different SSTR5 genotypes. *Surgery*. 2011;150(6):1136-42.
 125. 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. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(11):5256-61.
 126. Molitch ME. Pharmacologic resistance in prolactinoma patients. *Pituitary*. 2005;8(1):43-52.
 127. Need AC, Motulsky AG, Goldstein DB. Priorities and standards in pharmacogenetic research. *Nat Genet*. 2005;37(7):671-81.
 128. Jönsson EG, Nöthen MM, Neidt H, Forslund K, Rylander G, Mattila-Evenden M, et al. Association between a promoter polymorphism in the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia. *Schizophr Res*. 1999;40(1):31-6.
 129. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
 130. Kleibaum D. Logistic Regression: a self-learning tex. New York: Spring Verlag; 1994.
 131. **Benjamini Y, Hochberg Y.** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**1995. 289-300 p.
 132. Heinze G. A comparative investigation of methods for logistic regression with separated or nearly separated data. *Stat Med*. 2006;25(24):4216-26.
 133. Colao A, Loche S. Prolactinomas in children and adolescents. *Endocr Dev*. 2010;17:146-59.

-
134. Bhayana S, Booth GL, Asa SL, Kovacs K, Ezzat S. The implication of somatotroph adenoma phenotype to somatostatin analog responsiveness in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):6290-5.
 135. Kiseljak-Vassiliades K, Shafi S, Kerr JM, Phang TL, Kleinschmidt-DeMasters BK, Wierman ME. Clinical implications of growth hormone-secreting tumor subtypes. *Endocrine.* 2012;42(1):18-28.
 136. Puig-Domingo M, Resmini E, Gomez-Anson B, Nicolau J, Mora M, Palomera E, et al. Magnetic resonance imaging as a predictor of response to somatostatin analogs in acromegaly after surgical failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(11):4973-8.
 137. Amendt BA, Sutherland LB, Russo AF. Transcriptional antagonism between Hmx1 and Nkx2.5 for a shared DNA-binding site. *J Biol Chem.* 1999;274(17):11635-42.
 138. Doeiring A, Hentig N, Graff J, Salamat S, Schmidt M, Geisslinger G, et al. Genetic variants altering dopamine D2 receptor expression or function modulate the risk of opiate addiction and the dosage requirements of methadone substitution. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19(6):407-14.
 139. Garcia-Tornadú I, Perez-Millan MI, Recouvreux V, Ramirez MC, Luque G, Risso GS, et al. New insights into the endocrine and metabolic roles of dopamine D2 receptors gained from the *Drd2* mouse. *Neuroendocrinology.* 2010;92(4):207-14.
 140. Cristina C, García-Tornadú I, Díaz-Torga G, Rubinstein M, Low MJ, Becú-Villalobos D. Dopaminergic D2 receptor knockout mouse: an animal model of prolactinoma. *Front Horm Res.* 2006;35:50-63.
 141. Peculis R, Balcere I, Rovite V, Megnis K, Valtere A, Stukens J, et al. Polymorphisms in *MEN1* and *DRD2* genes are associated with the occurrence and characteristics of pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol.* 2016;175(2):145-53.