Daniella de Jesus Patrick Carminatti Romanholi

Efeito da administração de octreotide, cabergolina e a associação de ambos nos níveis de ACTH e cortisol em pacientes com doença de Cushing : correlação da resposta clínica com a expressão tumoral dos receptores de dopamina (*DRD2*) e de somatostatina (*SSTR2* e *SSTR5*)

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

Programa de Endocrinologia

Orientador: Dr. Luiz Roberto Salgado

Co-orientadora: Dra. Maria Lúcia Corrêa Giannella

SÃO PAULO

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Romanholi, Daniella de Jesus Patrick Carminatti
Efeito da administração de octreotide, cabergolina e a associação de ambos nos níveis de ACTH e cortisol em pacientes com doença de Cushing : correlação da resposta clínica com a expressão tumoral dos receptores de dopamina (DRD2) e de somatostatina (SSTR2 e SSTR5) / Daniella de Jesus Patrick Carminatti Romanholi. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.
Orientador: Luiz Roberto Salgado.
Co-orientadora: Maria Lúcia Corrêa Giannella.

Descritores: 1.Síndrome de Cushing 2.Octreotida 3.Cabergolina 4.Receptores de somatostatina 5.Receptores de dopamina D 6.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD-181/10

Este trabalho foi desenvolvido:

na Unidade de Neuroendocrinologia da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP

no Laboratório de Investigação Médica LIM-25

Aos meus dois grandes amores: Jefferson e Gabriel.

Aos meus amados pais: Sonia e Ideval.

À minha amada irmã: Vanessa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Ao meu anjinho Gabriel de Jesus pela paciência que teve com sua mamãe. Por ter me ensinado a maior dimensão do amor. Por ter me alegrado com seu sorriso e me fortalecido a continuar lutando por tudo aquilo que me parecia impossível. Você é o maior presente que Deus me deu.

Ao meu amado marido Jefferson Romanholi, a pessoa mais maravilhosa e boa que já conheci em toda minha vida. O meu companheiro de sempre. “Na alegria e na tristeza. Na saúde e na doença. Amando-me e me respeitando em todos os dias de nossas vidas”. Isso te lembra alguma coisa, meu amor? Também te amo maior que o infinito.

Aos meus queridos pais Sonia Maria Patrick Carminatti e Ideval Carminatti por todo amor, carinho, ensinamentos e por serem o meu exemplo de luta e garra. Tenho muito orgulho de vocês. Obrigada por terem me dado educação e os estudos que me proporcionaram chegar hoje até aqui. Tudo isso apenas foi possível por vocês existirem. Amo muito vocês.

À minha querida irmã Vanessa de Jesus Patrick Carminatti Duarte por toda sua doçura, conselhos, carinho e amizade. Parabéns por ser um exemplo de bondade e humildade. Amo-te muito, minha irmã.

Aos meus estimados sogros Sueli Romero Romanholi e Odilon Romanholi por me considerarem como filha, pelo apoio e carinho e por terem trazido ao mundo o grande amor da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Luiz Roberto Salgado pela orientação, conhecimento, confiança, apoio e paciência com as minhas inseguranças.

Á Dra. Maria Lúcia Correa Giannella pela co-orientação, atenção, capacidade e conhecimento. Malú, obrigada por me auxiliar nos momentos em que mais precisei.

Ao Dr. Daniel Giannella que fez toda análise estatística de meu estudo e me deu muita atenção em todos os momentos em que solicitei.

Aos meus colegas da neuroendocrinologia pelo companherismo, apoio, coleguismo e amizade: Márcio Carlos Machado, Diane Paraíba, Andrea Glezer, Raquel Jallad, Daniel Vicária e Felipe Gaia Duarte. Também meu querido cunhado por quem tenho profunda admiração.

Ao Prof. Dr. Marcello Delano Bronstein pela recepção em sua equipe, pelos ensinamentos e carinho.

A doce Thais Chile com quem pude contar nos momentos mais difíceis desse trabalho, me ensinando pacientemente os procedimentos de biologia molecular. Parabéns pela humildade e carinho.

Ao biomédico Ricardo Rodrigues Giorgi que me auxiliou muito na biologia molecular, assim como a bióloga Maria Ângela Zanella Fortes que com muita paciência me auxiliou na técnica de RT-PCR.

Ao Dr. Valter Ângelo S. Cescato pelo auxílio na coleta dos fragmentos tumorais.

À Dra. Nina Rosa Musolino e ao Dr. Malebranche Berardo Neto por cederem fragmentos tumorais dos pacientes que eles acompanhavam na Unidade de Neuroendocrinologia da Divisão de Neurocirurgia do HC-FMUSP. Aproveito para dizer que tenho muita admiração por vocês.

À Dra. Maria Cândida Fragoso e sua aluna Luciana Brito por terem cedido fragmentos tumorais de seus pacientes.

Ao Dr. Iberê Cauduro Soares e ao Prof. Dr. Venâncio Alves do Departamento de Patologia pela colaboração e realização do estudo de imunohistoquímica.

A todos os amigos do LIM-25 pelo apoio, dedicação, paciência e carinho.

À Dra. Emília Modolo Pinto pelos conselhos e por me auxiliar nos procedimentos de biologia molecular e na utilização do equipamento *Bioanalyzer.*

Aos prezados secretários da Disciplina de Endocrinologia pela atenção e dedicação: Rubens, Márcia, Cida e Rosana.

Aos pacientes que participaram desse trabalho por terem contribuído para o nosso aprendizado. Sem vocês nada disso seria possível.

A todos que contribuíram de alguma forma na elaboração e finalização deste trabalho

E, principalmente, a Deus por ter me dado forças, saúde, luz e sabedoria durante todos os dias da minha vida. Sinto sua presença agora e sempre.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP.* Elaboração por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A.L.Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

Sumário

Lista de siglas e abreviaturas
Lista de símbolos
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
Summary

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Definições 2
1.2 Histórico 3
1.3 Epidemiologia 4
1.4 Manifestações Clínicas da Doença de Cushing 5
1.5 Diagnóstico da Doença de Cushing 7
1.6 Tratamento da Doença de Cushing 9
1.6.1 Tratamento Cirúrgico Inicial 9
1.6.2 Tratamento Cirúrgico para Doença Recorrente ou Persistente 10
1.6.3 Radioterapia 10
1.6.4 Adrenalectomia Bilateral 11
1.6.5 Tratamento Medicamentoso 12
1.6.5.1 Cetoconazol 13
1.6.5.2 Metirapona 14
1.6.5.3 Aminoglutetimida 14
1.6.5.4 Mitotane 15
1.6.5.5 Etomidato 15
1.6.5.6 Ácido Retinóico 15
1.6.5.7 Valproato de Sódio 17
1.6.5.8 Agonistas do Receptor PPARγ 17
1.6.5.9 Ciproeptadina 17
1.6.5.10 Ritanserina 18
1.6.5.11 Antagonista do Receptor de Cortisol 18
1.6.5.12 Agonistas dopaminérgicos 19
1.6.5.13 Análogos de Somatostatina 22
1.6.5.14 Associação entre Análogos da Somatostatina e Agonistas Dopaminérgicos 27

2 OBJETIVOS.....30

3 MÉTODOS.....32

3.1 Aspectos Éticos.....33

3.2 Pacientes e Amostras 33

3.3 Protocolo de Tratamento e Avaliação Laboratorial 37

3.4 Metodologia.....39

3.4.1 Extração de RNA Total 39

3.4.2 Síntese do cDNA e RT-PCR Semiquantitativa do Gene *GAPDH*.....41

3.4.3 RT-PCR Semiquantitativa dos Genes *PIT-1, T-PIT e GAPDH*.....43

3.4.4 qRT-PCR dos Genes em Estudo.....44

3.4.5 Micromatriz tecidual (TMA) e Imunohistoquímica.....48

3.5 Análise Estatística.....52

4 RESULTADOS 54

4.1 Resposta Hormonal e Clínica ao Protocolo de Tratamento 55

4.2 Análise Molecular.....63

4.2.1 Expressão dos Genes *SSTR2*, *SSTR5* e *DRD2*.....70

4.3 Imunohistoquímica 72

5 DISCUSSÃO.....77

6 CONCLUSÃO 89

7 ANEXOS.....91

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....92

ANEXO B - Aprovação pela Comissão de Pesquisa e Pós-graduação do Departamento de Clínica Médica da FMUSP e pela Comissão de Ética para a Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP 96

ANEXO C - Autorização Concedida pelo Serviço de Verificação de Óbitos da Cidade de São Paulo 97

8 REFERÊNCIAS 98

Lista de Siglas e Abreviaturas

Lista de Siglas e Abreviaturas

aa	aminoácido
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AIMAH	hiperplasia adrenal macronodular ACTH-independente
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
BRG1	brm/SWI2-related gene-1
CAPPesq	Comissão de Ética para a Análise de Projetos de Pesquisa
CBSSPI	cateterismo bilateral e simultâneo de seios petrosos inferiores
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
5-HT	serotonina
COUP-TF	*chicken ovoalbumin ipstriannomoter transcription factor* 1
CP	ponto de cruzamento do ciclo - *cross point*
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
CYP	*cytochrome p450*
CT	limiar do ciclo - *threshold cycle*
DC	doença de Cushing
DDAVP	1-deamino 8 -D-arginina, vasopressina-
DM	diabetes mellitus
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAse	desoxyribonuclease
DR	receptor de dopamina
EGFR	*epidermal growth factor receptor*

et al.	e outros
EtBr	brometo de etídio
F	cortisol
GABA	gama-amino-butírico
GAPDH	gliceraldeído trifostato desidrogenase
GC	glicorticorticoide
GPRs	receptores acoplados à proteína G
GR	receptor de glicocorticoide
GRE	elementos responsivos ao glicocorticóide
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
hCRH	hormônio liberador de corticotrofina humano
HHA	hipotálamo-hipófise-adrenal
IV	intravenoso
MSH	*melanocyte stimulating hormone*
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
NL	normal
NR	não realizado
oCRH	hormônio liberador de corticotrofina ovino
11β- HSD1	11β-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PIT1	fator de transcrição específico de hipófise tipo 1
PKC	proteína C quinase

PO	pós-operatório
POMC	pró-opiomelanocortina
PPARγ	*peroxisome proliferator activated receptor -γ*
PPNAD	doença adrenal nodular primária pigmentada
PRL	prolactina
PTP	fosfotirosina fosfatase
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
RIA	radiomunoensaio
RM	ressonância magnética
RNA	ácido ribonucléico
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
SC	síndrome de Cushing
SEA	secreção ectópica de ACTH
SNC	sistema nervoso central
SST	somatostatina
SSTRs	receptores de somatostatina
TA	temperatura ambiente
TPIT	gene T pituitary
3HmgCoA	3 hidroxi-3 metil-glutaril-coAredutase
UV	luz ultravioleta
VO	via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

Lista de Símbolos

°C	grau Celsius
cm	centímetro
=	igual a
>	maior que
±	mais ou menos
<	menor que
µg	micrograma
µL	microlitro
%	porcento
d	dia
dL	decilitro
h	hora
kb	quilobase
kg	quilograma
L	litro
m^2	metro quadrado
mg	miligrama
min	minuto
mL	militro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetros

p	significância estatística
pg	picograma
RIN	número de integridade do RNA
rpm	rotação por minuto
s	segundo
sem	semana
V	volume

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1 - Receptor acoplado à Proteína G. Tanto a somatostatina quanto a dopamina apresentam receptores acoplados à Proteína G que podem sofrer dimerização. Adaptado de Maggio et al. (2005) 28

Figura 2 - Protocolo de tratamento dos pacientes.....38

Figura 3 - Evolução hormonal (cortisol urinário) dos pacientes nos diferentes momentos do tratamento (basal, após 30 dias de octreotide isoladamente, após 30 dias de cabergolina isoladamente e após 30 dias da associação entre octreotide e cabergolina)..... 58

Figura 4 - Gel representativo da integridade do RNA total de três amostras de hipófise normal (HN6, HN7 e HN9) e três amostras de tumor corticotrófico (LB, PRM e ISF), em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídeo. As setas indicam as subunidades 28S e 18S dos RNAs ribossomais. Tu, tumor; HN, hipófise normal; CN, controle negativo; pb, pares de bases 63

Figura 5 - Exemplos da avaliação da qualidade e integridade do RNA de alguns tumores corticotróficos através do *Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies,* Palo Alto, CA, USA). As setas indicam as subunidades 28S e 18S dos RNAs ribossomais. RIN, número de integridade do RNA.....64

Figura 6 - Amplificação do gene *T-PIT* por RT-PCR semiquantitativa em amostras de tecidos tumorais corticotróficos, visualizados em gel de agarose 2,0 % corado com brometo de etídeo. Pacientes GCV e MSR não apresentaram amplificação do gene *T-PIT* e foram excluídos da análise molecular. pb, pares de bases 65

Figura 7 - Amplificação do gene *PIT-1* por RT-PCR semiquantitativa em amostras de tecidos tumorais corticotróficos, visualizados em gel de agarose 2,0 % corado com brometo de etídeo. Pacientes MSR e FML apresentaram amplificação do gene *PIT-1* e foram excluídos da análise molecular. pb, pares de bases.....65

Figura 8 - Amplificação do gene *GAPDH* por RT-PCR semiquantitativa em amostras de tecidos normais e de tumores corticotróficos de pacientes tratados e do grupo controle, visualizados em gel de agarose 2,0 % corado com brometo de etídeo. pb, pares de bases 66

Figura 9 - Fluxograma de inclusão dos pacientes com doença de Cushing para o estudo molecular e avaliação pela imunohistoquímica. IHC, imunohistoquímica 67

Figura 10 - Curvas de dissociação dos genes *SSTR2* (painel A), *DRD2* (painel B) e *GAPDH* (painel C) 68

Figura 11 - Gel representativo da amplificação dos genes alvo *SSTR2* (3 e 4) = 170 pb, e *DRD2* (5 e 6) = 154 pb e do gene controle *GAPDH* (1 e 2) = 281 pb em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio para verificar a amplificação de produtos inespecíficos. PM, peso molecular, pb, pares de bases 69

Figura 12 - Determinação da eficiência de amplificação (*slope*) dos genes *SSTR2* (painel A) e *DRD2* (painel B), em relação ao gene controle *GAPDH* 70

Figura 13 - Expressão do mRNA do gene *SSTR2* nas amostras dos tumores corticotróficos no grupo controle e no grupo tratado. A diferença entre as expressões nos dois grupos não foi estatisticamente significante (P = 0,909) 71

Figura 14 - Expressão do mRNA do gene *DRD2* nas amostras dos tumores corticotróficos no grupo controle e no grupo tratado. A diferença entre as expressões nos dois grupos foi estatisticamente significante (P = 0,036) 71

Figura 15 - Imunorreatividade para SSTR2 (400X). A, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente MARO classificada como 0. B, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente ACB classificada como 1+. C, imunorreatividade de uma hipófise normal classificada como 1+. D, imunorreatividade de um somatotrofinoma utilizado como controle classificada como 4+ 73

Figura 16 - Correlação entre a expressão do mRNA do gene *SSTR2* e a expressão da proteína SSTR2 pela técnica de imunohistoquímica (P = 0,021) 73

Figura 17 - Imunorreatividade para DRD2 (400X). A, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente IF classificada como 0. B, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente CMR classificada como 1+. C, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente MARO classificada como 4+. D, imunorreatividade de uma hipófise normal utilizada como controle classificada como 4+ 74

Figura 18 - Imunorreatividade para SSTR5 (100X). A, imunorreatividade de uma hipófise normal utilizada como controle classificada como 1+. B, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente EEFA classificada como 4+. C, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente MARO classificada como 4+. D, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente CLCN classificada como 4+ 75

LISTA DE TABELAS

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Manifestações clínicas da doença de Cushing com respectivas frequências. Adaptado de Newell-Price et al.(2006).....6

Tabela 2 - Diagnóstico laboratorial de hipercortisolismo.....7

Tabela 3 - Diagnóstico da etiologia do hipercortisolismo.....8

Tabela 4 - Tratamento medicamentoso da doença de Cushing 12

Tabela 5 - Afinidades de ligação (IC_{50}) da somatostatina e seus análogos (octreotide e pasireotide); dopamina e seus agonistas (bromocriptina e cabergolina) e da dopastatina quimérica BIM-23A760 (2008).....23

Tabela 6 - Octreotide e seus efeitos diferentes na secreção de ACTH em pacientes portadores de doença de Cushing e Síndrome de Nelson 26

Tabela 7 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes e suas respectivas temperaturas de *annealing* e tamanho do fragmento em pares de bases 42

Tabela 8 - Anticorpos utilizados para análise imunohistoquímica.....50

Tabela 9 - Escala para avaliação semiquantitativa da imunorreatividade 51

Tabela 10 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes do grupo controle.....55

Tabela 11 - Características clínicas e achados cirúrgicos dos pacientes que receberam o protocolo de tratamento previamente à cirurgia transesfenoidal (grupo tratado) 56

Tabela 12 - Evolução hormonal (cortisol urinário) dos pacientes nas diferentes etapas do tratamento (basal, após 30 dias de octreotide isoladamente, após 30 dias de cabergolina isoladamente e após 30 dias da associação entre octreotide e cabergolina) 57

Tabela 13 - Descrição da variação média das três medidas de cortisol urinário em cada momento do protocolo.....59

Tabela 14 - Evolução hormonal (ACTH) dos pacientes nos diferentes momentos do tratamento (basal, após 30 dias de octreotide isoladamente, após 30 dias de cabergolina isoladamente e após 30 dias da associação entre octreotide e cabergolina) ...60

Tabela 15 - Evolução do peso dos pacientes no momento basal e ao término do protocolo de tratamento 62

Tabela 16 - Expressão das proteínas DRD2, SSTR5 e SSTR2 pela técnica de imunohistoquímica em pacientes do grupo controle 76

Tabela 17 - Expressão das proteínas DRD2, SSTR5 e SSTR2 pela técnica de imunohistoquímica em pacientes do grupo tratado.....76

RESUMO

Resumo

Romanholi DJPC. *Efeito da administração de octreotide, cabergolina e a associação de ambos nos níveis de ACTH e cortisol em pacientes com doença de Cushing : correlação da resposta clínica com a expressão tumoral dos receptores de dopamina (DRD2) e de somatostatina (SSTR2 e SSTR5)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 113p.

Introdução: A doença de Cushing apresenta elevada morbimortalidade. Seu tratamento de escolha é a cirurgia transesfenoidal que possui resultados satisfatórios em cerca de 70% dos casos. Na doença persistente ou recorrente, reabordagem cirúrgica, radioterapia e adrenalectomia bilateral podem ser realizadas, porém, essas opções apresentam como desvantagens o desenvolvimento de hipopituitarismo e a dependência de terapia de reposição. Até o momento, nenhuma droga tem se mostrado eficaz no tratamento do corticotrofinoma. Os esquemas terapêuticos mais eficazes são os inibidores da esteroidogênese que não atuam no tumor hipofisário. **Objetivos:** avaliar o efeito do octreotide e da cabergolina administrados isoladamente e em associação nas concentrações urinárias de cortisol e plasmáticas de ACTH em pacientes com corticotrofinomas; correlacionar esse efeito com a expressão tumoral dos receptores *SSTR2, SSTR5* e *DRD2;* correlacionar a expressão tumoral desses receptores através de RT-PCR quantitativa e imunohistoquímica; avaliar se o uso prévio dessas drogas altera a expressão desses receptores. **Casuística e Métodos:** grupo controle composto por 11 pacientes (10 mulheres e 1 homem) entre 21 e 43 anos sem tratamento prévio à neurocirurgia e um grupo tratado formado por 11 pacientes (2 homens e 9 mulheres) entre 22 e 53 anos que receberam o seguinte tratamento antes da cirurgia: coleta de três amostras de cortisol urinário e ACTH plasmático, seguida da introdução de octreotide 100 µg, subcutâneo, 8/8h durante 30 dias e nova coleta de três amostras de cortisol urinário e ACTH plasmático. Em seguida, iniciou-se a cabergolina 0,5 mg via oral 3 vezes na semana durante 30 dias com nova coleta de três amostras de cortisol urinário e ACTH plasmático. A seguir, o octreotide era associado por mais 30 dias com nova coleta de três amostras de cortisol urinário e ACTH plasmático. **Resultados:** Os valores de cortisol urinário apresentaram queda significante após o uso de cabergolina isolada (P = 0,016) e em associação ao octreotide (P = 0,012). A eficácia do tratamento combinado não foi maior que a da cabergolina isolada. Os valores de ACTH plasmático não revelaram diferença significante durante o tratamento e não se correlacionaram com os valores de cortisol. A média de expressão do mRNA do gene *DRD2* foi maior no grupo tratado (1,170 ± 0,417) quando comparada ao grupo controle (0,776 ± 0,252) (P = 0,036). Houve dissociação entre os conteúdos de mRNA e da proteína desse receptor. Não foi possível analisar a expressão do mRNA do gene *SSTR5,* pois o tratamento das amostras com DNAse causou degradação do RNA. A imunorreatividade para *SSTR5* esteve presente em todos os pacientes e não foi alterada pelo tratamento prévio. Não houve diferença estatística na

expressão do gene *SSTR2* entre os grupos controle (1,253 ± 0,511) e tratado (1,267 ± 0,386) bem como diferença significante da imunoexpressão do *SSTR2* entre os grupos. Houve correlação entre os conteúdos de mRNA e da proteína desse receptor (P = 0,021). Não houve correlação entre a expressão dos receptores analisados e a resposta ao octreotide e à cabergolina isoladamente ou em associação. **Conclusões:** a cabergolina isolada representa opção terapêutica na doença de Cushing persistente ou recorrente. A associação de octreotide na dose estudada por 30 dias não foi mais eficiente em reduzir o cortisol urinário. A resposta a essas drogas não está relacionada à expressão dos receptores *SSTR2*, *SSTR5* e *DRD2*.

Descritores: 1.Doença de Cushing 2.Octreotide 3.Cabergolina 4.Receptores de Somatostatina 5.Receptores de Dopamina

SUMMARY

Summary

Romanholi DJPC. *Effect of the administration of octreotide, cabergoline and the association of both on ACTH and cortisol levels in patients with Cushing's disease: correlation of clinical response with tumoral expression of the dopamine (DRD2) and somatostatin (SSTR2 and SSTR5) receptors* [thesis]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2010. 113p.

Introduction: The Cushing's disease presents high morbimortality. Its treatment of choice is transsphenoidal surgery which has satisfactory results in about 70% of cases. In persistent or recurrent disease, a second transsphenoidal surgery, radiotherapy and bilateral adrenalectomy can be carried through, however, these options present disadvantages as development of hypopituitarism and lifelong dependence on hormone replacement therapy. Presently, no drug has shown efficacy in corticotrophinomas treatment. The most efficient agents are the inhibitors of steroidogenesis which have no effect at pituitary tumor. **Objectives:** To evaluate isolated octreotide and cabergoline effects and their association on plasma ACTH and urinary cortisol in Cushing's disease patients, to correlate this effect with tumoral expression of *SSTR2*, *SSTR5* and *DRD2* receptors; to correlate tumoral expression of these receptors by quantitative RT-PCR and immunohistochemistry; to evaluate whether these drugs modifies these receptors expression. **Patients and methods:** control group with 11 patients (10 women and 1 man) between 21 and 43 years who underwent pituitary surgery with no prior treatment and a treated group with 11 patients (2 men and 9 women) between 22 and 53 years that received the following treatment before surgery: : after three baseline urinary cortisol samples and one plasma ACTH sample, patients received octreotide 100 µg, subcutaneous 8/8h for 30 days collecting three urinary cortisol samples and one plasma ACTH. After that, cabergoline was introduced 0,5 mg 3x/week for 30 days collecting three urinary cortisol samples and one plasma ACTH sample. Then, octreotide was associated to cabergoline for another 30 days followed by three urinary cortisol and one plasma ACTH sample. **Results:** Urinary cortisol concentrations significantly decreased after isolated and combined cabergoline use (P = 0,016 and P = 0,012, respectively). Combined treatment efficacy was not greater than isolated cabergoline administration. Plasma ACTH did not change statistically during treatment and did not correlate with urinary cortisol. The average of *DRD2* gene expression was higher in control group (0,776 ± 0,252) in relation to treated group (1,170 ± 0,417) (P = 0,036). It had dissociation between mRNA and protein contents of this receptor. *SSTR5* gene mRNA expression was not analyzed due to RNA degradation after DNAse tissue treatment. SSTR5 immunoreactivity was present in all patients and it was not modified by previous treatment. No statistic difference was observed between *SSTR2* gene expression in control group (1,253 ± 0.511) and in treated group (1,267 ± 0,386). There was no significant difference in SSTR2 immunoexpression between groups. It had correlation between the mRNA and protein contents of this receptor (P = 0.021).

No significant relationship was found between hormonal response to isolated and combined therapy and receptors mRNA expression levels. **Conclusions:** cabergoline represents therapeutical option in persistent or recurrent Cushing's disease. Octreotide-cabergoline association in the studied dosage and for the period of 30 days was not more efficient in eliciting urinary cortisol reduction. The responsiveness to these drugs did not correlate to *SSTR2* and *DRD2* mRNA expression.

Descriptors: 1.Cushing's disease 2.Octreotide 3.Cabergoline 4.Somatostatin Receptors 5.Dopamine Receptors

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definições

A síndrome de Cushing (SC) é um estado clínico resultante de prolongada e inapropriada exposição do organismo a concentrações excessivas de cortisol (F). É caracterizada por elevação dos níveis de F livre, perda da contra-regulação normal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e alteração no ritmo circadiano de secreção de F (Trainer e Grossman, 1991; Newell- Price et al., 1998).

A causa mais comum de SC é a exposição excessiva e prolongada aos glicocorticóides (GC) exógenos sejam eles orais, injetáveis, tópicos e inalatórios largamente aplicados na prática clínica (Hughes et al., 1986; Nutting e Page, 1998).

A SC endógena é uma endocrinopatia rara que pode ser dividida em dois grandes grupos de acordo com as concentrações plasmáticas de ACTH: ACTH-independente e ACTH-dependente. As causas dependentes de ACTH representam 80-85% dos casos de SC e dentre elas a doença de Cushing (DC), adenoma hipofisário produtor de ACTH é responsável por 80% dos casos. Os 20% restantes são representados pela secreção ectópica de ACTH (SEA) principalmente por carcinóides brônquicos ou carcinoma de pequenas células de pulmão, mas raramente, podem ainda estar relacionados a outros tumores secretores de ACTH (feocromocitoma,

carcinoides intestinais, tumores pancreáticos neuroendócrinos) (Salgado et al.; 2006). Em menos de 1% dos casos é descrita a secreção ectópica de CRH (*Corticotrophin release hormone*) por tumores extra-hipotalâmicos (Isidori et al., 2006).

O grupo ACTH-independente é representado por doenças adrenais primárias tais como: adenomas (60%), carcinomas (40%), doença nodular adrenal pigmentada primária (PPNAD abaixo de 1%) ou hiperplasia micronodular bilateral (isolada ou associada ao complexo de Carney), hiperplasia adrenal macronodular pela expressão de receptores anômalos (<1%), síndrome de Mc Cune Albright (<1%) e secreção ectópica de F por adenomas adrenais ectópicos localizados em rim, fígado, retroperitônio e gônadas (<1%) (Newell-Price et al., 1998; Ayala et al., 2000; Lacroix et al., 2001).

Ainda mais raramente, foram descritos casos de hiperplasia corticotrófica e carcinoma hipofisário como causas de SC ACTH dependente.

1.2 Histórico

Harvey Willians Cushing (8/4/1869-07/10/1939) foi um renomado neurocirurgião conhecido como o “pai da neurocirurgia moderna” que em 1912 descreveu o caso da Minnie G, sua primeira paciente com estigmas típicos de hipercortisolismo (Cushing, 1912 apud Newell-Price et al., 1998).

Em 1932, Harvey Cushing publicou uma série com mais 11 pacientes correlacionando características clínicas de hipercortisolismo com o achado

anatomopatológico de basofilismo hípofisário. Apesar da identificação de tumor hipofisário em apenas três dos 12 pacientes relatados, a essa situação denominou-se SC que ainda hoje se constitui em grande desafio para endocrinologistas (Findling e Raff, 2006).

1.3 Epidemiologia

Os tumores hipofisários são neoplasias comuns e dados de necropsias relatam adenomas hipofisários em 20 a 25% da população geral (Asa e Ezzat, 2002). Os corticotrofinomas representam 10% dos adenomas hipofisários e a DC apresenta uma incidência entre 0,7 a 2,4 casos por milhão por ano (Lindholm et al., 2001). Entretanto, sugere-se que essa enfermidade é mais comum do que se imagina. Num estudo com pacientes obesos e portadores de diabetes mellitus (DM) tipo 2 especialmente com mau controle glicêmico e dos níveis pressóricos, a prevalência da SC esteve entre 2 a 5% (Leibowitz et al., 1996; Contreras et al., 2000; Catargi et al., 2003, Chiodini et al.,2005). O paciente com DC apresenta quatro vezes maior risco de morrer principalmente por complicações cardiovasculares e alteração do metabolismo da glicose (Etxabe e Vazquez, 1994; Lindholm et al., 2001). É descrita uma taxa de mortalidade cardiovascular em cinco anos acima de 50% quando não tratada (Orth, 1995; Dekkers et al., 2007).

1.4 Manifestações Clínicas da Doença de Cushing

Os sinais e sintomas da DC resultam diretamente da exposição crônica ao GC e seu diagnóstico geralmente é difícil, pois nenhum dos sinais ou sintomas é patognomônico dessa doença (Tabela 1).

Existe um largo espectro de manifestações, desde um quadro subclínico até o mais florido, dependendo da duração e intensidade da produção esteroide.

Conforme se observa na Tabela 1, as queixas que melhor caracterizam e discriminam SC são: estrias purpúricas e maiores que 1 cm, pletora facial, fraqueza muscular proximal, fragilidade capilar e osteoporose sem causas aparentes. As queixas mais comuns, porém menos discriminatórias são: depressão, fadiga, ganho de peso, dorsalgia, diminuição de concentração, alterações no apetite, redução da libido, prejuízo na memória recente, insônia, irritabilidade, anormalidades menstruais, gibosidade dorsal, obesidade, preenchimento facial (fácies em lua cheia), preenchimento de fossa supraclavicular, edema periférico, acne, hirsutismo ou calvície feminina, cicatrização prejudicada, hipertensão arterial, osteoporose vertebral, DM tipo 2, hipocalemia, nefrolitíase e infecções incomuns (Newell-Price, 2008).

Tabela 1 - Manifestações clínicas da doença de Cushing com respectivas frequências. Adaptado de Newell-Price et al.(2006)

	Proporção
Obesidade ou ganho de peso	95%
Pletora facial	90%
Fácies em lua cheia	90%
Diminuição de libido	90%
Adelgaçamento da pele	85%
Diminuição do crescimento linear em crianças	70-80%
Irregularidade menstrual	80%
Hipertensão arterial	75%
Hirsutismo	75%
Depressão/labilidade emocional	70%
Fragilidade capilar	65%
Intolerância à glicose	60%
Fraqueza muscular	60%
Osteopenia ou fratura	50%
Nefrolitiase	50%

Em crianças, o ganho de peso associado ao retardo de crescimento são os achados mais comuns (Magiakou et al., 1994, Leinung e Zimmerman, 1994).

1.5 Diagnóstico da Doença de Cushing

Vários testes embasados nas características fisiológicas do eixo HHA têm sido utilizados para confirmar o diagnóstico da DC, mas nenhum deles mostrou-se totalmente capaz de distinguir todos os casos de DC de indivíduos normais e/ou portadores de pseudo-Cushing (Newel-Price et al., 1998). Três testes diagnósticos de primeira linha são atualmente empregados para a confirmação de hipercortisolismo: a medida do F livre em urina de 24h; supressão do F por doses baixas de dexametasona e a avaliação do ritmo circardiano do F, usando a dosagem do F sérico ou salivar entre 23 e 24h (Tabela 2) (Newel-Price et al., 2008).

Tabela 2 - Diagnóstico laboratorial de hipercortisolismo

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO HIPERCORTISOLISMO
Aumento da produção de cortisol
Excreção aumentada de cortisol na urina de 24 h
Perda da retroalimentação negativa do cortisol (eixo HHA)
Ausência de supressão do cortisol após 1 mg de dexametasona por via oral *overnight.*
Ausência de supressão do cortisol após 2 mg de dexametasona clássico (0,5 mg 6/6 h por via oral)
Perda do ritmo circadiano do cortisol
Concentrações elevadas de cortisol sérico entre 23-24h
Concentrações elevadas de cortisol salivar entre 23-24h

Frente à confirmação laboratorial do hipercortisolismo, segue-se a investigação quanto a sua possível etiologia. Essa investigação dependerá da disponibilidade dos testes bioquímicos e exames de imagem em cada serviço. Exames hormonais basais (ACTH plasmático), testes dinâmicos (supressão com doses altas de dexametasona, teste com CRH e teste da desmopressina) e exames de imagem (ressonância magnética e cateterismo bilateral e simultâneo de seios petrosos inferiores) podem ser realizados (Tabela 3) (Nieman et al., 2008).

Tabela 3 - Diagnóstico da etiologia do hipercortisolismo

DIAGNÓSTICO DA ETIOLOGIA DO HIPERCORTISOLISMO
Medida do ACTH plasmático
Teste de supressão com dose alta de dexametasona (HDDST)
Teste de estímulo com CRH
Teste da desmopressina
Ressonância magnética de sela túrcica (RM)
Cateterismo bilateral e simultâneo de seios petrosos inferiores (CBSSPI)

1.6 Tratamento da Doença de Cushing

Em geral, a terapia inicial e de escolha é a adenomectomia seletiva por um cirurgião com elevada experiência.

Frente ao insucesso dessa abordagem, outras terapias estão disponíveis: reabordagem cirúrgica, radioterapia, adrenalectomia bilateral e terapia medicamentosa (Aghi, 2008).

1.6.1 Tratamento Cirúrgico Inicial

A adenomectomia transesfenoidal é considerada o tratamento inicial de escolha quando um microadenoma é detectado na RM hipofisária ou visualizado durante o ato operatório.

Em centros com elevada experiência, as taxas de remissão cirúrgica atingem entre 65-90% e o risco de recorrência nesses pacientes é de 5-10% em cinco anos e 10-20% em dez anos (Bochichio et al., 1995; Chee et al., 2001; Stévenaert et al., 2002; Hammer et al., 2004; Hofmann et al., 2008).

Hipofisectomia parcial ou até mesmo total induz a uma menor taxa de remissão (<70%) e está associada à maior incidência de complicações e hipopituitarismo (Trainer et al., 1993; Stévenaert et al., 2002; Hammer et al., 2004).

O sucesso cirúrgico costuma ser menor em pacientes portadores de macrodenoma e naqueles com invasão de dura-máter ou seio cavernoso (taxas de remissão abaixo de 65% e recorrência de até 45%) (Cannavo et al., 2003).

Alguns fatores estão relacionados a um melhor prognóstico: detecção do microadenoma na RM, tumor com limites bem definidos sem invasão dos seios cavernosos ou dura-máter, confirmação histológica de tumores corticotróficos, baixas concentrações de F sérico no pós-operatório e insuficiência adrenal prolongada (Sonino et al., 1996; Hammer et al., 2004; Atkinson et al., 2005; Kelly, 2007; Hofmann et al., 2008).

1.6.2 Tratamento Cirúrgico para Doença Recorrente ou Persistente

A reabordagem cirúrgica está associada a menores taxas de remissão e maiores chances de hipopituitarismo e complicações. As taxas de hipopituitarismo chegam a 50% na hipofisectomia parcial (Friedman et al., 1989) e 100% na hipofisectomia total (Patil et al., 2008).

1.6.3 Radioterapia

Radioterapia externa convencional fracionada ou radioterapia estereotáxica determinam o controle do hipercortisolismo em aproximadamente 50-60% dos pacientes em três a cinco anos (Sonino et al., 1996; Estrada et al., 1997; Sheehan et al., 2000; Castinetti et al., 2007).

O beneficio máximo da radioterapia geralmente ocorre após três a 12 meses e durante esse período é necessário estabelecer uma terapia medicamentosa para o controle do hipercortisolismo (Minniti e Brada, 2007).

Todos os tipos de radioterapia induzem disfunção de outros setores hipofisários, portanto, a avaliação do desenvolvimento de hipopituitarismo e a necessidade de reposição hormonal deve ser realizada periodicamente (Vance, 2009).

O risco de aparecimento de tumor secundário à radioterapia é de 1 a 2% (Brada e Jankowska, 2008). Outras complicações também são descritas: epilepsia de lobo temporal, disfunção cognitiva, alteração comportamental, paralisia de pares cranianos, radionecrose, manifestações vasculares e atrofia óptica.

1.6.4 Adrenalectomia Bilateral

A adrenalectomia bilateral, preferencialmente via laparoscópica, é um tratamento definitivo que promove controle imediato do hipercortisolismo. Entretanto, o hipocortisolismo permanente requer educação e seguimento dos pacientes pela necessidade de reposição de GC e mineralocorticoide (Gumbs e Gagner, 2006; Walz et al., 2006; Barczyński et al., 2007; Porterfield et al., 2008).

A monitorização das concentrações de ACTH plasmático e a RM de sela é obrigatória para o diagnóstico precoce de progressão tumoral corticotrófica e síndrome de Nelson (10-35%) (Sonino et al., 1996; Pereira et al.,1998; Assie et al., 2004; Assie et al., 2007).

1.6.5 Tratamento Medicamentoso

A terapia medicamentosa apresenta um importante papel no tratamento da DC. Além de sua aplicação frente ao insucesso cirúrgico, drogas hiporticortisolêmicas podem ser utilizadas no preparo do paciente para a cirurgia hipofisária com o intuito de diminuir complicações no perioperatório (Biller et al., 2008).

O tratamento clínico também é aplicado a pacientes que aguardam os efeitos tardios da radioterapia e ainda, naqueles com elevado risco cirúrgico (Biller et al., 2008).

A terapêutica medicamentosa pode ser dividida em: inibidores da esteroidogênese adrenal, drogas moduladoras da secreção de ACTH e bloqueadores da ação do F (Tabela 4).

Tabela 4 - Tratamento medicamentoso da doença de Cushing

INIBIDORES DA ESTEROIDOGÊNESE ADRENAL
Cetoconazol
Metirapona
Aminoglutetimida
Mitotane
Etomidato
MODULADORES DA SECREÇÃO DE ACTH
Valproato de Sódio
Agonistas do receptor PPARμ
Ciproeptadina
Ritanserina
Agonistas dopaminérgicos
Análogos de somatostatina
Ácido retinóico
ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DE CORTISOL
Mifepristone

A terapia direcionada à adrenal (inibidores da esteroidogênese) pode ser altamente efetiva, porém, não tem efeito sobre o adenoma hipofisário nem restabelece a dinâmica do eixo HHA.

1.6.5.1 Cetoconazol

Cetoconazol é um derivado imidazólico largamente utilizado como antifúngico administrado na dose de 200 mg duas a três vezes ao dia. Essa droga inibe fortemente as enzima 17,20 liase e 17α hidroxilase (Loose et al., 1983; Feldman, 1986; Weber et al., 1993). Existem relatos de que essa droga apresenta ações extra-adrenais antagonizando o receptor de GC e diminuindo a secreção de ACTH *in vitro* (Loose, 1983).

Em estudo recente utilizando-se cetoconazol como terapia primária ou adjuvante nas doses de 200 a 1200 mg/d, observou-se normalização das concentrações de F urinário em 50% dos casos e 15% de recorrência. Os autores relataram cinco casos de aparecimento de imagem tumoral onde não existia imagem de adenoma na RM inicial (Castinetti et al., 2008).

Uma metanálise do uso de cetoconazol na dose 400 a 1200 mg/dia reportou taxa de remissão de 70% (25-93%) com hepatotoxidade em cerca de 12% dos casos (Engelhardt e Weber, 1994).

Outros efeitos colaterais já relatados foram: náuseas, vômitos, cefaléia, sedação, diminuição da libido e impotência. Este medicamento está contra-indicado na gestação pelo risco de teratogênese. Sua associação com certos medicamentos deve ser cuidadosamente monitorada.

A absorção de cetoconazol depende da acidez gástrica, portanto os bloqueadores do receptor de histamina e inibidores de bomba de prótons devem ser evitados (Engelhardt e Weber, 1994).

1.6.5.2 Metirapona

A metirapona atua inibindo a 11β hidroxilase que converte 11 deoxicortisol em F e é utilizada na dose de 250 mg três vezes ao dia até a dose máxima de 6 g/dia. Seu uso está associado ao aumento de ACTH, o que resulta em aumento de andrógenos e mineralocorticoides ocasionando hipertensão arterial e hirsutismo (Shalet e Mukherjee, 2008).

1.6.5.3 Aminoglutetimida

É um agente anticonvulsivante que inibe a conversão de colesterol à pregnenolona e outras enzimas, tais como 11β hidroxilase, 18α-hidroxilase e a aromatase. Pode ser utilizado na dose de 250 mg duas a três vezes ao dia (Dexter et al., 1967; Santen e Misbin, 1976) Geralmente, é utilizada em associação com a metirapona já que seu uso isolado não apresenta taxas adequadas de remissão (Child et al., 1976).

Os efeitos colaterais mais comuns são: rash cutâneo, náuseas, sonolência, tonturas, embaçamento visual, hipotireoidismo, bócio e deficiência de aldosterona, o que implica na reposição de mineralocorticoide (Dexter et al., 1967; Santen e Misbin, 1976).

1.6.5.4 Mitotane

Foi introduzido em 1960 para o tratamento do carcinoma adrenal e posteriormente passou a ser utilizado no tratamento das causas benignas de SC. É administrado em dose de 250 a 500 mg 3x/dia até 4 a 12 gramas ao dia. O seu efeito é lento, manifestando-se após duas a quatro semanas de tratamento (Paiva e Ribeiro, 2005). Atua inibindo a 11β hidroxilase, 18α hidroxilase, 3α hidroxilase, hidroxiesteroide-desidrogenase e outras enzimas de clivagem da cadeia do colesterol. Em doses superiores a quatro gramas ao dia, tem ação adrenolítica (Hart e Straw, 1971) havendo necessidade de reposição com GC pelo risco de desenvolvimento de síndrome de Nelson.

Os efeitos colaterais podem limitar seu uso. Está contra-indicado na gestação.

1.6.5.5 Etomidato

É um anestésico intravenoso que inibe a 11β hidroxilase e 17α hidroxilase. Sua indicação seria apenas o controle agudo do hipercortisolismo (Drake et al., 1998).

1.6.5.6 Ácido Retinóico

Ácido retinóico é uma droga eficiente para tratamento de diferentes tipos de neoplasias, tendo sido utilizada na DC em modelos animais. Derivado natural e sintético da vitamina A, regula diversas fases do crescimento

e diferenciação celular, modula diversos genes envolvidos na regulação da transcrição, apoptose e proliferação celular (Pitha-Rowe et al., 2003; Altucci et al., 2007).

O ácido retinoico não atua em corticotrofos normais onde o COUP-TF1 (*chicken ovoalbumin ipstriannomoter transcription factor* 1), receptor órfão pertencente à superfamília dos receptores dos esteroides se expressa e inibe vias responsivas ao ácido retinóico (Kliewer et al., 1992). Em contra partida, esta proteína não está expressa nos tumores corticotroficos.

A cultura primária de corticotrofinomas humanos com 10 nM de acido retinóico resultou em inibição da produção ACTH, da proliferação celular e induziu a apoptose em seis de oito tumores corticotróficos (Paez-Pereda et al., 2001). Estudo comparativo randomizado utilizando acido retinóico ou cetoconazol em cães com DC por 180 d mostrou redução nas concentrações de ACTH e α-MSH (*melanocyte stimulating hormone*) e redução do volume tumoral no grupo que recebeu o ácido retinóico, sugerindo que esse agente provavelmente inibe a transcrição da pró-opiomelanocortina (POMC) (Castillo et al., 2006). A eficiência desse agente em humanos ainda precisa ser mais bem avaliada (Labeur et al., 2009).

O fator limitante da terapia retinóica é que em concentrações necessárias para o tratamento de neoplasia, esse agente pode causar teratogenicidade, toxicidade muco-cutâneo, alteração da função hepática, mucosite e fotossensibilidade grave (Miller et al., 1997).

1.6.5.7 Valproato de Sódio

É um agente anticonvulsivante inibidor da recaptação do ácido gama-amino-butírico (GABA) hipotalâmico que possui ação inibitória sobre a secreção de CRH (Ambrosi et al., 1990). Os relatos de supressão da secreção de ACTH com doses diárias de 600 mg não foram confirmados (Colao et al., 1997).

1.6.5.8 Agonistas do Receptor PPARγ

Em 2002, o receptor hormonal nuclear PPARγ (*peroxisome proliferator activated receptor γ*) foi identificado nos corticotrofinomas (Heaney et al., 2002).

Trabalhos em ratos utilizando rosiglitazona mostraram redução do volume tumoral e das concentrações de ACTH em 75% dos casos e diminuição da cortisolemia em todos os casos (Heaney et al., 2002).

Os estudos utilizando a rosiglitazona nas doses de 4 a 16 mg/dia em portadores de DC não mostraram grande eficácia dessa droga em reduzir as concentrações de F urinário, ressalvando-se o fato de que foram realizados com número reduzido de pacientes (Ambrosi et al., 2004; Hull et al., 2005; Giraldi et al., 2006). Com a pioglitazona os resultados também foram desapontadores (Suri e Weiss, 2005).

1.6.5.9 Ciproeptadina

A ciproeptadina é um antagonista não seletivo de serotonina (5-HT) e de histamina utilizada na DC a partir de 1975 (Krieger et al., 1975). Há controvérsias quanto à ação desses agentes na hipófise ou através de

inibição de CRH (Van Waveren Hogervorst et al.,1996). A eficácia dessa droga não está comprovada na DC e seus principais efeitos colaterais são sedação e ganho de peso (Sonino e Fava, 2001).

1.6.5.10 Ritanserina

Ritanserina é um antagonista específico da 5-HT que foi utilizado em casos isolados de DC, porém, sem efeito sustentado na maioria dos pacientes (Sonino et al., 2000).

1.6.5.11 Antagonista do Receptor de Cortisol

Mifepristone (RU486) é um potente antagonista dos receptores de GC e da progesterona (Baulieu et al., 1991), embora para este efeito em progesterona sejam necessárias doses muito maiores (5 a 20 mg/kg/d) (Johanssen e Allolio, 2007).

Exceto para reversão de sintomatologia neuropsiquiátrica grave, a sua utilidade clínica é limitada dado o fato de não reduzir a hipercortisolemia e ainda estimular o aumento das concentrações de ACTH (Healey et al., 1985).

O mifepristone causa hipocalemia grave atribuída ao excesso de ativação do receptor mineralocorticoide, que responde a terapia com espironolactona (Chu et al., 2001).

Assim, só há referência à sua utilização em casos especiais e geralmente por período curto de tempo (Nieman et al., 1985; Chu et al., 2001).

1.6.5.12 Agonistas dopaminérgicos

Dopamina é o neurotransmissor predominante no sistema nervoso central (SNC) humano onde está relacionada a diversas funções: cognição, emoção, locomoção e regulação do sistema endócrino (Missale et al., 1998). A dopamina apresenta diferentes papéis em outros sistemas: modulação da função renal e cardiovascular, motilidade gastrointestinal, síntese e secreção hormonal (Missale et al., 1998).

A dopamina exerce suas funções através dos seus receptores (DR) que podem ser subdivididos em duas famílias de acordo com suas características bioquímicas e farmacológicas: D1-*like* (DRD1 *e* DRD5) e D2-*like* (DRD2, DRD3 e DRD4). Através de *splicing* alternativo com a inclusão ou a exclusão do exon 6, o mRNA (RNA mensageiro) do *DRD2* pode formar duas isoformas (*DRD2* longo e *DRD2* curto). A sequência extra do *DRD2* longo está situada na região que se liga à proteína G, o que determina características diferentes entre essas duas isoformas (Giros et al., 1989).

Os diferentes receptores de dopamina apresentam distintas distribuições e papéis nos diversos órgãos e tecidos (Missale et al., 1998).

O DRD2 está expresso nos lobos anterior e intermediário da hipófise (Caron et al., 1978; Munemura et al., 1980) onde a dopamina exerce o controle inibitório sobre a secreção de prolactina (PRL) e MSH (Bem-Jonathan, 1985, Stack e Surprenant, 1991).

Os agonistas dopaminérgicos são uma importante classe de drogas indicada para o tratamento de desordens neurológicas, disfunção

cardiovascular e doenças neuro-endócrinas. Podem ser derivados do ergot (bromocriptina, cabergolina e pergolida) ou não (quinagolida).

Os efeitos de bromocriptina na DC permanecem controversos já que não é claro se a diminuição das concentrações de ACTH ocorre via CRH ou diretamente na hipófise (Lamberts et al., 1980; Boscaro et al., 1983; Yin et al., 1994). Alguns estudos sugerem que adenomas originários do lobo intermediário da hipófise possam responder melhor à bromocriptina (Lamberts et al., 1980) onde há maior concentração de melanotrofos que expressam DRD2 (Caron et al., 1978).

A administração de bromocriptina causa queda nas concentrações de ACTH em 50% dos pacientes com DC, efeito que não ocorre em longo prazo (Lamberts et al., 1980; Boscaro et al., 1983). Em doses altas de bromocriptina (40 mg/d) há descrições de melhores respostas clínicas, mas com rara eficácia em longo prazo (Mercado-Asis et al., 1992; Morris e Grossman, 2002) ressalvando-se os possíveis efeitos colaterais que são congestão nasal, náuseas, hipotensão postural, cefaléia e alucinações.

Quando comparada à bromocriptina, a cabergolina apresenta maior especificidade e afinidade à isoforma D2 do receptor de dopamina (DRD2), além de maior duração de ação (Colao et al., 2000). O seu uso já está mais estabelecido na DC (Pivonello et al., 2004; Pivonello et al., 2009).

Pivonello et al. (2004) investigaram a expressão dos DRs e a ação da cabergolina em 20 corticotrofinomas. Nesse estudo, os pacientes apresentaram normalização do hipercortisolismo em 40% dos casos e queda de mais de 50% da cortisolúria em 60% dos casos. Ainda foi demonstrada a

expressão de *DRD2* por RT-PCR e imunohistoquímica em 70-80% dos tumores, sendo que, 40% dos casos expressaram *DRD2* longo isoladamente, 20% expressaram apenas *DRD2* curto, 40% apresentam as duas isoformas e 20% expressavam *DRD4*. Esses dados foram posteriormente confirmados no trabalho de de Bruin et. al (2009) que descreveram que 78% da expressão de *DRD2* é representada pela isoforma longa e que a expressão de *DRD4* é praticamente indetectável.

Pivonello et al. (2009) avaliaram 20 pacientes com DC que não apresentaram remissão após tratamento cirúrgico e que receberam cabergolina em doses de 1 até 7 mg/sem. Após três meses, 10 pacientes apresentaram normalização da cortisolúria e cinco pacientes apresentaram resposta parcial (considerada 25% de queda na cortisolúria). Entre os 15 pacientes responsivos, cinco apresentaram escape entre seis e 18 meses de seguimento. Após 24 meses, 40% dos pacientes (8/20) mantiveram controle do hipercortisolismo e 20% desses apresentaram diminuição do volume tumoral (Pivonello et al., 2009). A presença de escapes ao longo da utilização de cabergolina é bastante reconhecida. O mecanismo responsável pelo desenvolvimento desses escapes não está definido. *Down-regulation* de receptores ou ainda mecanismos de desensibilização pós-receptor podem estar envolvidos nesse processo. Independente da causa, a eficácia da monoterapia com cabergolina em longo prazo é questionada.

Os efeitos colaterais associados à cabergolina são os mesmos da bromocriptina, em menor proporção, conferindo melhor tolerabilidade.

É importante ressaltar que publicações recentes relataram maior risco de valvopatias associadas ao uso crônico de agonistas dopaminérgicos derivados do ergot (Shade et al., 2007; Zanettini et al., 2007; Steiger et al., 2009).

1.6.5.13 Análogos de Somatostatina

A somatostatina (SST) é um hormônio secretado pelos neurônios hipotalâmicos e é considerada uma importante reguladora da secreção endócrina. O gene que codifica a SST está localizado no cromossomo 3q28 e foi identificado em 1972. Suas funções variam desde o aumento da motilidade gastro-intestinal até mediação de resposta imune e inibição da secreção hormonal (Barnett, 2003).

A partir da clivagem da molécula pro-SST são sintetizadas duas isoformas biologicamente ativas de SST: SST com 14 aminoácidos (aa) (SST-14) e SST com 28 aa (SST-28) (Sevarino et al., 1987).

As SST-14 e SST-28 exercem suas atividades através de receptores de membrana ligados às proteínas G (GPRs). Entre 1992 e 1994 foram caracterizados cinco tipos de receptores de SST (SSTRs): SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 e SSTR5. Após *splicing* alternativo, duas formas de *SSTR2* podem ser originadas: uma longa *SSTR2a* e uma curta *SSTR2b* (Vanetti et al., 1992). Os genes que codificam os diferentes SSTRs estão localizados em distintos cromossomos: SSTR1 (14q13), SSTR2 (17q24), SSTR3 (22q13.1), SSTR4 (20p11.2) e SSTR5 (16p13.3). Esse fato sugere que os SSTRs apresentam funções diferentes (Patel e Srikant, 1997; Patel, 1999).

Os receptores de SST estão relacionados a vários sistemas de 2º mensageiros. Esses sistemas incluem a inibição da atividade da adenilato ciclase e a atividade de canais de cálcio (função inibitória da SST), assim como a estimulação da fosfotirosina fosfatase (PTP) ou a estimulação de atividade MAPK (ação da SST na proliferação celular) (Patel, 1999).

Os cinco subtipos de receptores ligam-se à SST14 e SST28 com alta afinidade e afinidades distintas em relação a diferentes análogos da SST (Tabela 5).

Tabela 5 - Afinidades de ligação (IC_{50}) da somatostatina e seus análogos (octreotide e pasireotide); dopamina e seus agonistas (bromocriptina e cabergolina) e da dopastatina quimérica BIM-23A760 Adaptado de de Bruin et al. (2008)

Composto	*SSTR1*	*SSTR2*	*SSTR3*	*SSTR4*	*SSTR5*	DRD2 *curto*	*DRD2* longo
Análogos da somatostatina							
Somatostatina	0,93	0,15	0,56	1,50	0,29		
Octreotide	280	0,38	7,10	>1 000	6,30		
Pasireotide	9,3	1,0	1,5	>1 00	0,16		
Agonistas dopaminérgicos							
Dopamina						350	320
Bromocriptina						4,5	3,9
Cabergolina						0,53	0,41
Dopastatinas quiméricas							
BIM-23A760	622	0,03	160	>1 000	42	15[1]	

IC_{50}: nM
[1]IC_{50} para o receptor *DRD2* (isoformas longa e curta)

A hipófise humana expressa mRNA de *SSTR1, SSTR2, SSTR3 e SSTR5,* porém não expressa mRNA de *SSTR4* (Panetta e Patel, 1995).

Em 2005, Van der Hoek et al. caracterizaram as propriedades funcionais diferentes entre os receptores *SSTR5 e SSTR2* na regulação de secreção de ACTH em corticotrofinomas. Nesse trabalho, foram avaliados os efeitos da SST14 e diferentes análogos da SST (octreotide e pasireotide) em cultura de células ATt20 (linhagem celular de corticotrofinomas de murinos) pré-tratadas em meio de cultura com e sem dexametasona. Observou-se uma inibição da secreção de ACTH dose-dependente pela SST14 e pasireotide e a mesma não foi afetada pela presença de dexametasona no meio de cultura. Por outro lado, a dexametasona causou uma diminuição na potência de inibição da secreção de ACTH pelo octreotide. A avaliação da expressão do mRNA dos diferentes SSTR comprovou níveis bastante diminuídos de expressão de *SSTR2a e SSTR2b* nas células pré-tratadas com dexametasona e a manutenção dos níveis de mRNA de *SSTR5* nessas células. Esses dados comprovam o *down-regulation* dos receptores *SSTR2* e a resistência do *SSTR5* frente ao hipercortisolismo (Stalla et al., 1994).

Estudos mais recentes utilizando reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR) confirmam que a maioria dos corticotrofinomas expressa o *SSTR5* em altos níveis quando comparado ao *SSTR2 e SSTR1* (Hofland et al., 2005; Batista et al., 2006). Esse dado sugere que o receptor *SSTR5* é alvo potencial para o controle da secreção de ACTH na DC.

Acredita-se que as concentrações de GC possam modular a ação da SST e seus análogos nas células corticotróficas hipofisárias assim como nos somatotrofos e lactotrofos (Lamberts et al., 1989).

Hofland et al. (2008) confirmaram que a ação da SST também sofre alterações frente ao hipercortisolismo em outros tumores não hipofisários (carcinoma medular de tireóide, carcinoma de pequenas células de pulmão e carcinoma pancreático).

De Bruin et al., (2009), descreveram, elegantemente, o efeito do hipercortisolismo (dexametasona) na expressão dos *SSTRs* (*SSTR2 e SSTR5)* em cultura de tumores da linhagem neuroendócrina (carcinoma medular de tiróide e carcinóide pancreático). Nesse trabalho foi comprovado que o hipercortisolismo causa *down-regulation* do *SSTR2* e não do *SSTR5* e que esse efeito além de ser dose-dependente, é totalmente revertido quando há normocortisolismo. Os autores justificam esse achado pelo fato de serem descritos elementos responsivos ao GC (GRE) no gene *SSTR2* de murinos enquanto que apenas *Half-sites* GRE são encontrados no gene do *SSTR5* (Kraus et al., 1998; Gordon et al., 1999). E ainda, que o promotor do gene de *SSRT2* está sob controle direto dos GC e o promotor do gene de *SSTR5* não está (Petersenn et al., 1999; Petersenn et al., 2002).

Os análogos da somatostatina (SST) atualmente disponíveis (octreotide e lanreotide) apresentam ação predominante no *SSTR2* e têm sido amplamente utilizados no tratamento de tumores neuroendócrinos e acromegalia (Tabela 5). Infelizmente, esses fármacos apresentam limitados resultados na DC, onde existe o predomínio dos receptores *SSTR5* (Lamberts et al., 1989; Ambrosi et al., 1990; Invitti et al., 1990; Stalla et al., 1994; Van der Hoek et al., 2004; Hofland et al., 2005; Batista et al., 2006). Estudos bem mais antigos já demonstravam a ausência do efeito de

octreotide na DC e a diminuição da secreção de ACTH em pacientes portadores de Síndrome de Nelson (Tabela 6).

Tabela 6 - Octreotide e seus efeitos diferentes na secreção de ACTH em pacientes portadores de doença de Cushing e Síndrome de Nelson Adaptado de Hofland et al. (2005)

Referência	Nº de pacientes	Dose de Octreotide	Efeito no ACTH
Doença de Cushing			
Lamberts 1989	3	100 µg/d	Sem efeito
Ambrosi 1990	2	100 µg/d	Sem efeito
Stalla 1994	5	200 µg/d	Sem efeito
Síndrome de Nelson			
Lamberts 1989	1	100 µg 3x/d	Diminuição
Petrini 1994	1	100 µg 3x/d	Diminuição
Kelestimur 1996	1	100 µg/d	Diminuição em 46%

Pasireotide (SOM230) é um novo análogo da SST considerado multiligante aos diferentes SSTRs com alta afinidade a pelo menos quatro dos cinco SSTRs (SSTR1, SSTR2, SSTR3 e SSTR5) e com uma afinidade pelo SSTR5 40 vezes maior que o octreotide (Tabela 5) (Bruns et al., 2002; Schmid and Schoeffter, 2004; Van der Hoek et al., 2005). O pasireotide efetivamente inibiu a secreção de ACTH *in vivo* e *in vitro,* sugerindo seu potencial para o tratamento da DC (Hofland et al., 2005; Silva et al., 2005; Schmid, 2008).

Em um estudo que avaliou a eficácia em curto prazo de pasireotide em 29 pacientes portadores de DC recém diagnosticada, persistente ou recorrente, foi demonstrado que em 76% dos casos houve redução das concentrações de F urinário e que 17% dos pacientes apresentaram normalização desse exame após 15 d de pasireotide 600 μg 2x/d (Boscaro et al., 2009). Estudos avaliando sua utilização em longo prazo ainda estão sendo realizados.

1.6.5.14 Associação entre Análogos da Somatostatina e Agonistas Dopaminérgicos

A função da maioria das células do corpo humano é regulada por receptores localizados na membrana plasmática. Grande parte desses receptores pertence à superfamília dos receptores acoplados às proteínas G (GPRs) (Vaughan, 1998) (Figura 1).

Todos os GPRs apresentam uma estrutura terciária comum que consiste em sete domínios transmembrânicos, uma porção N-terminal extracelular e uma porção C-terminal intracitoplasmática. Todos eles apresentam três alças extracelulares e três alças intracelulares (Vaughan, 1998). Os GPRs interagem com proteínas G que então interagem com diferentes sistemas efetores.

Os GPRs existem como monômeros ou podem interagir entre si formando homômeros (proteínas idênticas), heterômeros (proteínas não-idênticas), dímeros (dois monômeros), oligômeros (múltiplos monômeros). E assim, esses GPRs podem apresentar-se como monômeros, homo ou heterodímeros e como homo ou hetero-oligômeros (Devi, 2001).

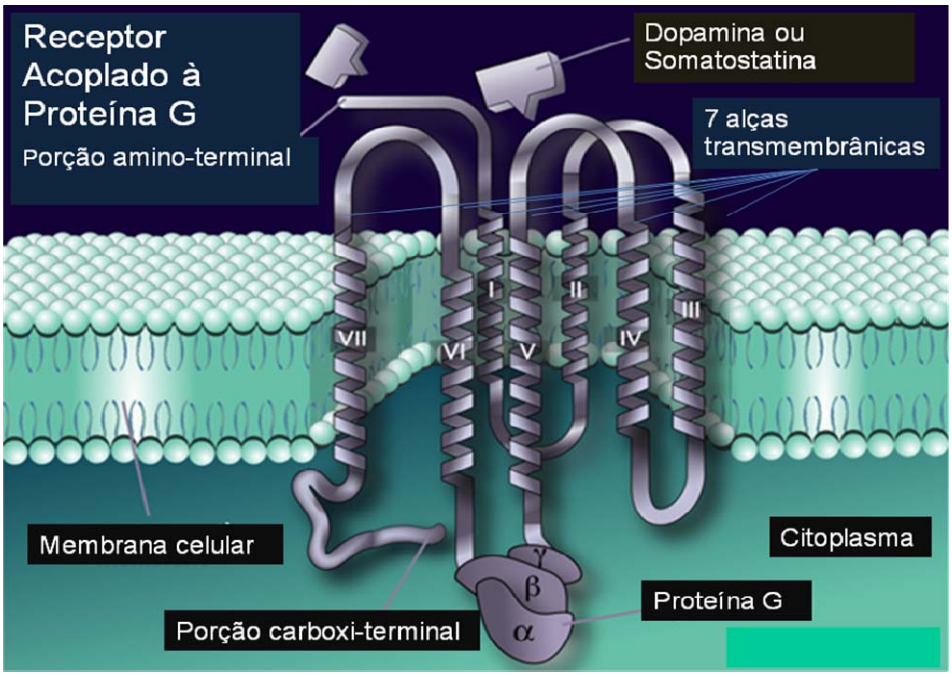

Figura 1 - Receptor acoplado à Proteína G. Tanto a somatostatina quanto a dopamina apresentam receptores acoplados à Proteína G que podem sofrer dimerização. Adaptado de Maggio et al. (2005)

Em 2000, Rochevile et al. descreveram a formação de hetero-oligômeros entre receptores DRD2 e SSTR5 em neurônios. Em 2007, Baragli et al. demonstraram a hetero-oligomerização entre os receptores DRD2 e SSTR2 em cultura de células neuronais de ratos.

Os receptores de dopamina e de SST apresentam 30% de identidade (Rochevile et al., 2000) e a interação entre eles (hetero-oligomerização) é capaz de formar um complexo efetor relacionado à proteína G caracterizado por apresentar uma maior atividade funcional.

Recentemente, de Bruin et al. (2009) demonstraram a coexpressão de receptores de SST e de dopamina em corticotrofinomas. Dos 30 tumores avaliados qRT-PCR, 60%, coexpressavam *DRD2 e SSTR5*, 23% apenas

expressaram *DRD2* e não *SSTR5*, 17% não expressaram nenhum dos receptores e a expressão dos demais receptores de SST (*SSTR1- 4*) e *DRD4* foi baixa a indetectável.

Esse importante dado associado aos relatos de formação de complexos SSTR5-DRD2 e SSTR2-DRD2 com maior atividade funcional ressaltam que a associação de drogas parece ser promissora no tratamento medicamentoso da DC.

A terapia combinada pode ser administrada pela utilização das duas drogas isoladamente ou por meio de compostos quiméricos entre SST e dopamina (Jaquet et al., 2005; Saveanu et al., 2006). Na Tabela 5 podemos analisar as diferentes afinidades dos diversos análogos da SST, agonistas dopaminérgicos e de uma molécula quimérica.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

1. Verificar o efeito do tratamento com octreotide, com cabergolina e da associação de ambos nas concentrações de cortisol urinário e ACTH plasmático em pacientes com doença de Cushing.

2. Correlacionar a resposta laboratorial a esses agonistas com a expressão tumoral dos receptores de somatostatina dos subtipos 2 (*SSTR2*) e 5 (*SSTR5*) e do receptor de dopamina do subtipo D2 (*DRD2)*.

3. Correlacionar a expressão do RNA mensageiro dos receptores de somatostatina dos subtipos 2 (*SSTR2*) e 5 (*SSTR5*) e do receptor de dopamina do subtipo D2 (*DRD2)* com as suas respectivas proteínas por meio do estudo de imunohistoquímica.

4. Avaliar se o uso das drogas octreotide e/ou cabergolina pode induzir a alguma alteração na expressão do RNA mensageiro dos receptores de somatostatina dos subtipos 2 (*SSTR2*) e 5 (*SSTR5*) e do receptor de dopamina do subtipo D2 (*DRD2).*

3 MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Em concordância com as diretrizes médicas internacionais para pesquisa com seres humanos, este projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Pós-graduação do Departamento de Clínica Médica da FMUSP e pela Comissão de Ética para a Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP (Anexo B). Todos os pacientes ou seus representantes legais foram devidamente informados e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

3.2 Pacientes e Amostras

Entre janeiro de 2005 e junho de 2009, foram avaliados 33 pacientes com DC, com mediana de idade de 31,5 anos (21 a 53 anos), sendo 29 do sexo feminino e 4 do sexo masculino. Os pacientes foram provenientes principalmente da Unidade de Neuroendocrinologia da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e da Unidade de Neuroendocrinologia da Divisão de Neurocirurgia do HC-FMUSP.

DC foi diagnosticada baseando-se na presença de sinais e sintomas de hipercortisolismo associado ao quadro hormonal sugestivo de DC. O mesmo foi estabelecido pela dosagem do F urinário (média aritmética de três amostras), perda do ritmo circadiano de secreção do F (dosagem do F sérico e salivar entre 23-24h) e ausência de supressão do F após 1 mg de dexametasona. No diagnóstico diferencial da SC ACTH-dependente foram realizados: dosagem do ACTH plasmático, RM da região hipofisária, tomografia axial computadorizada de abdome, de tórax e da região cervical, além dos testes da desmopressina e hCRH.

Nos casos duvidosos ou negativos para tumor hipofisário no exame de RM, foi indicado o CBSSPI, sendo definido como gradiente centro-periferia a relação das concentrações plasmáticas de ACTH > 2 no basal e > 3 pós-estímulo (DDAVP e/ou CRH) e a lateralização definida quando o gradiente interseios petrosos inferiores de ACTH foi > 1,4 (Oldfield et al., 1985).

Todos os pacientes avaliados tiveram o diagnóstico etiológico confirmado. O critério utilizado para a confirmação do diagnóstico foi o achado histopatológico de tumor (adenoma hipofisário) com imunohistoquímica positiva para ACTH na cirurgia atual ou em cirurgia prévia ou com exame histopatológico evidenciando hipófise normal, mas com remissão clínica e laboratorial após a cirurgia hipofisária. Todos os tumores hipofisários foram analisados pelo mesmo patologista, Prof. Dr. Sérgio Rosenberg, do Serviço de Anatomia Patológica do HC-FMUSP.

Todos os pacientes (n=11) selecionados para o protocolo de tratamento medicamentoso antes da cirurgia realizaram estudo ultrassonográfico

abdominal e eletrocardiograma de repouso para a avaliação de possível colecistopatia crônica calculosa e distúbios de condução que predisponham ao desenvolvimento de bradiarritmias. Pacientes portadores dessas condições clínicas foram excluídos do protocolo.

Foram incluídos pacientes portadores de DC recém diagnosticada, portanto sem tratamento específico prévio para o controle do hipercortisolismo (foram mantidos os medicamentos relacionados às comorbidades e complicações da doença). Uma única paciente incluída no grupo tratado (BOM) apresentava recidiva tumoral após quatro anos da cirurgia onde foi encontrado adenoma hipofisário produtor de ACTH.

Não foram incluídos pacientes portadores de contra-indicações ao uso das medicações cabergolina e octreotide ou de condições nas quais a segurança de uso desses medicamentos ainda não esteja esclarecida. Assim, foram excluídos: mulheres gestantes ou que estivessem em período de aleitamento, crianças, portadores de hipersensibilidade a esses medicamentos ou a qualquer alcalóide do ergot, de insuficiência hepática grave (Child-Pugh > 10) e de distúrbios de condução cardíacos associados à bradiarritmias (ritmos não sinusais, doenças do nó sinusal ou do nó átrio-ventricular e bloqueios bifasciculares). Também foram excluídos pacientes com quadro de hipercortisolismo grave que necessitassem de resolução precoce por procedimento cirúrgico, ou seja, pacientes portadores de fraqueza muscular intensa que impossibilitasse a deambulação; hipertensão arterial sistêmica de difícil controle (refratariedade ao uso de três ou mais drogas anti-hipertensivas em doses otimizadas);

DM resistente à insulinoterapia intensiva e osteoporose grave (associada a fraturas osteoporóticas).

Onze indivíduos portadores de DC, que não receberam tratamento medicamentoso previamente à cirurgia transesfenoidal foram selecionados como grupo controle e tiveram parte de seus tumores também analisados do ponto de vista molecular e imunohistoquímico.

Todos os pacientes foram submetidos à cirurgia hipofisária transesfenoidal pelo mesmo neurocirurgião, Dr. Valter Ângelo S. Cescato, médico da Unidade de Neuroendocrinologia da Divisão de Neurocirurgia do HC-FMUSP. Durante o ato operatório, fragmentos do tumor foram coletados em condições estéreis em tubos de prolipropileno para congelamento, hermeticamente fechados e acondicionados em nitrogênio líquido, armazenados a – 80 ºC para posterior análise. Outro fragmento tumoral foi enviado para análise anátomo-patológica, complementada com estudo imunohistoquímico.

Dois casos de DC (grupo tratado) foram excluídos do estudo molecular por terem apresentado histologia de hipófise normal. Desses pacientes temos apenas os resultados hormonais.

Durante todo o período de tratamento eram realizadas ligações telefônicas semanais para o seguimento da aderência às drogas prescritas e a dosagem sérica da prolactina (PRL) ao término de cada mês pôde indicar o uso correto da cabergolina.

Foram coletados também fragmentos de três hipófises sem evidências de qualquer patologia, provenientes de produtos de necropsias

de indivíduos sem doença hipofisária que foram usados como controles, cuja autorização foi concedida pelo Serviço de Verificação de Óbitos da Cidade de São Paulo (Anexo C).

3.3 Protocolo de Tratamento e Avaliação Laboratorial

Após confirmação diagnóstica e coleta de três amostras de F urinário, PRL sérica e ACTH plasmático, os pacientes iniciaram o uso de acetato de octreotide (OCT) 100 µg, administrado através de injeção subcutânea a cada 8h durante 30 d. Após esse período, foram coletadas três amostras de F urinário, PRLsérica e ACTH plasmático, para avaliar o efeito dessa medicação. Em seguida, iniciou-se a administração de cabergolina (CAB) 0,5 mg por via oral 3 vezes na semana isoladamente durante 30 d seguida de coleta de três amostras de F urinário, PRL sérica e ACTH plasmático. A seguir, foi novamente adicionado o OCT 100 µg por via subcutânea a cada 8h por mais 30 d, com nova coleta de três amostras de F urinário, PRL sérica e ACTH plasmático, após o tratamento combinado. Dessa forma, após três meses de tratamento clínico, esses pacientes foram submetidos ao procedimento cirúrgico onde foi coletado material tumoral para estudo molecular e imunohistoquímico (Figura 2). Foram descartadas amostras de urina com suspeita de erros de coleta (volume urinário inferior aos volumes normalmente apresentados pelo paciente em questão ou creatinina urinária inferior aos valores de referência).

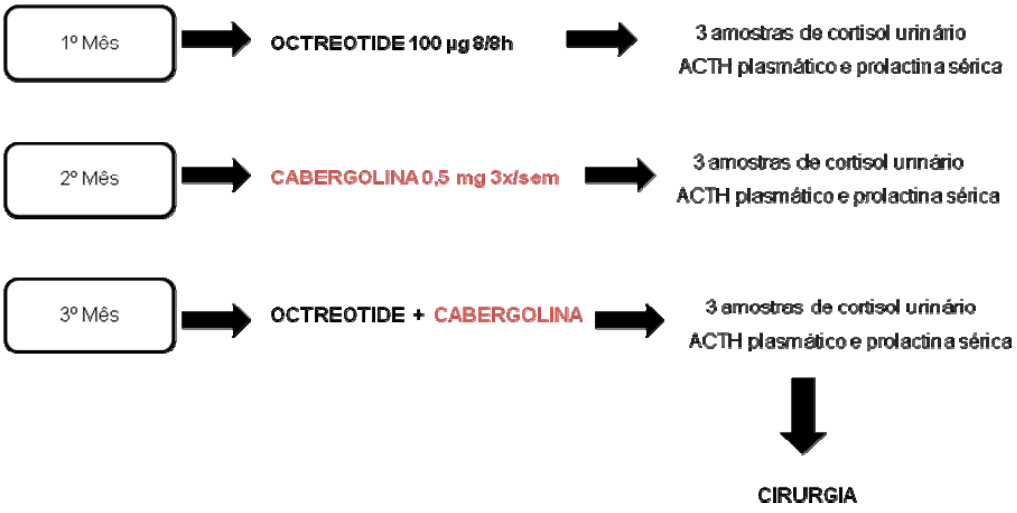

Figura 2 - Protocolo de tratamento dos pacientes

As dosagens hormonais foram realizadas no Laboratório de Hormônios (LIM-42) do Laboratório Central do HC-FMUSP. O cortisol urinário foi mensurado por fluoroimunoensaio (Wallac AutoDELFIA) sem extração prévia (Cortisol urinário total com valor de referência (VR): 30 a 300 µg/24h) com coeficiente de variação interensaio de 4,30 a 8,89%. O ACTH foi mensurado por método imunoradiométrico (CIS bio International, Gif/Yvette, França), com coeficientes de variação intra e interensaios < 14 % e < 20 %, respectivamente e sensilibidade de 5,07 pg/mL (VR: até 80 pg/mL). Os pacientes JOS, AMP, VBD e MA tiveram o ACTH dosado por método imunoquimioluminométrico (IMMULITE 2000), com sensibilidade de 5,0 pg/mL e coeficiente de variação interensaio de 1,00 a 3,88% (VR: até 46 pg/mL). A PRL foi dosada por método imunofluorométrico (Wallac AutoDELFIA) com sensibilidade de 0,2 ng/mL e coeficiente de variação interensaio de 2,62 a 9,75% (VR em homens : 2,0 a 10,0 ng/mL e mulheres : 2,0 a 15,0 ng/mL). O peso foi aferido em gramas.

3.4 Metodologia

3.4.1 Extração de RNA Total

Um pequeno fragmento do tecido tumoral (aproximadamente 50 mg) foi pulverizado no aparelho *Mikro-Dismembrator U* (*B. Braun Biotech International, Melsungen, Hesse, Germany)*. Durante todo processo o tecido foi mantido congelado em nitrogênio líquido, prevenindo a atividade de enzimas que pudessem degradar o RNA. O pulverizado foi homogeneizado em 1,0 mL de uma solução de fenol e isotiocianato de guanidina denominada *TRIzol® Reagent* (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*). Após homogeneização por pipetagem, a mistura foi transferida para um tubo tipo *eppendorf* estéril de 1,5 mL e incubada em temperatura ambiente (TA) por um período de 5 min. Concluída a incubação, adicionou-se 200 µL de clorofórmio à solução, a qual foi, em seguida, agitada vigorosamente em *Vortex Genie® 2T (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA)* por 15 s; mais uma vez incubada em TA, agora por 3 min. Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação durante 15 min a 12 000 rotações por minuto (rpm) a 4ºC em centrífuga refrigerada *Eppendorf 5804R (Eppendorf AG, Hamburg,* Alemanha), com a separação de três fases. O RNA total presente na fase superior (sobrenadante) foi transferido para um novo tubo estéril de 1,5 mL e submetido à precipitação com 500 µL de álcool isopropílico com 10 min de incubação em gelo e posterior centrifugação a 12 000 rpm por 10 min a 4ºC. O sobrenadante foi removido e ao botão de RNA resultante foi

acrescido 1,0 mL de etanol 75% para lavagem. Depois da homogeneização em *Vortex Genie® 2T (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA)* e centrifugação a 7 500 rpm, por 5min a 4ºC, o botão de RNA foi solubilizado em água livre de RNAses (água milli-Q estéril).

A concentração de RNA total foi determinada em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (*NanoDrop Technologies,* Wilmington*, DE, USA*) nos comprimentos de onda 260 nanômetros (nm). O grau de pureza também foi avaliado pela relação 260/280 nm, que deve ser superior a 1,8 para ácidos nucléicos. Pequena quantidade deste RNA (500 ng) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,2 % corado com brometo de etídio (EtBr) (3,0 μg/mL) para verificar a integridade do material pela presença das bandas de RNA ribossomais 28 S e 18 S, após exposição à luz ultravioleta (UV). O RNA ficou armazenado a – 80ºC até posterior utilização.

A maioria dos tumores avaliados eram microadenomas e os fragmentos submetidos à extração resultaram, em alguns casos, em baixas concentrações de RNA. Nesses casos, a avaliação do RNA foi realizada com o equipamento *Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies,* Palo Alto, CA, USA) que permite a utilização de apenas 1,0 μL para avaliação tanto da qualidade quanto da quantidade do RNA. Foi realizada eletroforese capilar das amostras extraídas com utilização do RNA 6000 *Nano Kit*, cuja faixa de avaliação abrange um valor de 5,0 ng/μL a 500 ng/μL. O número de integridade do RNA (RIN) foi utilizado para avaliar a qualidade do RNA (escala 1–10, sendo 1 a menor e 10 a maior qualidade do RNA).

3.4.2 Síntese do cDNA e RT-PCR Semiquantitativa do Gene *GAPDH*

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1,0 μg de RNA total de cada amostra pela utilização da transcriptase reversa (*SuperScript*^{TM} *II Reverse Transcriptase* - Invitrogen, Life Technologies) com oligo(dt)12 (*Random Primers* - Invitrogen, Life Technologies), de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA recém-sintetizado foi diluído em água milli-Q estéril para um volume final de 20 μL e armazenado a – 20ºC.

A qualidade dessas amostras foi verificada pela amplificação com RT-PCR semiquantitativa do gene controle interno *GAPDH* (gliceraldeído trifostato desidrogenase). Somente as amostras que apresentaram amplificação do gene *GAPDH* foram consideradas nesse trabalho (Barber et al., 2005; Mane et al., 2008).

A PCR para a amplificação do gene *GAPDH*, previamente padronizada, foi realizada com 1,0 μL de cDNA, 5,0 μL de tampão da enzima 1 X [Tris-HCl 10 mM (pH 9.0), KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM], 1,0 μL dNTP *mix*, 1,0 μL do iniciador *GAPDH sense* (10 pmol/μL), 1,0 μL do iniciador *GAPDH antisense* (10 pmol/μL), 0,2 μL da enzima *Taq* DNA polimerase *(GE Healthcare Bio-Science*) e 40,8 μL de água estéril. Essa reação foi incubada em termociclador *Master Cycler (Eppendorf AG*) inicialmente a 95 ºC por 2 min (desnaturação inicial), seguido por 40 ciclos a 95ºC por 30 s (desnaturação), 57ºC por 1min e 30 s (*annealing*) e 72ºC por 1 min e 30 s (extensão), com extensão final a 72ºC por 5 min. O produto de PCR resultante apresentou

281 pares de bases (pb) e foi analisado em gel de agarose 2,0 % corado com EtBr e visualizado em transiluminador de luz UV.

Os oligonucleotídeos empregados nas reações realizadas nesse estudo foram obtidos com o auxílio do programa *Primer3* (frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi - Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Reino Unido) (Rozen e Skaletsky, 2000). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, a temperatura de *annealing* e o tamanho do fragmento amplificado dos genes *T-PIT*, *PIT-1*, *GAPDH*, *SSTR2*, *SSTR5* e *DRD2* estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes e suas respectivas temperaturas de *annealing* e tamanho do fragmento em pares de bases

Gene	Oligonucleotídeos		Temperatura *Annealing* (°C)	Tamanho do fragmento em pares de base (pb)
	Sense (5' → 3')	*Antisense* (5' → 3')		
SSTR2	ATG CCA AGA TGA AGA CCA TCA C [1]	TGA ACT GAT TGA TGC CAT CCA [1]	57	170
SSTR5	GAT GAA GAC CGT CAC CAA CA	TGT CAG GCA GAA GAC ACT GG	55	184
DRD2	CTG CAG ACC ACC ACC AAC TA [2]	TGA CGT CCA GAG TGA CGA AG [2]	58	154
GAPDH	GCC AAA AGG GCT ATC ATC TC	GCA GGG ATG ATG TTC TGG AG	57	281
T-PIT	ACA CCA ACG GAC CAA TCA AT	AGA AGG GGG TGA AGT CAC AG	59	158
PIT-1	GTG GGA GCA AAT GAA AGG AA	ACC CGT TTT TCT CTC TGC CT	57	194

[1] Oligonucleotídeos capazes de reconhecer as duas isoformas de *SSTR2* (*SSTR2a* e *SSTR2b*); [2] Oligonucleotídeos capazes de reconhecer as duas isoformas de *DRD2* (curta e longa)

3.4.3 RT-PCR Semiquantitativa dos Genes *PIT-1, T-PIT e GAPDH*

Com o intuito de afastar possível contaminação com tecido hipofisário normal, foi realizada RT-PCR semiquantitativa para a co-amplificação do gene *PIT-1* (Kelberman e Dattani, 2007), gene normalmente expresso no tecido hipofisário normal e do gene controle interno *GAPDH* em todas as amostras de hipófise normal e tumores corticotróficos (Korbonits et al., 2001).

O gene *T-PIT* (*TBX19*) por ter expressão unicamente em células corticotróficas nos garante que o fragmento submetido à extração de RNA contém estas células (Kelberman e Dattani, 2007). Por essa razão, foi realizada RT-PCR semiquantitativa para a co-amplificação do gene *T-PIT* e do gene controle *GAPDH* em todas as amostras de hipófise normal e tumores corticotróficos.

A reação de co-amplificação foi padronizada quanto à temperatura ideal de *annealing*, para garantir fragmentos amplificados de alta qualidade e impedir a amplificação de produtos inespecíficos. Foi padronizado também o número ideal de ciclos nessa co-amplificação para que a reação termine na fase exponencial de amplificação, longe do ponto de saturação. A reação foi realizada a partir de 1,0 μL de cDNA, 5,0 μL de tampão da enzima 1 X [Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), KCl 50 mM], tampão *enhancer* 1 X, 2,0 mM $MgCl_2$, 1,0 μL dNTP, 1,0 μL (1,0 μM) do iniciador de cada oligonucleotídeo (*GAPDH*, *PIT1* e *TPIT*) *sense* e *antisense* e 0.2 μL *Taq Platinum* DNA polimerase (*Invitrogen, Life Technologies*). A reação para os genes *PIT-1* e *GAPDH* ocorreram no termociclador *Master Cycler* (Eppendorf AG) a 95ºC

por 2 min (desnaturação inicial), seguido de 40 ciclos a 95ºC por 30 s (desnaturação), 57ºC por 1 min e 30 s (*annealing*) e 72ºC por 1 min e 30 s (extensão), com 5 min de extensão final a 72ºC.

O protocolo de amplificação para o gene *T-PIT* consistiu de uma pré-desnaturação a 95°C por 5 min, seguida de 28 ciclos a 95°C por 30 s (desnaturação), com a temperatura de *annealing* de 59°C por 30 s e 72°C por 30 s (extensão), seguidos de um ciclo de extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos da PCR contendo os fragmentos amplificados dos gene *T-PIT*, *PIT-1* e *GAPDH* foram fracionados em gel de agarose 2,0 % corado com EtBr e visualizados em luz UV.

3.4.4 qRT-PCR dos Genes em Estudo

Em função da alta sensibilidade e por permitir a quantificação seja de transcritos raros, seja de pequenas mudanças na expressão gênica, a RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) é a técnica de escolha para a análise da expressão de mRNA derivado de várias fontes. Esta técnica possibilita a aferição da quantidade de um produto amplificado a cada ciclo da reação em cadeia da polimerase.

Esta técnica rápida e precisa permite a determinação direta dos produtos amplificados durante a fase exponencial da reação. Esse fragmento amplificado é marcado pelo reagente *SYBR Green*, que emite fluorescência ao se ligar ao DNA dupla fita recém-sintetizado, e pode ser lido durante a reação por um detector em tempo real.

Neste trabalho, foi utilizado o método de quantificação relativa, uma vez que não é necessário saber o número absoluto de cópias de cada gene e sim a diferença de expressão entre os diferentes tecidos estudados (Giulietti et al., 2001). Esse método envolve a quantificação do gene de interesse em relação a um gene controle, nesse caso o *GAPDH*.

As reações foram realizadas no aparelho *Rotor-Gene RG-3000* (Corbett Research, Sidney, Austrália) utilizando-se o produto comercial *Platinum® SYBR® Green q-PCR SuperMix-UDG kit* (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*), conforme recomendado pelo fabricante, mas com algumas modificações, como demonstrado a seguir:

Platinum® SYBR® Green q-PCR SuperMix-UDG	12,5µL
Iniciador *Forward* (10 pmol/µL)	1,0µL
Iniciador *Reverse* (10 pmol/µL)	1,0 µL
cDNA (100 ng/µL)	2,0 µL
Água estéril q.s.p.	25,0 µL

Como dito anteriormente, os iniciadores usados nas reações de RT-PCR e qRT-PCR foram cuidadosamente desenhados para evitar a amplificação de produtos inespecíficos e formação de dímeros, uma vez que o *SYBR Green* se liga a qualquer DNA dupla fita. Todos os oligonucleotídeos foram desenhados para exons diferentes exceto o iniciador para o gene *SSTR5* que contem apenas 1 exon. Para evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico, o tratamento com DNAse (*Invitrogen*

Corporation, Deoxyribonuclease I amplification grade) foi realizado a partir de 1,0 μg de RNA total de cada amostra antes da síntese do DNA complementar que foi utilizado durante qRT-PCR do gene *SSTR5.* Conforme descrito na seção de Resultados, a expressão do gene *SSTR5* não pôde ser analisada, pois grande parte do RNA disponível foi degradada durante o tratamento com a DNAse.

A reação foi incubada e aquecida a 95ºC por 5 min. Em seguida, a reação de amplificação ocorreu em 40 ciclos sob as seguintes condições: desnaturação à 95ºC por 20 s, 58ºC (*DRD2*) ou 57ºC (*GAPDH*) ou 57ºC (*SSTR2*) por 30 s para o *annealing*, 72ºC por 30 s e 72°C por 15 s. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, tanto para os genes alvo quanto para o gene controle.

Após a geração do fragmento, o aparelho promove desnaturação lenta e contínua entre 72ºC e 99ºC, gerando uma curva de *melting*, onde é possível verificar a presença de produtos amplificados inespecíficos e dímeros de iniciadores. A reação é considerada específica para os produtos da PCR quando a curva apresenta apenas um pico em uma determinada temperatura em todas as amostras analisadas para determinado gene. A especificidade também pode ser demonstrada após eletroforese do produto da reação da qRT-PCR em gel de agarose 2,0%, que deve demonstrar não apenas a presença de um único produto amplificado, mas também o tamanho do fragmento desejado para cada um dos genes estudados e para o gene controle interno.

A quantificação relativa foi obtida pelos valores de limiar do ciclo (CT - *threshold cycle*), que representa a fluorescência detectada do produto da PCR na fase exponencial de amplificação (Ginzinger, 2002). O CT é um momento da reação que pode ocorrer em qualquer intervalo entre um ciclo e outro da PCR.

O modelo matemático adotado para calcular a intensidade de expressão relativa depende da eficiência de amplificação dos genes alvo e controle. Nesse contexto, para a quantificação relativa dos produtos de amplificação, foi efetuada a análise da eficiência de amplificação dos genes alvos e do controles interno. Para isso, foram realizadas curvas com diluições seriadas do cDNA do tecido hipofisário normal, partindo-se de 500 ng de cDNA e fazendo-se uma diluição seriada de 1:10, com até 5 pontos, para cada um dos genes estudados. Cada uma das diluições foi amplificada tanto para os genes alvos quanto para o gene controle interno.

A eficiência de amplificação foi calculada pela subtração entre os valores do CT dos genes alvos e *GAPDH*, e esse resultado foi plotado em um gráfico contra o logaritmo da quantidade da cDNA inicialmente colocada. Se a inclinação da reta, ou *slope* = y*,* é menor que 0,1 (positivo ou negativo), a eficiência de amplificação entre os genes é considerada similar. Conforme será demonstrado na Seção de Resultados, as análises das eficiências de amplificação dos genes *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5* não foram semelhantes à do *GAPDH*, assim, o cálculo comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ não pôde ser utilizado (Livak e Schmittgen, 2001). Dessa forma, optou-se pela utilização do modelo

matemático descrito por Pfaffl (2001), no qual a taxa de expressão relativa (R) é baseada na seguinte equação:

$$R = \frac{(E_{alvo})^{\Delta CP_{alvo}(\text{referência} - \text{amostra})}}{(E_{GAPDH})^{\Delta CP_{GAPDH}(\text{referência} - \text{amostra})}}$$

$$Eficiência = -1 + (10^{-1/slope})$$

O valor do ponto de cruzamento (CP – *cross point*) representa a fluorescência do limiar da amostra na fase exponencial de amplificação, assim como o CT. Nessa análise também é considerado um cDNA referência (hipófise normal). Sendo que, a razão (R) descreve a expressão relativa entre o gene alvo e o gene controle (*GAPDH*). A eficiência de amplificação (E) da reação, tanto do gene alvo como do *GAPDH* é dada pela curva com diluições seriadas, conforme descrito anteriormente. O ΔCP do gene alvo, é a diferença entre o valor de CP do cDNA referência e o CP da amostra, e o ΔCP do *GAPDH* é a diferença do CP referência e o CP amostra. Em seguida, é calculada a razão entre o ΔCP gene alvo e ΔCP *GAPDH.*

3.4.5 Micromatriz tecidual (TMA) e Imunohistoquímica

Cortes histológicos representativos dos tumores dos pacientes do grupo tratado e do grupo controle, corados pela hematoxilina e eosina foram revisados e as áreas de interesse foram selecionadas nas lâminas.

As mesmas áreas foram marcadas nos respectivos blocos de parafina doadores de tecidos. Cilindros de 1,0 mm de diâmetro das áreas marcadas nos blocos de parafina doadores foram transportados para um único bloco de parafina receptor através de um sistema mecanizado de precisão (*Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA*), com um intervalo de 0,3 mm entre os cilindros. Cada cilindro foi alocado numa posição do bloco receptor definida em um sistema cartesiano de coordenadas, com o conjunto das amostras constituindo uma micromatriz tecidual (TMA número T0223) com sete linhas e sete colunas. No total, o TMA construído contém 37 posições (35 amostras de 13 casos, com duas ou três amostras por caso). Duas amostras de hipófise normal foram usadas para determinar o posicionamento do TMA. Uma vez pronto, o bloco de TMA foi então cortado em secções histológicas numeradas e consecutivas de 3 µm (*Leica Instruments, Singapura*). Foram considerados perdidos os cilindros que se apresentavam fisicamente ausentes nas lâminas ou aqueles cuja representação não condizia com a área originalmente marcada. Apenas um caso foi perdido pelo TMA por perda física e outro perdido por perda de representação. Ambos os casos foram recuperados pela técnica convencional.

Para a realização das reações imunohistoquímicas, uma lâmina foi utilizada para cada marcador. O método imunohistoquímico realizado foi imunoperoxidase com recuperação antigênica pelo calor úmido ou digestão enzimática modificada. A técnica constitui em desparafinização e hidratação das lâminas contendo os cortes histológicos dos blocos de TMA. Foi então

realizada recuperação antigênica com tampão citrato 10 mM, pH 6,0 (para os anticorpos anti-SSTR2, DRD2 e SSTR5) em panela de pressão por 40 min em ebulição.

Após as lavagens em PBS pH 7,4, seguiu-se etapa de bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 20V, 1:1 em solução de metanol, repetida 3 vezes por 10 min em TA. Após lavagens em PBS pH 7,4, realizou-se bloqueio inespecífico de carga com CASBlock ™ (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) por 10 min a 37°C. Depois da retirada do excesso, cada lâmina foi incubada por 30 min a 37°C, seguida por incubação *overnight* a 4 °C, com um dos anticorpos primários, em título definido previamente no laboratório com controles positivos (Tabela 8).

Tabela 8 - Anticorpos utilizados para análise imunohistoquímica

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Título	Compartimento celular relevante
Anti - *SSTR2* [1]	monoclonal	*Biotrend*	1:25	membrana e citoplasma
Anti - *SSTR5*	policlonal	*Santa Cruz Biothecnology*	1:100	citoplasma
Anti - *DRD2* [2]	policlonal	*Millipore*	1:25	citoplasma

[1] Anticorpo capaz de reconhecer as duas isoformas de SSTR2 (SSTR2a e SSTR2b);
[2] Anticorpo capaz de reconhecer as duas isoformas de DRD2 (curta e longa)

Em cada cilindro de amostras tumorais, foram avaliados os compartimentos celulares relevantes para cada anticorpo, utilizando-se escalas semiquantitativas e faixas percentuais descritas na Tabela 9. Quando um caso apresentou valores diferentes entre os cilindros, foi escolhido o maior valor para representar o caso.

Devido à escassez de material proveniente dos tumores corticotróficos, em outros 14 casos o estudo imunohistoquímico foi realizado de maneira convencional, através de cortes histológicos tirados diretamente dos blocos de parafina originais.

Todas as análises foram realizadas por dois observadores (sendo um deles patologista), de forma consensual e sem acesso aos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes.

Tabela 9 - Escala para avaliação semiquantitativa da imunorreatividade

Classificação	Descrição
0	Ausência de imunorreatividade para determinado antígeno
1+	0 a 10% das células neoplásicas imunorreativas para determinado antígeno
2+	11 a 25% das células neoplásicas imunorreativas para determinado antígeno
3+	26 a 50% das células neoplásicas imunorreativas para determinado antígeno
4+	51 a 100% das células neoplásicas imunorreativas para determinado antígeno

O receptor DRD2 é altamente expresso no tecido hipofisário normal de humanos e por essa razão o controle foi hipófise humana (Stefaneanu et al., 2001).

Os receptores de SST são altamente expressos no tecido pancreático e por essa razão o controle para as reações dos receptores SSTR2 e SSTR5 foi pâncreas humano. O anticorpo para o receptor SSTR2 também foi testado em um somatotrofinoma que sabidamente apresentava uma elevada expressão do mRNA desse receptor.

3.5 Análise Estatística

Os dados dos valores de F urinário não apresentaram distribuição normal em nenhuma das condições (Basal, após 30 d de OCT, após 30 d de CAB e após 30 d de associação das duas medicações). Por esse motivo, os dados foram descritos em mediana e intervalos inter-quartílicos.

Foi calculada a variação média das três amostras de F urinário durante cada uma das quatro fases do protocolo para cada paciente e calculado o desvio-padrão médio.

As comparações entre os dados hormonais (ACTH plasmático, F urinário e PRL sérica) dos três grupos em uso de medicações (após 30 d de OCT, após 30 d de CAB e após 30 d de associação das duas medicações) e o grupo basal foram feitas pelo Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Foi calculada a correlação de Spearman (Conover, 1980) entre o F urinário e o ACTH plasmático para avaliar se existe relação entre eles durante as diferentes fases do tratamento.

A comparação entre o peso inicial (início do protocolo) e o peso final (após um mês de associação das drogas) foi realizada pelo teste t-student pareado (Kirkwood e Sterne, 2006).

Também foi calculada a correlação de Spearman (Conover, 1980) entre a variação de peso (peso em gramas no início do protocolo e ao término de um mês de associação das drogas) e as variações de F urinário e ACTH plasmático.

As comparações entre as expressões do mRNA dos receptores *SSTR2* e *DRD2* no grupo de pacientes tratados em relação ao grupo de pacientes controles foram feitas pelo Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon. Foi calculada a correlação de Spearman entre a expressão desses receptores pelo método de qRT-PCR e imunohistoquímica (Conover, 1980).

Os dados foram compilados em planilhas de cálculos e analisados utilizando-se o programa JMP versão 5.1.1 (*SAS Institute Inc, Cary, NC, USA*). Foram considerados significantes valores de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Resposta Hormonal e Clínica ao Protocolo de Tratamento

O grupo controle era formado por 11 pacientes (10 do sexo feminino e 1 do sexo masculino) com idades que variaram entre 21 e 43 anos (mediana de 30 anos). Esses pacientes representavam casos novos de DC que não receberam tratamento previamente à cirurgia transesfenoidal e, portanto mantinham-se em hipercortisolismo (Tabela 10).

Tabela 10 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes do grupo controle

N	PACIENTE	SEXO	IDADE	1º/ REC	F pré cirurgia
1	APS	F	27	1º	2.880
2	MARO	F	43	1º	752
3	IF	F	38	1º	1.092
4	ISF	F	27	1º	783
5	EEFA	F	36	1º	984
6	AMAS	M	25	1º	5.874
7	FSF	F	21	1º	804
8	CLCN	F	42	1º	650
9	LMGA	F	41	1º	510
10	CMR	F	30	1º	902
11	ACB	F	28	1º	429

1º: tratamento primário; REC: tratamento da recidiva;
F: cortisol urinário antes da cirurgia
(VN: 30-300 µg/24h, fluoroimunoensaio, não extraído);
M: sexo masculino; F: sexo feminino; idade em anos

O grupo tratado era também formado por 11 pacientes (2 do sexo masculino e 9 do sexo feminino), com idades que variaram entre 22 e 53 anos (mediana de 29 anos). Apenas uma paciente apresentava recidiva de DC, sendo que a primeira cirurgia confirmou o achado de adenoma hipofisário produtor de ACTH. Todos os outros pacientes eram recém-diagnosticados. Dois pacientes (BOM e VVC) apresentaram hipófise normal na avaliação anátomo-patológica, não podendo ser realizado estudo molecular ou imunohistoquímico desses tumores. O diagnóstico de DC foi confirmado, pois ambos apresentaram remissão do hipercortisolismo após a cirurgia.

A Tabela 11 descreve as características clínicas e o achado cirúrgico dos pacientes que participaram do protocolo de tratamento previamente à cirurgia transesfenoidal.

Tabela 11 - Características clínicas e achados cirúrgicos dos pacientes que receberam o protocolo de tratamento previamente à cirurgia transesfenoidal (grupo tratado)

N	PACIENTE	SEXO	IDADE	1º/ REC	HISTOLOGIA
1	VVC	M	38	1º	Hipófise normal
2	BOM	F	23	REC	Hipófise normal
3	RHLP	F	22	1º	ACTH positivo > 50%
4	LB	F	29	1º	ACTH positivo > 50%
5	PRM	F	22	1º	ACTH positivo > 50%
6	FMD	F	26	1º	ACTH positivo > 50%
7	MZCS	F	53	1º	ACTH positivo > 50%
8	JOS	F	26	1º	ACTH positivo > 50%
9	AMP	F	31	1º	ACTH positivo > 50%
10	VBD	F	33	1º	ACTH positivo > 50%
11	MA	M	34	1º	ACTH positivo > 50%

1º: tratamento primário; REC: tratamento da recidiva; M: sexo masculino; F: sexo feminino; idade em anos

A Tabela 12 descreve a evolução hormonal (F urinário) dos pacientes do grupo tratado nos diferentes momentos do protocolo.

Tabela 12 - Evolução hormonal (cortisol urinário) dos pacientes nas diferentes etapas do tratamento (basal, após 30 dias de octreotide isoladamente, após 30 dias de cabergolina isoladamente e após 30 dias da associação entre octreotide e cabergolina)

N	PACIENTE	F BASAL	F OCT	% OCT	F CAB	% CAB	F OCT+ CAB	% OCT+ CAB
1	VVC	1.918	1.396	- 27.3%	1.548	-19.3%	931	-51.5%
2	BOM	597	458	- 23.2%	412	- 31.1%	408	- 31.7%
3	RHLP	534	470	-12.0%	384	- 28.1%	294	- 44.9%
4	LB	437	607	38.8%	290	- 33.7%	534	22.1%
5	PRM	1.488	1.745	17.2%	1.736	16.6%	1.229	- 17.4%
6	FMD	1.322	967	- 26.8%	851	- 35.6%	731	- 44.7%
7	MZCS	830	802	- 3.3%	675	- 18.7%	497	- 40.1%
8	JOS	443	262	- 40.9%	401	-9.6%	418	- 5.6%
9	AMP	678	384	- 43.4%	408	- 40.0%	451	- 33.0%
10	VBD	481	332	-30.9%	420	-12.6%	500	3.9%
11	MA	534	669	25.2%	547	2.0%	586	10.0%

F basal: média das três amostras de cortisol urinário antes do tratamento. F Octreotide: média das três amostras de cortisol urinário após 30 dias de octreotide isoladamente. % OCT: porcentagem de queda ou aumento dos valores de cortisol urinário após 30 dias de octreotide isoladamente em relação ao valor basal. F Cabergolina: média das três amostras de cortisol urinário após 30 dias de cabergolina isoladamente em relação ao valor basal. % CAB: porcentagem de queda ou aumento dos valores de cortisol urinário após 30 dias de cabergolina isoladamente. F Octreotide e Cabergolina: média das três amostras de cortisol urinário após 30 dias de octreotide associado à cabergolina. % OCT + CAB: porcentagem de queda ou aumento dos valores de cortisol urinário após 30 dias de octreotide associado à cabergolina em relação ao valor basal. (Cortisol urinário - VN: 30-300 µg/24h, fluoroimunoensaio, não extraído)

A Figura 3 ilustra a evolução hormonal (F urinário) dos pacientes nos diferentes momentos do tratamento (basal, após 30 d de OCT isoladamente, após 30 d de CAB isoladamente e após 30 d da associação entre OCT e CAB).

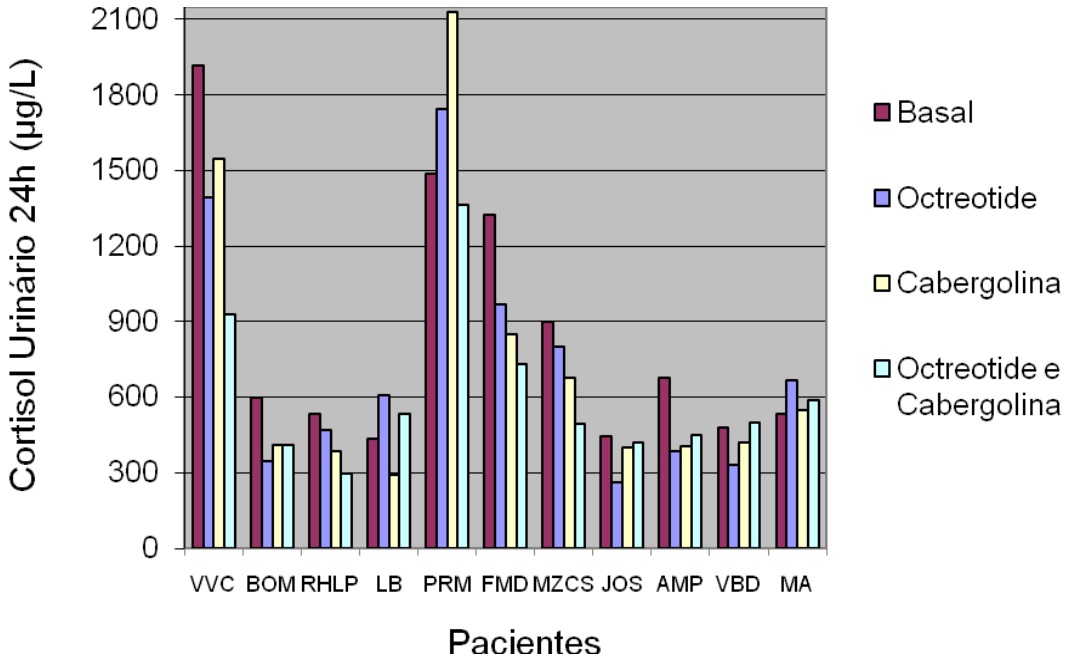

Figura 3 - Evolução hormonal (cortisol urinário) dos pacientes nos diferentes momentos do tratamento (basal, após 30 dias de octreotide isoladamente, após 30 dias de cabergolina isoladamente e após 30 dias da associação entre octreotide e cabergolina)

A variação média das três amostras de F urinário e o desvio padrão médio em cada um dos quatro momentos do protocolo foram calculados para que fosse excluída a possibilidade de a resposta observada ter sido fruto da variação da secreção de F que normalmente ocorre nos pacientes portadores de SC. Essa avaliação confirmou que o desvio-padrão em cada fase do tratamento foi menor que a redução média observada nos valores de F urinário ao término de cada fase do tratamento.

Logo, pôde-se atribuir ao tratamento proposto a redução ocorrida na secreção de F urinário (Tabela 13).

Tabela 13 - Descrição da variação média das três medidas de cortisol urinário em cada momento do protocolo

Momento	Desvio Padrão Médio [1]	Redução Média de F [2]
Basal	176,98	NA
Octreotide	99,69	106,7
Cabergolina	83,06	144,8
Octreotide e cabergolina	74,15	244,2

[1] Média entre os desvios-padrão da secreção de cortisol urinário de cada um dos 11 pacientes em cada momento do protocolo de tratamento; [2] média de redução observada nos valores de cortisol urinário em cada um dos momentos do protocolo de tratamento em relação ao basal; NA: não aplicável

Os valores basais de F urinário variaram de 437 a 1.918 µg/24h, com mediana de 597 µg/24h. Após a administração de OCT por 30 d, os valores de F urinário variaram de 262 a 1.745 µg/24h, com mediana de 607 µg/24h. Não houve queda estatisticamente significante nos valores de F urinário com o uso isolado de OCT (P=0,087).

Com a CAB administrada por 30 d, os valores de F urinário variaram de 290 a 1.736 µg/24h, com mediana de 420 µg/24h. A resposta ao uso isolado de CAB nos valores de F urinário foi considerada estatisticamente significante (P=0,016).

Com a associação das duas medicações por 30 d, os valores de F urinário variaram de 294 a 1.229 µg/24h, com mediana de 500 µg/24h. A resposta do F urinário ao uso da associação das medicações OCT e CAB apresentou significância estatística em relação ao basal (P = 0,012).

A redução do F urinário com a associação das drogas não foi maior que aquela observada com o uso isolado da CAB.

As medidas do ACTH plasmático foram corrigidas pelo valor máximo da normalidade para cada um dos dois métodos utilizados para dosagem do ACTH, visto que os pacientes VVC, BOM, RHLP, LB PRM, FMD e MZCS tiveram as dosagens de ACTH pelo método imunorradiométrico e os pacientes JOS, AMP, VBD e MA tiveram suas dosagens pelo método imunoquimioluminométrico (Tabela 14).

Tabela 14 - Evolução hormonal (ACTH) dos pacientes nos diferentes momentos do tratamento (basal, após 30 dias de octreotide isoladamente, após 30 dias de cabergolina isoladamente e após 30 dias da associação entre octreotide e cabergolina)

N	PACIENTE	ACTH BASAL	ACTH OCT	% ACTH OCT	ACTH CAB	% ACTH CAB	ACTH OCT + CAB	% ACTH OCT + CAB
1	VVC[1]	139	194	39,2%	231	65,8%	298	113,9%
2	BOM[1]	114	95	-16,4%	83,5	-26,5%	129	14,1%
3	RHLP[1]	70	68	-2,9%	79	12,9%	98	40,0%
4	LB[1]	53	70	30,8%	58	8,4%	47	-12,1%
5	PRM[1]	132	157	19,2%	135	2,5%	91	-30,9%
6	FMD[1]	80	68	-15,0%	120	50,0%	79	-1,3%
7	MZCS[1]	94	65	-31,2%	83	-12,2%	74	-21,7%
8	JOS[2]	139	112	-19,4%	104	-25,2%	87	-37,4%
9	AMP[2]	106	98	-7,3%	98	-7,3%	96	-9,1%
10	VBD[2]	54	66	23,0%	47	-12,4%	49	-8,7%
11	MA[2]	72	82	13,4%	69	-4,6%	87	20,3%

% ACTH OCT: porcentagem de queda ou aumento dos valores de ACTH após 30 dias de octreotide isoladamente em relação ao valor basal. % ACTH CAB: porcentagem de queda ou aumento dos valores de ACTH após 30 dias de cabergolina isoladamente em relação ao valor basal. % ACTH OCT + CAB: porcentagem de queda ou aumento dos valores de ACTH após 30 dias de octreotide associado à cabergolina em relação ao valor basal. ([1] pacientes cujas dosagens de ACTH foram realizadas pelo método imunorradiométrico, VN: < 80 pg/mL; [2] pacientes cujas dosagens de ACTH foram realizadas pelo método imunoquimioluminométrico, VN: < 46 pg/mL)

Não houve respostas estisticamente significantes nos valores de ACTH plasmático obtidos ao término de cada etapa do protocolo (após 30 d de OCT, após 30 d de CAB e após 30 d de associação das duas medicações) em relação aos valores basais (P = 0,949, P = 0,979 e P = 0,913, respectivamente).

Não houve correlação entre os valores de F urinário e os valores de ACTH plasmático antes e durante as diferentes etapas do protocolo de tratamento (P = 0,549).

Como esperado, não houve queda estatisticamente significante nos valores da PRL sérica com o uso isolado de OCT (P = 0,289), mas sim, com o uso isolado de CAB (P < 0,05) e o uso dessa medicação em associação ao OCT (P < 0,05). Esse dado foi utilizado apenas para assegurar a aderência ao uso da CAB.

O peso médio dos pacientes diminuiu de forma estatisticamente significante com o protocolo de tratamento (P = 0,009), sendo que a redução média observada foi de 5.210 g. A perda de peso não se correlacionou nem com a resposta do F urinário nem com a resposta do ACTH plasmático (Tabela 15).

Tabela 15 - Evolução do peso dos pacientes no momento basal e ao término do protocolo de tratamento

Paciente	Peso Basal	Peso Final	Variação de Peso (g)	Variação de Peso (%)
VVC	71 100	69 700	-1 400	-1,97%
BOM	87 000	76 000	-11 000	-12,64%
RHLP	84 000	71 000	-13 000	-15,48%
LB	81 000	76 800	-4 200	-5,19%
PRM	128 000	121 500	-6 500	-5,08%
FMD	101 700	98 500	-3 200	-3,15%
MZCS	108 700	95 800	-12 900	-11,87%
JOS	87 900	83 100	-4 800	-5,46%
AMP	62 800	60 300	-2 500	-3,98%
VBD	92 800	97 000	4 200	4,53%
MA	132000	130000	-2000	-1,52%

Peso basal: peso aferido em gramas no início do protocolo. Peso final: peso aferido em gramas ao término do protocolo

Todos os pacientes apresentaram queixa de aumento do ritmo intestinal com o uso de OCT que se manteve durante todo o período de uso dessa droga. Não houve efeitos adversos graves durante o protocolo de tratamento. Três pacientes (BOM, JOS e VBD) voltaram a apresentar ciclos menstruais regulares após o início do tratamento com OCT (24 dias, 27 dias e 28 dias, respectivamente). As mesmas apresentavam-se em amenorréia por 14, 13 e 13 meses, respectivamente.

A paciente MZCS que apresentou o diagnóstico de coronariopatia durante a avaliação pré-operatória manteve-se em uso da associação das medicações propostas por mais seis meses até a resolução do quadro para

posterior tratamento cirúrgico da DC. Nesse período, foi observada uma melhora importante dos quadros de DM e hipertensão arterial sistêmica, inclusive com a redução das doses de anti-hipertensivos e insulinoterapia. Essa paciente apresentava as três últimas medidas de F urinário dentro da normalidade (294 µg/24h, 288 µg/24h e 292 µg/24h).

4.2 Análise Molecular

Quinhentos nanograma do RNA extraído das hipófises normais e tumorais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2 % para verificação da integridade do material pela presença das bandas de RNA ribossomais 28 S e 18 S (Figura 4).

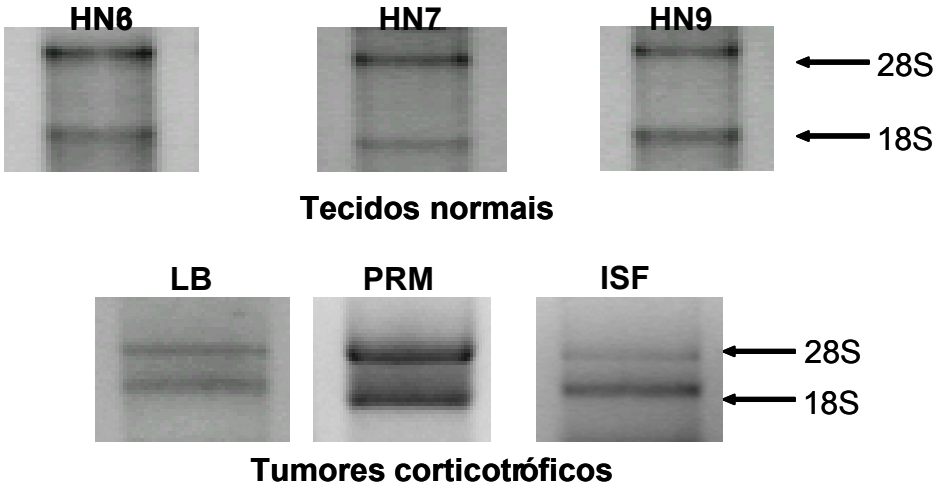

Figura 4 - Gel representativo da integridade do RNA total de três amostras de hipófise normal (HN6, HN7 e HN9) e três amostras de tumor corticotrófico (LB, PRM e ISF), em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídeo. As setas indicam as subunidades 28S e 18S dos RNAs ribossomais. Tu, tumor; HN, hipófise normal; CN, controle negativo; pb, pares de bases

Naqueles casos que apresentaram uma quantidade muito pequena de RNA, realizamos a avaliação através do equipamento *Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies,* Palo Alto, CA, USA), que permite a utilização de apenas 1,0 μL para análise tanto da qualidade quanto da quantidade do RNA. Foi realizada eletroforese capilar das amostras extraídas com utilização do RNA 6000 *Nano Kit*, cuja faixa de avaliação abrange um valor de 5,0 ng/μL a 500 ng/μL. O número de integridade do RNA (RIN) foi utilizado para avaliar a qualidade do RNA (escala 1–10, sendo 1 a menor e 10 a maior qualidade do RNA) (Figura 5).

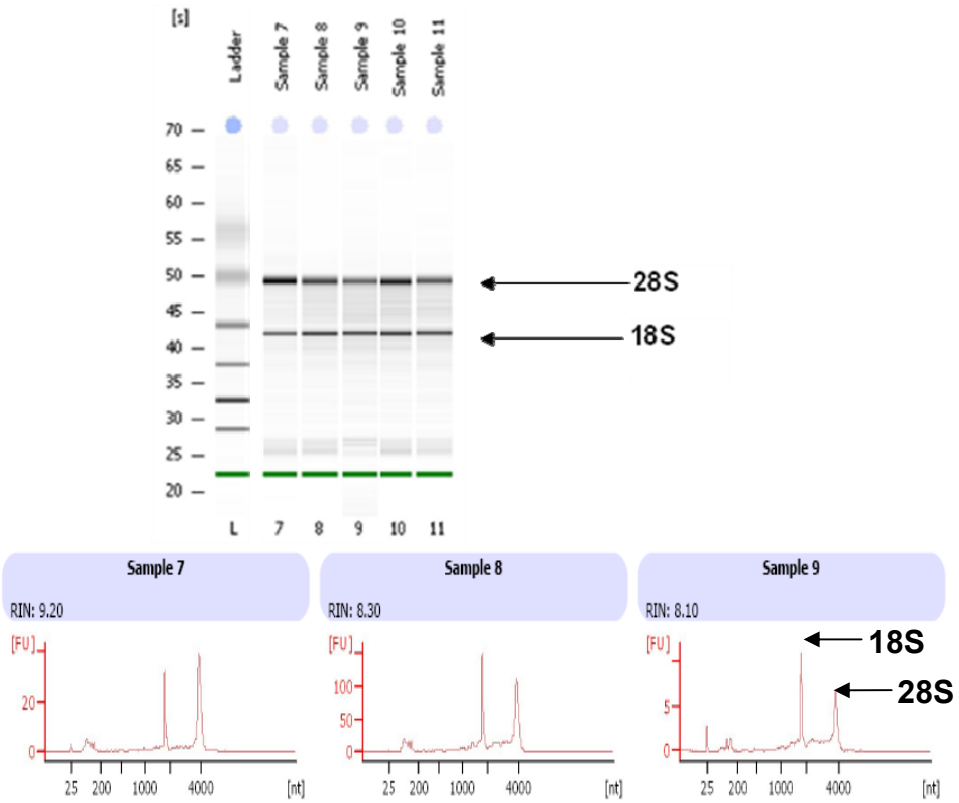

Figura 5 - Exemplos da avaliação da qualidade e integridade do RNA de alguns tumores corticotróficos através do *Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies,* Palo Alto, CA, USA). As setas indicam as subunidades 28S e 18S dos RNAs ribossomais. RIN, número de integridade do RNA

O produto da PCR contendo os fragmentos amplificados dos genes *T-PIT*, *PIT-1* e *GAPDH* foram fracionados em gel de agarose 2,0 % com brometo de etídeo e visualizados em luz UV (Figuras 6, 7 e 8 respectivamente).

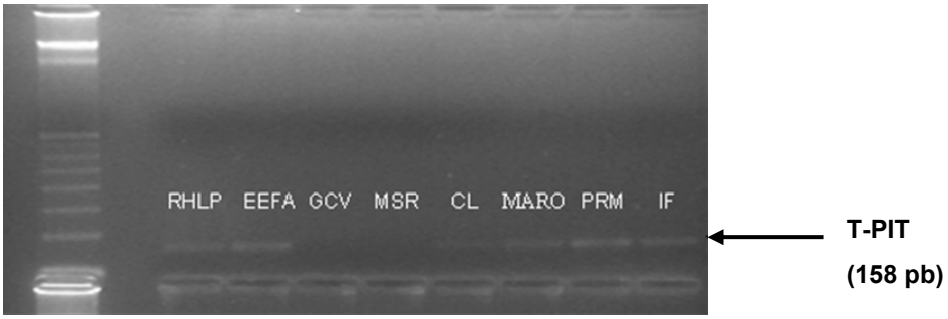

Figura 6 - Amplificação do gene *T-PIT* por RT-PCR semiquantitativa em amostras de tecidos tumorais corticotróficos, visualizados em gel de agarose 2,0 % corado com brometo de etídeo. Pacientes GCV e MSR não apresentaram amplificação do gene *T-PIT* e foram excluídos da análise molecular. pb, pares de bases

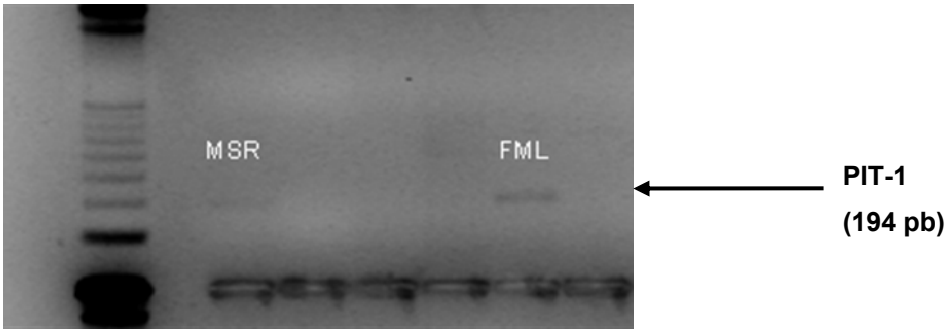

Figura 7 - Amplificação do gene *PIT-1* por RT-PCR semiquantitativa em amostras de tecidos tumorais corticotróficos, visualizados em gel de agarose 2,0 % corado com brometo de etídeo. Pacientes MSR e FML apresentaram amplificação do gene *PIT-1* e foram excluídos da análise molecular. pb, pares de bases

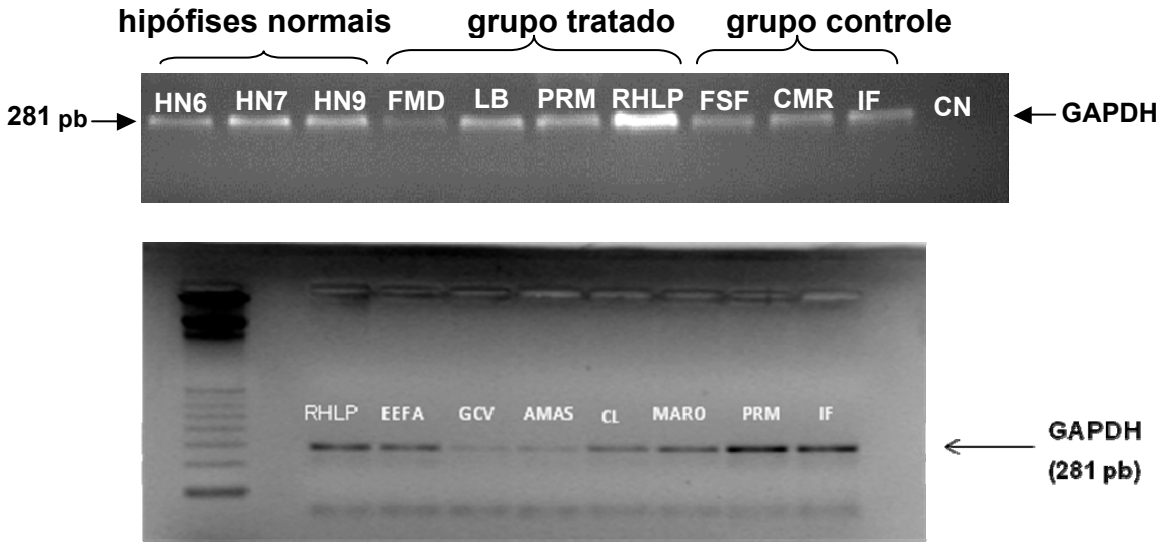

Figura 8 - Amplificação do gene *GAPDH* por RT-PCR semiquantitativa em amostras de tecidos normais e de tumores corticotróficos de pacientes tratados e do grupo controle, visualizados em gel de agarose 2,0 % corado com brometo de etídeo. pb, pares de bases

Foram excluídas desse trabalho duas amostras de tecido tumoral (grupo tratado) que apresentaram diagnóstico de hipófise normal no exame anatomopatológico, bem como aqueles tumores corticotróficos que apresentaram amplificação para o gene *PIT-1* (7 casos), apontando contaminação com tecido hipofisário normal. Também foram excluídos aqueles tumores corticotróficos que não apresentaram amplificação para o gene *T-PIT* (5 casos). Assim, apenas nove tumores do grupo tratado e 11 do grupo controle foram submetidos ao estudo da expressão dos genes *DRD2*, *SSTR2* e *SSTR5*, conforme demonstrado na Figura 9, que representa um fluxograma da inclusão dos pacientes com DC selecionados para o estudo molecular e avaliação imunohistoquímica.

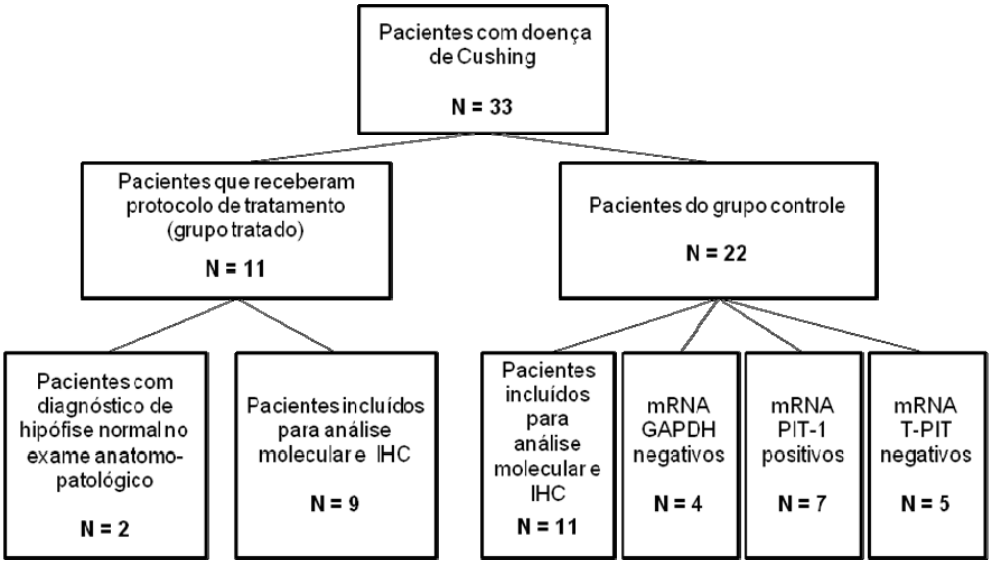

Figura 9 - Fluxograma de inclusão dos pacientes com doença de Cushing para o estudo molecular e avaliação pela imunohistoquímica. IHC, imunohistoquímica

A expressão do gene *SSTR5* não pôde ser analisada, pois grande parte do RNA disponível foi degradada durante o tratamento com a DNAse.

A especificidade da reação de qRT-PCR foi evidenciada pela curva de dissociação, que mostrou, em todas as amostras, amplificação para cada um dos genes em temperatura específica (Figura 10).

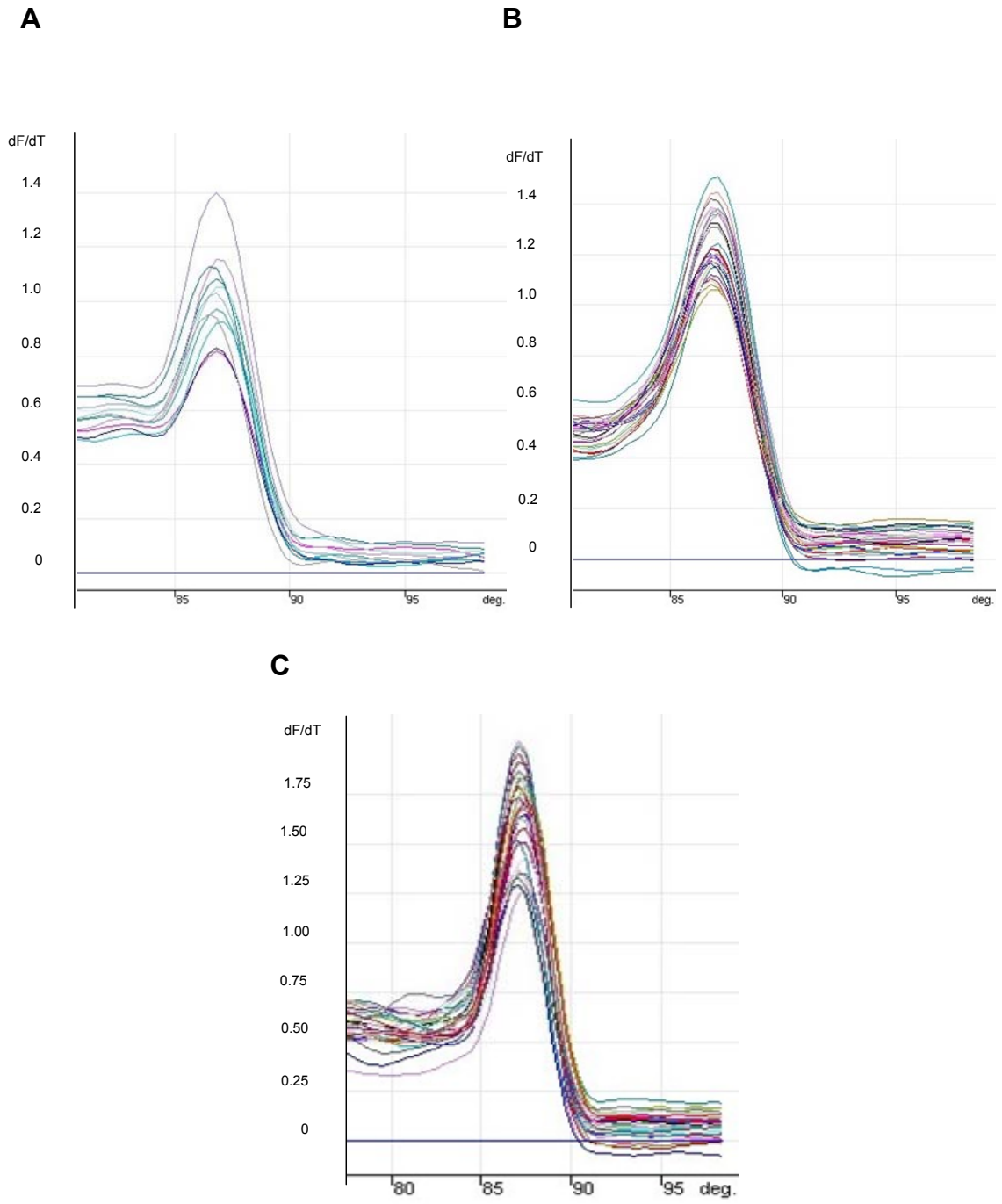

Figura 10 - Curvas de dissociação dos genes *SSTR2* (painel A), *DRD2* (painel B) e *GAPDH* (painel C)

A especificidade foi ainda avaliada pela inspeção do produto da qRT-PCR de algumas amostras, que foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,0% para avaliação do tamanho do fragmento amplificado. Como verificado na Figura 11, os fragmentos correspondem aos tamanhos esperados para cada um dos genes avaliados neste estudo, não sendo observada amplificação inespecífica.

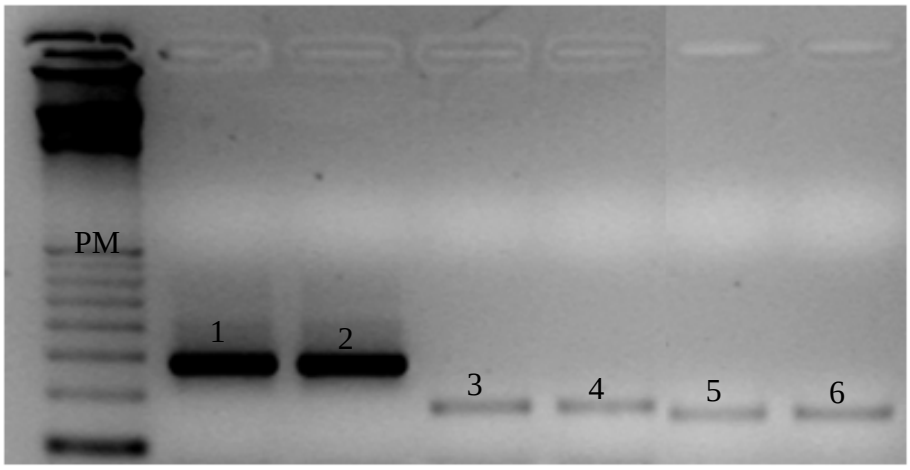

Figura 11 - Gel representativo da amplificação dos genes alvo *SSTR2* (3 e 4) = 170 pb, e *DRD2* (5 e 6) = 154 pb e do gene controle *GAPDH* (1 e 2) = 281 pb em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio para verificar a amplificação de produtos inespecíficos. PM, peso molecular, pb, pares de bases

As análises das eficiências de amplificação dos genes *DRD2 e SSTR2* não foram semelhantes à eficiência de amplificação do *GAPDH*, assim, o cálculo comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ não pôde ser utilizado (Livak e Schmittgen, 2001) (Figura 12) Dessa forma, optou-se pela utilização do modelo matemático descrito por Pfaffl (2001).

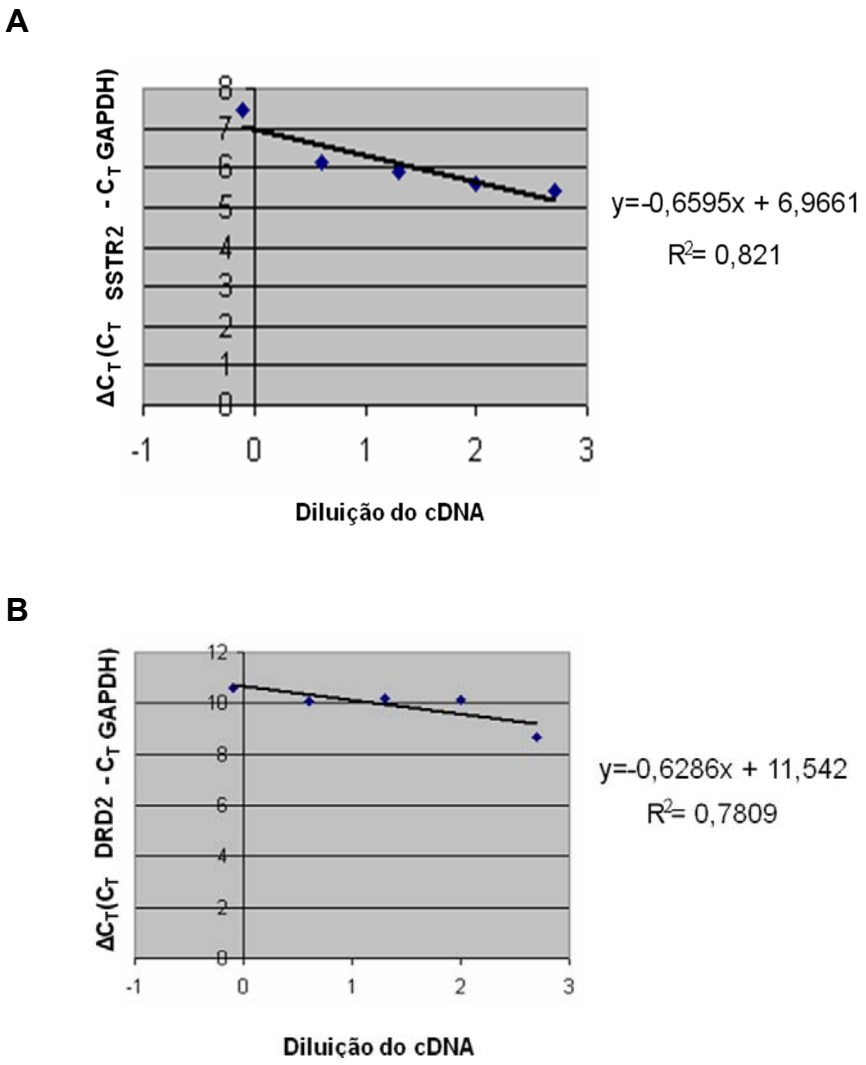

Figura 12 - Determinação da eficiência de amplificação (*slope*) dos genes *SSTR2* (painel A) e *DRD2* (painel B), em relação ao gene controle *GAPDH*

4.2.1 Expressão dos Genes *SSTR2*, *SSTR5* e *DRD2*

A média de expressão do gene *SSTR2* no grupo controle foi 1,253 ± 0,154. A média de expressão do gene *SSTR2* no grupo tratado foi 1,267 ± 0,134. A diferença entre as expressões nos dois grupos não foi estatisticamente significante (P = 0,909) (Figura 13).

A média de expressão do gene *DRD2* no grupo controle foi 0,776 ± 0,076. A média de expressão do gene *DRD2* no grupo tratado foi 1,170 ± 0,158. A diferença entre as expressões nos dois grupos foi estatisticamente significante (P = 0,036) (Figura 14).

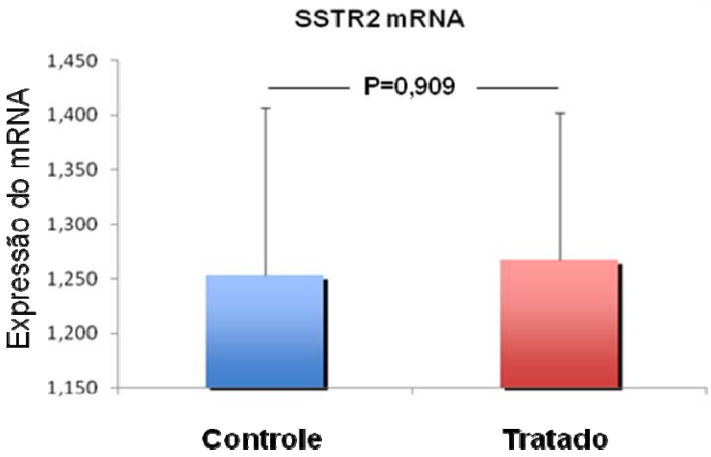

Figura 13 - Expressão do mRNA do gene *SSTR2* nas amostras dos tumores corticotróficos no grupo controle e no grupo tratado. A diferença entre as expressões nos dois grupos não foi estatisticamente significante (P = 0,909)

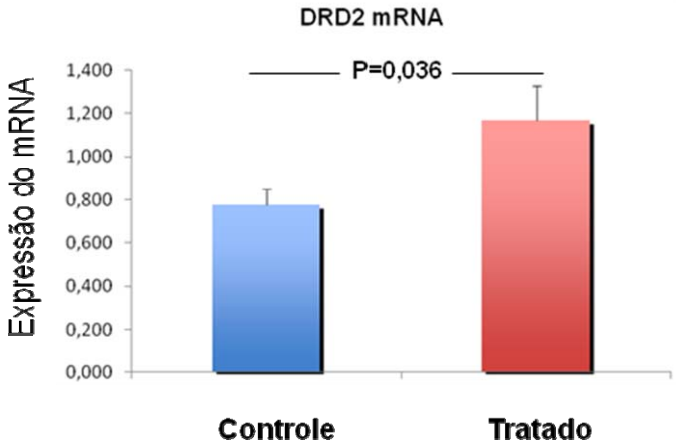

Figura 14 - Expressão do mRNA do gene *DRD2* nas amostras dos tumores corticotróficos no grupo controle e no grupo tratado. A diferença entre as expressões nos dois grupos foi estatisticamente significante (P = 0,036)

Não houve correlação entre a resposta ao octreotide isolado e a expressão do mRNA dos genes *SSTR2 e DRD2* (P = 0,554 e P = 0,406, respectivamente). Também não houve correlação entre a expressão do mRNA dos genes *SSTR2, DRD2* e a resposta à cabergolina isolada (P = 0,134 e P = 0,605, respectivamente).

Não houve correlação entre a resposta ao octreotide em associação à cabergolina e a expressão do mRNA dos genes *SSTR2 e DRD2* (P = 0,154 e P = 0,732, respectivamente).

Não houve correlação entre os valores de F urinário do grupo controle imediatamente antes da cirurgia e a expressão do mRNA dos genes dos receptores *DRD2* e *SSTR2* (P = 0,519 e P = 0,501).

4.3 Imunohistoquímica

A imunorreatividade para SSTR2 foi classificada como ausente em 7/9 pacientes tratados e 8/11 pacientes do grupo controle. Foi classificada como 1+ em 1/9 pacientes tratados e 2/11 pacientes do grupo controle. Apenas uma paciente do grupo controle apresentou imunorreatividade 2+. Uma paciente (AMP) do grupo tratado apresentou perda física do material (Tabelas 16 e 17). A Figura 15 ilustra a imunorreatividade para o SSTR2.

Não houve diferença estatisticamente significante entre a imunoexpressão do SSTR2 no grupo controle em relação ao grupo tratado (P = 0,416).

A expressão do mRNA do gene *SSTR2* correlacionou-se com a expressão da proteína SSTR2 (P = 0,021). A Figura 16 ilustra essa correlação.

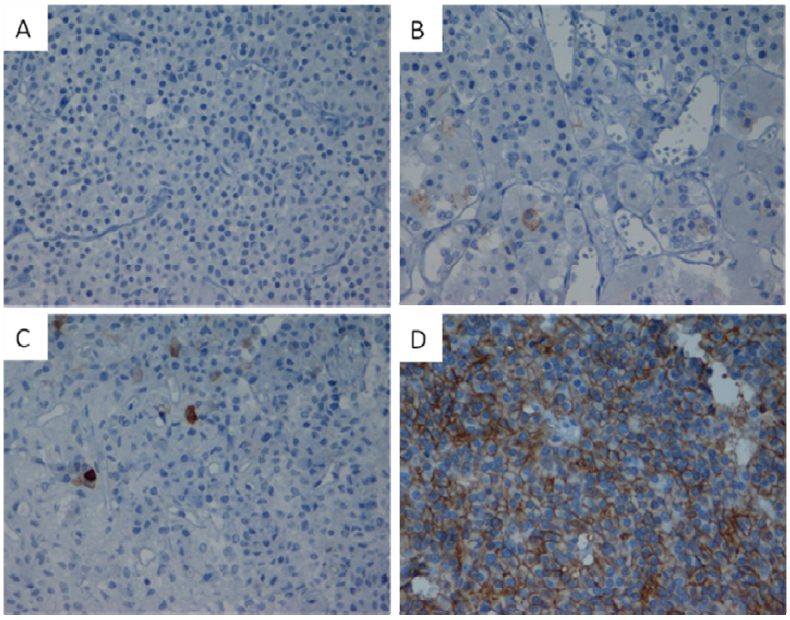

Figura 15 - Imunorreatividade para SSTR2 (400X). A, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente MARO classificada como 0. B, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente ACB classificada como 1+. C, imunorreatividade de uma hipófise normal classificada como 1+. D, imunorreatividade de um somatotrofinoma utilizado como controle classificada como 4+

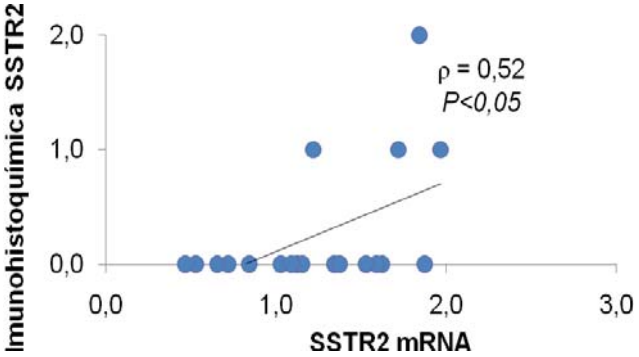

Figura 16 - Correlação entre a expressão do mRNA do gene *SSTR2* e a expressão da proteína SSTR2 pela técnica de imunohistoquímica (P = 0,021)

A imunorreatividade para DRD2 foi classificada como ausente em 4/9 pacientes tratados e 6/11 pacientes do grupo controle. Foi classificada como 1+ em 2/9 pacientes tratados e 3/11 pacientes do grupo controle. Duas pacientes (2/11) do grupo controle e duas pacientes tratadas (2/9) apresentaram imunorreatividade 4+. Uma paciente do grupo tratado (AMP) apresentou perda física do material. A expressão do mRNA do gene *DRD2* não se correlacionou com a expressão da proteína DRD2 (P = 0,455) (Tabelas 16 e 17).

Não houve diferença estatisticamente significante entre a imunoexpressão de DRD2 no grupo controle em relação ao grupo tratado (P = 0,785).

A Figura 17 ilustra a imunorreatividade para o receptor DRD2.

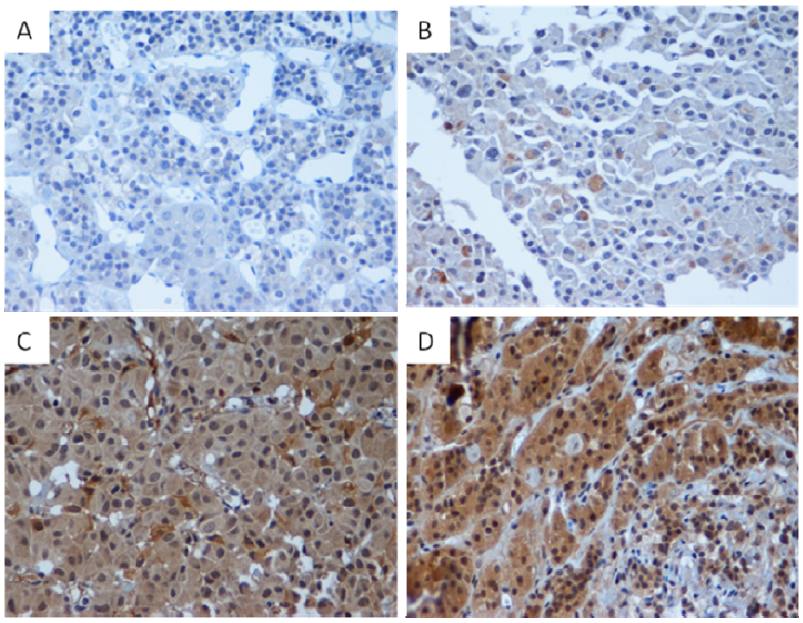

Figura 17 - Imunorreatividade para DRD2 (400X). A, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente IF classificada como 0. B, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente CMR classificada como 1+. C, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente MARO classificada como 4+. D, imunorreatividade de uma hipófise normal utilizada como controle classificada como 4+

A imunorreatividade para SSTR5 esteve presente em todos os pacientes do estudo exceto a paciente AMP que apresentou perda física de material. A imunorreatividade para SSTR5 foi classificada como 2+ em 1/9 paciente tratada e 1/11 paciente do grupo controle. Foi classificada como 4+ em 7/9 pacientes tratados e 10/11 pacientes do grupo controle (Tabelas 16 e 17).

Não houve diferença estatisticamente significante entre a imunoexpressão dessa proteína no grupo controle em relação ao grupo tratado (P = 0,816). A Figura 18 ilustra a imunorreatividade para o SSTR5.

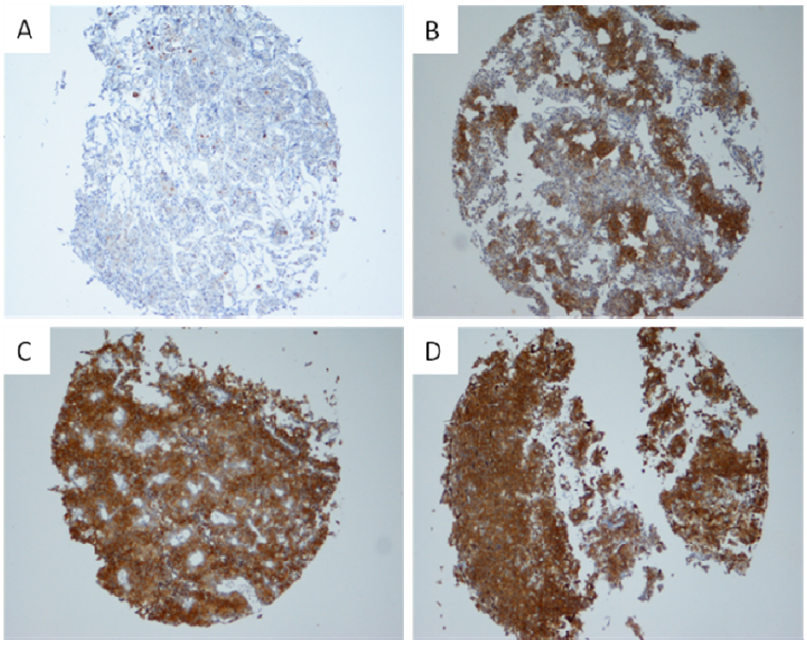

Figura 18 - Imunorreatividade para SSTR5 (100X). A, imunorreatividade de uma hipófise normal utilizada como controle classificada como 1+. B, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente EEFA classificada como 4+. C, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente MARO classificada como 4+. D, imunorreatividade do corticotrofinoma da paciente CLCN classificada como 4+

Tabela 16 - Expressão das proteínas DRD2, SSTR5 e SSTR2 pela técnica de imunohistoquímica em pacientes do grupo controle

N	PACIENTE	HISTOLOGIA	IHC DRD2	IHC SSTR5	IHC SSTR2
1	CLCN	ACTH positivo > 50%	0	4+	0
2	LMGA	ACTH positivo > 50%	0	4+	0
3	CMR	ACTH positivo > 50%	1+	4+	0
4	FSF	ACTH positivo > 50%	1+	4+	0
5	IF	ACTH positivo > 50%	0	4+	0
6	EEFA	ACTH positivo > 50%	1+	4+	0
7	MARO	ACTH positivo > 50%	4+	4+	0
8	ISF	ACTH positivo > 50%	0	4+	2+
9	APS	ACTH positivo > 50%	0	4+	0
10	AMAS	ACTH positivo > 50%	0	4+	1+
11	ACB	ACTH positivo > 50%	4+	2+	1+

IHC: imunohistoquímica

Tabela 17 - Expressão das proteínas DRD2, SSTR5 e SSTR2 pela técnica de imunohistoquímica em pacientes do grupo tratado

N	PACIENTE	HISTOLOGIA	IHC DRD2	IHC SSTR5	IHC SSTR2
1	VVC	Hipófise normal	NA	NA	NA
2	BOM	Hipófise normal	NA	NA	NA
3	RHLP	ACTH positivo > 50%	4+	4+	0
4	LB	ACTH positivo > 50%	1+	4+	0
5	PRM	ACTH positivo > 50%	0	4+	0
6	FMD	ACTH positivo > 50%	4+	4+	1+
7	MZCS	ACTH positivo > 50%	0	2+	0
8	JOS	ACTH positivo > 50%	0	4+	0
9	AMP	ACTH positivo > 50%	PF	PF	PF
10	VBD	ACTH positivo > 50%	0	4+	0
11	MA	ACTH positivo > 50%	1+	4+	0

IHC: imunohistoquímica; NA: não avaliado; PF: perda física

5 DISCUSSÃO

A DC apresenta elevadas morbidade e mortalidade e a cirurgia hipofisária está fundamentada como tratamento de escolha devido a altas taxas de remissão (65 – 90%). No entanto, os casos de doença persistente somados às recorrências tumorais formam um subgrupo de pacientes que necessita tratamento complementar. A reabordagem cirúrgica, a radioterapia hipofisária e a adrenalectomia bilateral são opções terapêuticas já bem estabelecidas, mas apresentam desvantagens que incluem o desenvolvimento de hipopituitarismo e necessidade de terapia de reposição permanente.

Até o momento, nenhuma droga tem se mostrado eficaz no tratamento do tumor corticotrófico e as tentativas de manipular os neuro-moduladores hipotalâmicos-hipofisário têm se revelado ineficientes. Os resultados com SOM230 (pasireotide) parecem promissores, mas faltam dados que avaliem respostas em longo prazo a esse análogo e estudos iniciais apontam que o efeito adverso de hiperglicemia é um fator limitante ao seu uso. Os estudos que analisaram o uso prolongado de cabergolina na DC relatam a presença de escapes durante o tratamento, o que dificulta o controle dessa doença em longo prazo. Os esquemas terapêuticos mais eficazes e seguros ainda são os direcionados ao córtex supra-renal (inibidores da esteroidogênese) principalmente o cetoconazol, que não apresentam efeito sobre o tumor hipofisário.

A demonstração da coexpressão de receptores de SST (SSTR5) e de dopamina (DRD2) na grande maioria (60% dos casos) dos corticotrofinomas (De Bruin et al., 2009) associada aos relatos de que a ativação simultânea desses receptores leva à formação de complexos com maior atividade funcional ressaltam que a associação de drogas poderia ser uma boa opção para o tratamento medicamentoso da DC. Não existem estudos que comprovem que exista a formação desses hetero-oligômeros (SSTR5-DRD2 e SSTR2-DRD2*) in vivo*, no entanto diversos trabalhos demonstram um maior controle de secreção hormonal em somatotrofinomas (Cozzi et al., 2004) e de crescimento tumoral em adenomas clinicamente não-funcionantes quando octreotide e cabergolina são utilizados em associação (Andersen et al., 2001).

Não há na literatura qualquer trabalho que tenha avaliado o efeito da associação de um análogo da somatostatina e um agonista dopaminérgico no tratamento da DC. O presente estudo avaliou não só o efeito do OCT e da CAB administrados isoladamente e em associação nas concentrações urinárias de F e plasmáticas de ACTH em pacientes com DC, como também, correlacionou a resposta laboratorial a esses agonistas com a expressão tumoral dos receptores de SST dos subtipos 2 (*SSTR2*) e 5 (*SSTR5*) e do receptor de dopamina do subtipo D2 (*DRD2*) do ponto de vista molecular e da proteína em si. Além disso, esse estudo também avaliou o efeito do uso prévio dessas drogas na expressão dos receptores analisados utilizando os casos de DC sem tratamento clínico (grupo controle) que se mantinham em hipercortisolismo sem sofrer qualquer influência de drogas ou do controle da hipercortisolemia.

A análise dos valores de F urinário após o protocolo de tratamento proposto revelou diferença estatisticamente significante na fase de associação das medicações OCT e CAB em relação aos valores basais e após o uso isolado de CAB, não sendo detectadas diferenças com o uso isolado de OCT.

A análise dos valores de ACTH plasmático não revelou diferença estatisticamente significante durante o protocolo de tratamento proposto e também não se correlacionaram com os valores de F urinário.

Os resultados confirmam dados descritos na literatura. O OCT é um análogo da SST com ação predominante em SSTR2 (Tabela 5) e apenas modesta afinidade ao SSTR5, apresentando resultados limitados na DC, onde existe o predomínio dos receptores SSTR5, que são considerados resistentes ao hipercortisolismo por não sofrerem *down-regulation* nessa condição clínica (Lamberts et al., 1989; Ambrosi et al., 1990; Invitti et al., 1990; Stalla et al., 1994; Van der Hoek et al., 2004; Hofland et al., 2005; Batista et al., 2006). O OCT é o único análogo de SST com alguma ação em SSTR5 que está comercialmente disponível e por essa razão foi escolhido para esse protocolo.

A CAB é um agonista dopaminérgico com elevada especificidade e afinidade aos receptores DRD2, além de maior duração de sua ação (Colao et al., 2000; Colao et al., 2002). O uso da CAB já está bem mais estabelecido na DC (Pivonello et al., 2004; Pivonello et al., 2009). Dados da literatura apontam que 40% dos pacientes normalizam a secreção de F urinário após três meses de uso dessa droga e os mesmos resultados são obtidos após dois anos de tratamento (Pivonello et al., 2004; Pivonello et al., 2009).

Confirmando esses dados, o presente trabalho também demonstrou que a CAB é eficaz em reduzir de maneira significante o F urinário dos portadores de DC e que seu efeito pode ser observado em apenas um mês de utilização.

Observou-se redução significativa na secreção de F urinário com a associação das drogas OCT e CAB, porém essa redução não foi maior que aquela observada com a CAB isolada.

Essas drogas atuam em receptores acoplados à proteína G que apresentam 30% de identidade e que podem interagir entre si formando hetero-oligômeros (Rochevile et al., 2000; Devi, 2001).

Em 2000, Rochevile et al. descreveram a formação de hetero-oligômeros entre receptores de dopamina (DRD2 longo) e de SST (SSTR5) induzida apenas pela presença do ligante desses receptores. Em 2007, Baragli et al. demonstraram a hetero-oligomerização entre os receptores DRD2 e SSTR2 em cultura de células neuronais. Estas associações são capazes de formar um complexo efetor relacionado à proteína G farmacologicamente distinto, caracterizado por apresentar uma maior capacidade funcional.

Baragli et al. (2007) ainda confirmaram que a formação dos hetero-oligômeros entre SSTR2 e DRD2 na presença de SST14 e dopamina levou a máxima inibição da secreção de AMPc e que a SST14 provocou uma maior afinidade do DRD2 à dopamina. Esse efeito pareceu estar relacionado à presença de homodímeros pré-formados de SSTR2 que se dissociam e internalizam na presença do ligante causando uma maior exposição de sítios do DRD2.

Esses dados publicados sugerem a possibilidade de que a associação das drogas OCT e CAB poderia apresentar um melhor efeito em reduzir as concentrações de F urinário, o que não foi observado no presente estudo.

Como mencionado, o OCT não apresenta uma ação significativa em SSTR5, receptor de somatostatina mais expresso na DC e em nossos pacientes, conforme demonstrado na imunohistoquímica. Se o efeito de hetero-oligomerização realmente ocorre *in vivo*, possivelmente a associação de pasireotide ou qualquer outro análogo de SST com maior afinidade ao SSTR5 ou ainda, a utilização de OCT em doses mais elevadas e/ou por um período mais prolongado poderia ter permitido que esse efeito fosse observado.

O fato de a paciente MZCS apresentar progressiva melhora do quadro clínico e laboratorial ao longo de seis meses de associação das drogas confirma a possibilidade de que a extensão desse protocolo estivesse associada a um resultado melhor do que o obtido em apenas um mês de associação. Lamentavelmente, por motivos éticos, não foi possível estender o protocolo de estudo desses pacientes já que o tratamento definitivo (cirurgia) deveria ser realizado.

A resposta observada nessa paciente com a associação das drogas por um período prolongado poderia ser atribuída à formação de hetero-oligômeros, porém não é possível descartar que apenas o efeito aditivo das duas drogas ou mesmo uma ação mais prolongada de CAB é o que realmente tenha ocorrido.

A avaliação individual de cada paciente também não permite que se tirem conclusões definitivas, já que existiram diferentes tipos de evolução durante o uso isolado de CAB e em associação ao OCT. Nos trabalhos anteriores que avaliaram o uso de CAB na DC também foram descritos pacientes com resposta inicial e escape ao longo do tratamento, assim como pacientes sem resposta inicial e com resposta ao longo da terapia (Pivonello et al., 2004; Pivonello et al., 2009).

A retirada do OCT daqueles pacientes que estivessem respondendo efetivamente à terapia combinada com a manutenção da queda do F urinário por esses pacientes também seria uma das formas de se confirmar que ação da CAB era o que realmente estava sendo observado.

Observou-se nítida dissociação entre o conteúdo de mRNA do gene *DRD2* por qRT-PCR e a expressão de sua proteína pela imunohistoquímica. A dissociação entre a expressão do transcrito e a expressão protéica sugere a participação não só de mecanismos regulatórios transcricionais, mas também de mecanismos pós-transcricionais na regulação da expressão gênica. O uso de padrões de expressão de RNA mensageiro é insuficiente para o entendimento da expressão de produtos protéicos. Mecanismos pós-transcricionais adicionais, incluindo tradução protéica, modificações póstraducionais e degradação, podem influenciar a concentração de uma proteína presente em uma dada célula ou tecido (Greenbaum et. al, 2003).

A expressão do gene *DRD2* foi estatisticamente maior nos pacientes tratados quando comparada ao grupo controle (não tratados).

Esse aumento relativo da expressão de *DRD2* relacionado à exposição à dopamina ou seu agonista já havia sido documentado em cultura de células hipofisárias normais expostas à dopamina e em lactotrofos tumorais de pacientes que haviam recebido bromocriptina-LAR (Johnston et.al., 1993; Stefaneanu et. al., 2001). O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que em corticotrofinomas o uso do agonista dopaminérgico CAB também está associado a um *upregulation* dos receptores *DRD2*.

Outro achado interessante foi que apesar do DRD2 ser um receptor de membrana, a imunorreatividade foi predominantemente citoplasmática. Esse achado está de acordo com os dados da literatura que, sem uma explicação definida, também descreve que em outros subtipos de adenomas hipofisários a imunorreatividade está presente de maneira difusa no citoplasma e no núcleo das células tumorais. Especula-se que a imunorreatividade nuclear e citoplasmática seja genuína, ou ainda, que este peptídeo apresente homologia a uma proteína ainda desconhecida (Stefaneanu et. al., 2001).

Algumas justificativas podem ser aventadas para explicar a falta de correlação entre a expressão do mRNA dos receptores *DRD2* e a resposta à CAB isolada ou em associação ao OCT. O atual estudo analisou a expressão das duas isoformas de receptores *DRD2*, já que o iniciador utilizado na qRT-PCR reconhecia uma sequência de nucleotídeos presente nas duas isoformas, assim como o anticorpo utilizado na imunohistoquímica. Dados da literatura sugerem que 78% da expressão de *DRD2* na DC seja representada pela isoforma longa (de Bruin et al., 2009). A cabergolina

apresenta ações diferentes sobre as duas isoformas de *DRD2*. Além disso, o número pequeno de pacientes pode ter dificultado a análise estatística. Em prolactinomas resistentes aos agonistas dopaminérgicos foi descrito a perda da expressão da proteína G inibitória sem a alteração da expressão quantitativa dos receptores dopaminérgicos (Barlier et al., 1997).

O fato do gene que codifica o receptor SSTR5 apresentar apenas um exon tornou necessário o tratamento das amostras tumorais com DNAse previamente à síntese de c-DNA para garantir que não houvesse amplificação de DNA genômico. Lamentavelmente, a pequena quantidade de material normalmente obtido nos corticotrofinomas (maioria microadenomas) sofreu intensa degradação com esse tratamento, impossibilitando a análise da expressão do mRNA do gene *SSTR5* pela técnica de qRT-PCR. Dessa forma, apenas os dados da imunohistoquímica estão disponíveis. A imunorreatividade para SSTR5 esteve presente em todos os pacientes do estudo, tratados ou não tratados, exceto a paciente AMP que apresentou perda física de material. Sendo assim, o tratamento prévio dos pacientes não alterou a expressão de *SSTR5,* confirmando os dados da literatura de que o hipercortisolismo resultaria em *down-regulation* dos receptores de SST exceto o SSTR5. Em murinos, esse fenômeno pode ser explicado pela presença de elementos responsivos ao GC (GRE) no gene *SSTR2* enquanto que apenas *Half-sites* GRE são encontrados no gene *SSTR5* (Kraus et al., 1998; Gordon et al., 1999). Outra justificativa seria que o promotor do gene *SSRT2* está sob controle direto dos GC e o promotor do gene *SSTR5* não está (Petersenn et al., 1999; Petersenn et al., 2002).

Em humanos, ainda não foi encontrada uma explicação plausível para esse fenômeno.

A expressão do mRNA do gene que codifica o receptor *SSTR2* avaliada por qRT-PCR não foi significativamente diferente entre os pacientes que receberam o protocolo de tratamento e os pacientes do grupo controle. Também, não houve diferença estatisticamente significante da imunoexpressão do SSTR2 entre os dois grupos avaliados. Esses dados demonstram que a expressão do *SSTR2* não foi modulada pelo uso prévio das drogas.

Houve correlação entre o conteúdo de mRNA do *SSTR2* e o conteúdo da sua proteína, sugerindo ser menos importante a participação de mecanismos pós-transcricionais na regulação da sua expressão. Sabe-se que o hipercortisolismo é um dos mecanismos que regulam a expressão do gene *SSTR2.* Ainda é duvidoso se a redução do hipercortisolismo seria capaz de restituir a expressão do *SSTR2* ou se apenas o restabelecimento do normocortisolismo teria essa capacidade. Em uma paciente tratada (RHLP) o normocortisolismo foi alcançado e essa paciente apresentou expressão do mRNA de *SSTR2* bastante inferior ao grupo controle e a outros pacientes tratados. Outros pacientes que apresentaram importante redução do hipercortisolismo (RHLP, FMD, MZCS e AMP) também não apresentaram expressão de mRNA de *SSTR2* estatisticamente diferente do grupo controle e dos outros pacientes tratados que não apresentaram importante queda dos valores de F urinário. A falta de correlação entre os valores de F urinário dos pacientes do grupo controle e a expressão de

mRNA de *SSTR2* sugere que, provavelmente, essa expressão seja individual (fenotípica) de cada corticotrofinoma e não controlada somente pelo grau de hipercortisolismo.

A falta de correlação entre a expressão do mRNA do gene que codifica o receptor *SSTR2* e a resposta ao OCT isolado ou em associação à CAB também pode ser justificada. A resposta a um determinado análogo da SST está relacionada não apenas à presença de um número suficiente de receptores de SST, mas também aos subtipos de receptores coexpressos (Resmini et al., 2007). Recentemente, houve a descrição de receptores SSTR5 truncados em corticotrofinomas, justificando a dissociação entre a expressão de determinado subtipo de receptor e a resposta clínica ao agonista a esse receptor (Durán- Prado et al., 2009; Durán- Prado et al., 2010).

Na acromegalia está bastante comprovado que a coexpressão de determinado subtipo de receptor pode influenciar a atividade do SSTR2, por exemplo (Resmini et al., 2007).

Trabalhos anteriores demonstraram resultados promissores da associação de um agonista dopaminérgico e um análogo de SST no tratamento de outros subtipos de adenomas hipofisários (Andersen et al., 2001; Cozzi et al., 2004; Colao et al., 2007).

Esses achados estão impulsionando o desenvolvimento de moléculas quiméricas que associam partes estruturais da dopamina (ou agonista dopaminérgico) e da SST (ou análogos da SST). Alguns estudos, curiosamente, caracterizaram que essas dopastatinas apresentam

um efeito maior no controle hormonal de certos tumores hipofisários quando se compara à associação de ambas as drogas, pois podem ativar ambos os receptores de uma maneira espacial (Saveanu et al., 2002; Ferone et al., 2005).

Os achados do presente estudo demonstram que no tempo estudado e nas doses utilizadas, a associação do OCT com a CAB não oferece benefícios adicionais ao uso isolado da CAB no controle da DC.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos reforçaram o papel da cabergolina no tratamento da doença de Cushing e permitiu concluir que seu efeito no hipercortisolismo pode ser precoce.

A associação entre octreotide e cabergolina mostrou-se uma alternativa efetiva em reduzir as concentrações de cortisol urinário em um subgrupo de pacientes portadores de doença de Cushing, porém nessa dose e nesse período de tempo não foi mais efetiva que a cabergolina isolada.

As respostas a essas medicações isoladas ou em associação não se relacionaram à quantidade de receptores DRD2, SSTR2 e SSTR5 expressos nos tumores.

O uso de cabergolina e octreotide associou-se ao aumento da expressão do RNA mensageiro do gene que codifica o receptor DRD2.

A expressão do RNA mensageiro dos genes que codificam os receptores SSTR2 e SSTR5 não sofreu alterações com a utilização de octreotide e cabergolina.

A expressão do RNA mensageiro do gene *DRD2* não se correlacionou com a expressão da proteína DRD2, enquanto a expressão do RNA mensageiro do gene *SSTR2* apresentou correlação com a expressão de sua proteína.

7 ANEXOS

ANEXO A

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

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

1. NOME DO PACIENTE .:.....
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 Nº : ..... SEXO : M F
DATA NASCIMENTO: / /
ENDEREÇO.....Nº..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE : .....
CEP: . ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1.TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Efeito da administração de Octreotide, Cabergolina e a associação de ambos nos níveis de ACTH e cortisol em pacientes com doença de Cushing: correlação da resposta clínica com a expressão tumoral dos receptores de Dopamina (D2) e de Somatostatina (SST2 e SST5)

2.PESQUISADOR: Daniella de Jesus Patrick Carminatti Romanholi

CARGO/FUNÇÃO: Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 101403-SP

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Neuroendocrinologia, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

III –REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNADO:

SOMENTE PARA OS PACIENTES COM A SÍNDROME DE CUSHING:

Para tratar a doença de Cushing é necessário fazer uma cirurgia. Apesar da cirurgia ser considerado o melhor tratamento para tentar curar a doença de Cushing (pela possibilidade de retirada do tumor da hipófise), dados mostram que ainda assim, são bastante elevadas as chances de não cura após a cirurgia. Dessa forma, um outro tratamento além da cirurgia é obrigatório.

Quando a 1ª cirurgia não funcionou, uma 2ª cirurgia tem uma chance de curar o tumor de apenas 43% em média, mas, em metade dos casos, pode causar a falta de outros hormônios produzidos pela hipófise.

Outros tratamentos como a radioterapia de hipófise e a retirada de uma ou duas adrenais (glândula que está em cima dos rins) tem alguns riscos e não garante a cura desse tumor, pelo contrário, inclusive, pode causar o crescimento desse tumor quando as duas adrenais são retiradas (o que acontece em aproximadamente 20% dos pacientes).

Como você pôde ler, esses tratamentos que são aplicados atualmente não garantem a cura do tumor e, ainda, podem trazer riscos ao paciente.

Sendo assim, o uso de medicamentos poderia auxiliar no tratamento dos pacientes com doença de Cushing que não curaram com a cirurgia, mas, até o momento, nenhum medicamento se mostrou totalmente eficaz.

Esse estudo pretende encontrar uma nova alternativa de medicamentos para ser aplicada a esses pacientes e a sua ajuda é de extrema importância.

Para participar desse estudo você irá usar 2 medicamentos durante três meses antes de realizar a cirurgia.

Você iniciará com as injeções de Octreotide (Sandostatin®) que vão ser aplicadas durante o 1º mês. Após esse mês você iniciará o uso da Cabergolina (Dostinex®) tomada por boca durante o 2º mês. Então, no 3º mês você tomará estes 2 medicamentos, a Cabergolina e as injeções de Octreotide também.

Após lavar bem as mãos com água e sabão, você mesmo poderá aplicar a injeção de Octreotide (Sandostatin®) logo abaixo da pele (subcutâneo).

Para isso, você deve retirar da geladeira a ampola a ser aplicada 5 a 10 minutos antes da aplicação. Você irá quebrar essa ampola com as próprias mãos próximo da marca que já existe na ampola. Após quebrar a ampola, você irá puxar todo o líquido que estiver dentro dela para dentro da seringa (de 3ml) que já deve estar montada com a agulha (3,5 X 4,5mm).

Antes de aplicar a injeção, você irá limpar a região da aplicação com um algodão umedecido com álcool. As regiões de aplicação podem ser: a barriga (ao redor do umbigo), as coxas (parte de fora), os braços (parte de trás) ou as nádegas. Para esta aplicação você deve formar uma prega com os dedos polegar e indicador (como se fosse beliscar algo) e com a outra mão você irá aplicar a injeção sem nenhuma inclinação da seringa (semelhante à injeção de insulina em pacientes diabéticos).

Após ter introduzido a agulha no corpo não é necessário puxar antes de injetar o líquido de dentro da seringa. Após todo o líquido ser injetado, você irá retirar a seringa com a agulha de uma só vez e com o próprio dedo realizar uma pressão (sem esfregar) no local da aplicação. Essa injeção deverá ser aplicada a cada 8 horas durante 30 dias. Durante os últimos 3 dias (28°, 29° e 30° dias) de uso da injeção, você irá colher exames de sangue pela manhã em jejum e de urina de 24 horas (semelhantes àqueles colhidos durante a investigação das suas queixas).

Após 30 dias você irá suspender o uso das injeções e iniciará o uso da medicação Cabergolina (Dostinex®), 1 comprimido pela boca 3x/semana (2ª, 4ª e 6ª ou 3ª, 5ª e sábado), à noite com alguma refeição (lanche). Essa medicação deverá ser tomada durante 30 dias isoladamente (sem Octreotide) e nos últimos 3 dias de seu uso (28°, 29° e 30° dias), você deverá colher exames de sangue pela manhã em jejum e de urina de 24 horas (semelhantes àqueles colhidos durante a investigação das suas queixas).

Então, após esses 30 dias de uso da medicação isolada, você irá voltar a usar a injeção de Octreotide como foi aplicada anteriormente, só que agora associada à medicação Cabergolina que você já vinha utilizando pela boca. Você deverá usar essas 2 medicações (Octreotide e Cabergolina) durante 30 dias e durante os últimos 3 dias de uso (28°, 29° e 30° dias), você deverá colher exames de sangue pela manhã em jejum e de urina de 24 horas (semelhantes àqueles colhidos durante a investigação das suas queixas).

Após aproximadamente 3 meses desse tratamento você irá realizar a cirurgia para a retirada do tumor da hipófise. Na maioria das vezes, a cirurgia é feita pelo nariz para poder chegar até o tumor que está causando a doença. Esse tumor será retirado e mandado para a avaliação (laudo). Eu também participo dessa cirurgia (expectador) e pego um pequeno pedaço do tumor para estudo no laboratório, sem prejudicar o maior pedaço que vai para laudo.

Após a cirurgia, o paciente continuará o seu tratamento normal na Unidade da Endocrinologia que estava acompanhando, seguindo a rotina normal do atendimento.

As 2 medicações que serão utilizadas nesse protocolo já são utilizadas em outras doenças e a segurança delas já está estabelecida porém, assim como qualquer outra medicação, alguns efeitos colaterais podem aparecer com o uso.

Em relação à Cabergolina (Dostinex®) podem aparecer efeitos como dor na barriga (5%), náuseas (27%), dores de cabeça (26%) e tonturas (15%) principalmente ao se levantar rapidamente. Raramente (menos de 1%), pode ocorrer perda de apetite, inchaço nas mãos, perda ou ganho de peso e palpitações.

Em relação ao Octreotide (Sandostatin®) podem aparecer efeitos como reações no local da aplicação, mas geralmente são leves e de curta duração. As reações incluem dor localizada e, raramente, inchaço e vermelhidão.Efeitos colaterais gastrintestinais incluem perda de apetite, náuseas, vômitos, dor abdominal e efeito laxante. Perda de gordura nas fezes e formação de pedras na vesícula pode aparecer quando usado por vários meses. Raramente, também com o uso por tempo prolongado, essa medicação pode afetar a regulação da glicose (aumento ou diminuição da glicemia).

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
O senhor(a) terá acesso a todas as informações através do contato com o pesquisador principal (Daniella Romanholi) no celular 83532666 ou no ambulatório de Endocrinologia (telefone 30696383).
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
O senhor(a) tem total liberdade para se retirar do estudo se sentir necessidade para tal.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
O senhor(a) terá acesso às informações referentes aos atos médicos que lhe são de interesse, assim como também a equipe médica que estiver envolvida no estudo.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
O senhor(a) terá atendimento pleno através do Hospital das Clínicas, que apresenta estrutura necessária para tal. Caso haja danos à saúde, a Disciplina de Neuroendocrinologia disponibilizará assistência junto ao senhor(a).
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.
O senhor(a) será indenizado por eventuais danos decorrentes da pesquisa, conforme as normas estabelecidas por esta Instituição.

Se você decidir participar deste estudo, nós garantimos que você terá acesso, a qualquer tempo, à todas as informações sobre exames, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer qualquer dúvida que você tenha a respeito deste estudo.

A participação neste estudo é de decisão sua. Você não é obrigado de forma alguma a participar deste estudo e poderá retirar-se desta pesquisa em qualquer momento sem que isto cause nenhuma dificuldade ou prejuízo no seu tratamento médico neste hospital.

Todos os aspectos do estudo, incluindo os resultados, serão estritamente confidenciais e somente os investigatores envolvidos no estudo terão acesso às informações dos participantes. O estudo poderá ser publicado em uma revista médica, mas os participantes individuais não serão identificados neste relatório.

Todos os participantes terão pleno acesso à assistência médica no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP bem como indenização viável por qualquer dano causado à saúde decorrente desta pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dra. Daniella de Jesus Patrick Carminatti Romanholi
Rua Vitor Costa nº 822 apto 191 Bosque da Saúde
São Paulo – SP CEP: 04150-060
Tel: 011- 50580211
Cel: 011- 83532666

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Quando você tiver lido este folheto informativo, a Dra Daniella de Jesus Patrick Carminatti Romanholi estará à disposição para responder suas perguntas e discutir qualquer dúvida que você tenha sobre o estudo. Por favor fique à vontade para contactar a Dra Daniella no telefone 83532666.

VII. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIMENTO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador, e ter entendimento o que me foi explicado consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo**,**

assinatura do sujeito ou responsável legal	**assinatura do pesquisador** **(carimbo ou nome Legível)**

ANEXO B

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

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25.05.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **113/06**, intitulado: **"Efeito da administração de octreotide,cabergolina e a associação de ambos nos níveis de ACTH e cortisol em pacientes com doenças de cushing:correlação da resposta clínica com a expressão tumoral dos receptores de Dopamina (D2) e de somatostatina (SST2 e SST5)."** apresentado pelo Departamento de **Clínica Médica**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Dr. Luiz Roberto Salgado**
Pesquisador (a) Executante: **Dra. Daniella de Jesus Patrick Carminatti Romanholi**

CAPPesq, 25 de Maio de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 – São Paulo – SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 – e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
fe

ANEXO C

MEDICINA
USP

Universidade de São Paulo
FACULDADE DE MEDICINA
Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular
LIM-25

Ao Ilmo.
Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci

Venho por meio desta, solicitar permissão para obtenção de fragmentos de tecidos humanos provenientes de autopsia para uso comparativo no Laboratório de Investigação Médica (LIM-25). Necessito pequena quantidade de material já que vamos analisar o RNAm desses tecidos, provenientes de 4 (quatro) indivíduos. O material será acondicionado em pequenos tubos criogênicos (1 cm de diâmetro) e imediatamente colocados em nitrogênio líquido. Será feita a extração do RNA e verificação de sua integridade.

Pela sua fragilidade e facilidade com que o RNAm dos tecidos se degradam, especialmente em tecidos provenientes de cadáveres, é possível que alguma amostra tenha que ser reposta.

Tecido necessário: **Hipófise**

Desde já agradeço.

Recebido 02/02/2006

São Paulo, 30 de janeiro de 2006.

Prof. Dr. Daniel Giannella-Neto
Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM-25)
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

8 REFERÊNCIAS

Aghi MK. Management of recurrent and refractory Cushing disease. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(10):560-8.

Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR, Gronemeyer H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6(10):793-810.

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.

Ambrosi B, Dall'Asta C, Cannavo S, Libe R, Vigo T, Epaminonda P, et al. Effects of chronic administration of PPAR-gamma ligand rosiglitazone in Cushing's disease. *Eur J Endocrinol.* 2004;151:173-8.

Andersen M, Bjerre P, Schroder HD, Edal A, Hoilund-Carlsen PF, Pedersen PH & Hagen C. In vivo secretory potential and the effect of combination therapy with octreotide and cabergoline in patients with clinically non-functioning pituitary adenomas. *Clinical Endocrinology.* 2001; 54:23–30.

Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:836-49.

Assié G, Bahurel H, Bertherat J, Kujas M, Legmann P, Bertagna X. The Nelson's syndrome revisited. *Pituitary*. 2004;7(4):209-15.

Assié G, Bahurel H, Coste J, Silvera S, Kujas M, Dugué MA, Karray F, Dousset B, Bertherat J, Legmann P, Bertagna X. Corticotroph tumor progression after adrenalectomy in Cushing's Disease: A reappraisal of Nelson's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(1):172-9.

Atkinson AB, Kennedy A, Wiggam MI, McCance DR, Sheridan B. Long-term remission rates after pituitary surgery for Cushing's disease: the need for long-term surveillance. *Clin Endocrinol*. 2005;63(5):549-59.

Ayala AR, Basaria S, Udelsman R, Westra WH, Wand GS. Corticotropin-independent Cushing's syndrome caused by an ectopic adrenal adenoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:2903-6.

Baragli A, Alturaihi H, Watt HL, Abdallah A, Kumar U. Heterooligomerization of human dopamine receptor 2 and somatostatin receptor 2 Co-immunoprecipitation and fluorescence resonance energy transfer analysis. *Cell Signal*. 2007;19(11):2304-16.

Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics.* 2005;21(3):389-95.

Barczyński M, Konturek A, Gołkowski F, Cichoń S, Huszno B, Peitgen K, Walz MK. Posterior retroperitoneoscopic adrenalectomy: a comparison between the initial experience in the invention phase and introductory phase of the new surgical technique. *World J Surg*. 2007;31(1):65-71.

Barlier A, Pellegrini-Bouiller I, Caccavelli L, Gunz G, Morange-Ramos I, Jaquet P, et al. Abnormal transduction mechanisms in pituitary adenomas. *Horm Res*. 1997;47:227–34.

Barnett P. Somatostatin and somatostatin receptor physiology. *Endocrine.* 2003;20(3):255–64.

Batista DL, Zhang X, Gejman R, Ansell PJ, Zhou Y, Johnson SA, Swearingen B, Hedley-Whyte ET, Stratakis CA, Klibanski A. The effects of SOM230 on cell proliferation and adrenocorticotropin secretion in human corticotroph pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(11):4482-8.

Baulieu EE. The steroid hormone antagonist RU486. Mechanism at the cellular level and clinical applications. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1991;20:873-91.

Ben-Jonathan N. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev*. 1985; 6:564–589.

Biller BM, Grossman AB, Stewart PM, Melmed S, Bertagna X, Bertherat J, Buchfelder M, Colao A, Hermus AR, Hofland LJ, Klibanski A, Lacroix A, Lindsay JR, Newell-Price J, Nieman LK, Petersenn S, Sonino N, Stalla GK, Swearingen B, Vance ML, Wass JA, Boscaro M. Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(7):2454-62.

Bochicchio D, Losa M, Buchfelder M. Factors influencing the immediate and late outcome of Cushing's disease treated by transsphenoidal surgery: a retrospective study by the European Cushing's Disease Survey Group. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(11):3114-20.

Boscaro M, Benato M, Mantero F. Effect of bromocriptine in pituitary-dependent Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol.* 1983;19:485-91.

Boscaro M, Ludlam WH, Atkinson B, Glusman JE, Petersenn S, Reincke M, Snyder P, Tabarin A, Biller BM, Findling J, Melmed S, Darby CH, Hu K, Wang Y, Freda PU, Grossman AB, Frohman LA, Bertherat J. Treatment of pituitary-dependent Cushing's disease with the multireceptor ligand somatostatin analog pasireotide (SOM230): a multicenter, phase II trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(1):115-22.

Brada M, Jankowska P. Radiotherapy for pituitary adenomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(1):263-75

Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol.* 2002;146:707-716

Cannavo S, Almoto B, Dall'Asta C, Corsello S, Lovicu RM, De Menis E, et al: Long-term results of treatment in patients with ACTH-secreting pituitary macroadenomas. *Eur J Endocrinol.* 2003; 149:195–200.

Caron MG, Beaulieu M, Raymond V, Gagne B, Drouin J, Lefkowitz RJ, Labrie F. Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. *J Biol Chem.* 1978; 253:2244–2253.

Castillo V, Giacomini D, Paez-Pereda M, Stalla J, Labeur M, Theodoropoulou M, et al. Retinoic acid as a novel medical therapy for Cushing's disease in dogs. *Endocrinology*. 2006; 147:4438–44.

Castinetti F, Morange I, Jaquet P, Conte-Devolx B, Brue T. Ketoconazole revisited: a preoperative or postoperative treatment in Cushing's disease. Eur J Endocrinol. 2008;158(1):91-9.

Castinetti F, Nagai M, Dufour H, Kuhn JM, Morange I, Jaquet P, Conte-Devolx B, Regis J, Brue T. Gamma knife radiosurgery is a successful adjunctive treatment in Cushing's disease. *Eur J Endocrinol*. 2007;156(1):91-8.

Catargi B, Rigalleau V, Poussin A, Ronci-Chaix N, Bex V, Vergnot V, Gin H, Roger P, Tabarin A. Occult Cushing's syndrome in type-2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(12):5808-13.

Chee GH, Mathias DB, James RA, Kendall-Taylor P: Transsphenoidal pituitary surgery in Cushing's disease: can we predict outcome? *Clin Endocrinol.* 2001;54:617–626.

Child DF, Burke CW, Burley DM, Rees LH, Fraser TR. Drug controlled of Cushing's syndrome. Combined aminoglutethimide and metyrapone therapy. *Acta Endocrinol.* 1976;82:330-41.

Chiodini I, Torlontano M, Scillitani A, Arosio M, Bacci S, Di Lembo S, Epaminonda P, Augello G, Enrini R, Ambrosi B, Adda G, Trischitta V. Association of subclinical hypercortisolism with type 2 diabetes mellitus: a case-control study in hospitalized patients. *Eur J Endocrinol.* 2005;153:837-44.

Chu JW, Matthias DF, Belanoff J, Schatzberg A, Hoffman AR, Feldman D. Successful long-term treatment of refractory Cushing's disease with high-dose mifepristone (RU 486). *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(8):3568-73.

Colao A, Pivonello R, Di Somma C, Lombardi G. Dopamine receptor agonists for treating prolactinomas. *Expert Opin Investig Drug.* 2002;11:787-800.

Colao A, Filippella M, Pivonello R, Di Somma C, Faggiano A, Lombardi G. Combined therapy of somatostatin analogues and dopamine agonists in the treatment of pituitary tumours. *Eur J Endocrinol*. 2007;156:57-63.

Colao A, Lombardi G, Annunziato L. Cabergoline. *Expert Opin Pharmacother*. 2000;1(3):555-74.

Colao A, Pivonello R, Tripodi FS, Orio F Jr, Ferone D, Cerbone G, et al. Failure of long-term therapy with sodium valproate in Cushing's disease. *J Endocrinol Invest.* 1997;20:387-92.

Conover, W. J. Practical nonparametric statistics. 2a. ed. New York: Wiley. 1980. 493p.

Contreras LN, Cardoso E, Lozano MP, Pozzo J, Pagano P, Claus-Hermbeg H. Detection of preclinical Cushing's syndrome in overweight type 2 diabetic patients. *Medicina*. 2000;60(3):326-30.

Cozzi, R., Attanasio, R., Lodrini, S. & Lasio, G. Cabergoline addition to depot somatostatin analogues in resistant acromegalic patients: efficacy and lack of predictive value of prolactin status. *Clinical Endocrinology.* 2004,61, 209–215.

De Bruin C, Feelders RA, Lamberts SW, Hofland LJ. Somatostatin and dopamine receptors as targets for medical treatment of Cushing's Syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2009;10(2):91-102.

De Bruin C, Pereira AM, Feelders RA, Romijn JA, Roelfsema F, Sprij-Mooij DM, van Aken MO, van der Lelij AJ, de Herder WW, Lamberts SW, Hofland LJ. Coexpression of dopamine and somatostatin receptor subtypes in corticotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1118-24.

De Bruin C, Feelders RA, Waaijers AM, van Koetsveld PM, Sprij-Mooij DM, Lamberts SW, Hofland LJ. Differential regulation of human dopamine D2 and somatostatin receptor subtype expression by glucocorticoids in vitro. *J Mol Endocrinol.* 2009;42(1):47-56.

De Bruin C, Pereira AM, Feelders RA, Romijn JA, Roelfsema F, Sprij-Mooij DM, van Aken MO, van der Lelij AJ, de Herder WW, Lamberts SW, Hofland LJ. Coexpression of dopamine and somatostatin receptor subtypes in corticotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1118-24.

Dekkers OM, Biermasz NR, Pereira AM, Roelfsema F, van Aken MO, Voormolen JH, Romijn JA. Mortality in patients treated for Cushing's disease is increased, compared with patients treated for nonfunctioning pituitary macroadenoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):976-81.

Devi LA. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(10):532-7.

Dexter RN, Fishman LM, Ney RL, Liddle GW. Inhibition of adrenal corticosteroid synthesis by aminoglutethimide: studies of the mechanism of action. *J Clin Endocrinol Metab.* 1967;27:473-80.

Drake WM, Perry LA, Hinds CJ, Lowe DG, Reznek RH, Besser GM: Emergency and prolonged use of intravenous etomidate to control hypercortisolemia in a patient with Cushing's syndrome and peritonitis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:3542–3544.

Durán-Prado M, Gahete MD, Martínez-Fuentes AJ, Luque RM, Quintero A, Webb SM, Benito-López P, Leal A, Schulz S, Gracia- Navarro F, Malagón MM,Castanõ JP. Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:2634–2643.

Durán-Prado M, Saveanu A, Luque RM, Gahete MD, Gracia-Navarro F, Jaquet P, Dufour H, Malagón MM, Culler MD, Barlier A, Castaño JP 2010 A Potential Inhibitory Role for the New Truncated Variant of Somatostatin Receptor 5, sst5TMD4, in Pituitary Adenomas Poorly Responsive to Somatostatin Analogs. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:0000–0000.

Engelhardt D, Weber MM: Therapy of Cushing's syndrome with steroid biosynthesis inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1994;49:261-267,

Estrada J, Boronat M, Mielgo M, Magallón R, Millan I, Díez S, Lucas T, Barceló B. The long-term outcome of pituitary irradiation after unsuccessful transsphenoidal surgery in Cushing's disease. *N Engl J Med*. 1997;336(3):172-7.

Etxabe J, Vazquez JA. Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. *Clin Endocrinol*. 1994;40(4):479-84.

Feldman D: Ketoconazole and other imidazole derivatives as inhibitors of steroidogenesis. *Endocr Rev.* 1986;7:409-420.

Ferone D, Arvigo M, Semino C, Jaquet P, Saveanu A, Taylor JE, Moreau JP, Culler MD, Albertelli M, Minuto F, Barreca A. Somatostatin and dopamine receptor expression in lung carcinoma cells and effects of chimeric somatostatin–dopamine molecules on cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289(6):1044-1050.

Findling JW, Raff H. Cushing's Syndrome: important issues in diagnosis and management. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):3746-53.

Friedman RB, Oldfield EH, Nieman LK, Chrousos GP, Doppman JL, Cutler GB Jr, Loriaux DL. Repeat transsphenoidal surgery for Cushing's disease. *J Neurosurg*. 1989;71(4):520-7.

Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol*. 2002;30:503-12.

Giraldi FP, Scaroni C, Arvat E, Martin M, Giordano R, Albiger N, et al. Effect of protracted treatment with rosiglitazone, a PPARgamma agonist, in patients with Cushing’s disease. *Clin Endocrinol.* 2006;64:219-24.

Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M. P., Riou, J. F., Emorine, L. J. and Schwartz, J. C. Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature 1989;342:* 923–926.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D. Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 2001;25:386-401.

Gordon DF, Woodmansee WW, Lewis SR, James RA, Wood WM & Ridgway EC Cloning of the mouse somatostatin receptor subtype 5 gene: promoter structure and function. *Endocrinology.* 1999;140:5598-5608.

Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*. 2003; 4(9):117.

Gumbs AA, Gagner M. Laparoscopic adrenalectomy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20(3):483-99.

Hammer GD, Tyrrell JB, Lamborn KR, Applebury CB, Hannegan ET, Bell S, et al: Transsphenoidal microsurgery for Cushing's disease: initial outcome and long-term results. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:6348–6357.

Hart MM, Straw JA: Studies on the site of action of o, p'-DDD in the dog adrenal cortex. 1. Inhibition of ACTH-mediated pregnenolone synthesis. *Steroids*. 197;1 17:559-574.

Heaney AP, Fernando M, Yong WH, Melmed S. Functional PPAR-gamma receptor is a novel therapeutic target for ACTHsecreting pituitary adenomas. *Nat Med.* 2002;8:1281-7.

Hofland LJ. Somatostatin and somatostatin receptors in Cushing's disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;14:199-205.

Hofland LJ, van der Hoek J, Feelders R, van Aken MO, van Koetsveld PM, Waaijers M, Sprij-Mooij D, Bruns C, Weckbecker G, de Herder WW, Beckers A, Lamberts SW. The multi-ligand somatostatin analogue SOM230 inhibits ACTH secretion by cultured human corticotroph adenomas via somatostatin receptor type 5. *Eur J Endocrinol*. 2005;152(4):645-54.

Hofmann BM, Hlavac M, Martinez R, Buchfelder M, Müller OA, Fahlbusch R. Long-term results after microsurgery for Cushing disease: experience with 426 primary operations over 35 years. *J Neurosurg*. 2008;108(1):9-18.

Hughes, JM, Hichens, M, Booze, GW, Thorner, MO. Cushing's syndrome from the therapeutic use of intramuscular dexamethasone acetate. *Arch Intern Med.* 1986;146(9):1848-9.

Hull SSA, Sheridan B, Atkinson AB. Pre-operative medical therapy with rosiglitazone in two patients with newly diagnosed pituitary-dependent Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol.* 2005;62:259-61.

Invitti C, De Martin M, Brunani A, Piolini M, Cavagnini F Treatment of Cushing'ssyndrome with the long-acting somatostatin analogue SMS 201-995 (sandostatin). *Clin Endocrinol.* 1990;32:275-281.

Isidori AM, Kaltsas GA, Pozza C, et al. The ectopic adrenocorticotrophin syndrome: clinical features, diagnosis, management and long-term follow-up. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:371-77.

Jaquet P, Gunz G, Saveanu A, Barlier A, Dufour H, Taylor J, Dong J, Kim S, Moreau JP, Culler MD. BIM-23A760, a chimeric molecule directed towards somatostatin and dopamine receptors, vs universal somatostatin receptors ligands in GH-secreting pituitary adenomas partial responders to octreotide. *J Endocrinol Invest.* 2005;28:21-7.

Johanssen S, Allolio B. Mifepristone (RU 486) in Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2007;157(5):561-9.

Johnston JM, Wood DF, Read S, Johnston DG. Dopamine regulates D2 receptor gene expression in normal but not in tumorous rat pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1993;92(1):63-8.

Kelberman D, Dattani MT. Hypothalamic and pituitary development: novel insights into the aetiology. *Eur J Endocrinol*. 2007;157:3-14.

Kelestimur F, Utas C, Ozbakir O, Selçuklu A, Kandemir O, Ozcan N. The effects of octreotide in a patient with Nelson's syndrome. *Postgrad Med J*. 1996;72(843):53-4.

Kelly, DF. Transsphenoidal surgery for Cushing's disease: a review of success rates, remission predictors, management of failed surgery, and Nelson's Syndrome. Neurosurg Focus. 2007;23:1-6.

Kirkwood, B. R. and Sterne, J. A. C. Essential medical statistics. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. 2006;p.502.

Kliewer SA, Umesono K, Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Evans RM. Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:1448-52.

Korbonits M, Bujalska I, Shimojo M, et al. Expression of 11 betahydroxysteroid dehydrogenase isoenzymes in the human pituitary: induction of the type 2 enzyme in corticotropinomas and other pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 2728-33.

Kraus J, Woltje M, Schonwetter N & Hollt V Alternative promoter usage and tissue specific expression of the mouse somatostatin receptor 2 gene. *FEBS Lett.* 1998; 428:165-170.

Krieger DT, Amorosa L, Linick F. Cyproheptadine-induced remission of Cushing's disease. *N Engl J Med*. 1975;293(18):893-6.

Labeur M, Paez-Pereda M, Arzt E, Stalla GK. Potential of retinoic acid derivatives for the treatment of corticotroph pituitary adenomas. *Rev Endocr Metab Disord*. 2009;10(2):103-9.

Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev*. 2001;22:75-110.

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;51:307-11.

Lamberts SW, Uitterlinden P, Klijn JM. The effect of the long-acting somatostatin analogue SMS 201-995 on ACTH secretion in Nelson's syndrome and Cushing's disease. *Acta Endocrinol.* 1989;120(6):760-6

Leibowitz G, Tsur A, Chayen SD, Salameh M, Raz I, Cerasi E, Gross DJ. Pre-clinical Cushing's syndrome: an unexpected frequent cause of poor glycaemic control in obese diabetic patients. *Clin Endocrinol.* 1996;44(6):717-22.

Leinung MC, Zimmerman D. Cushing's disease in children. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1994;23(3):629-39.

Lindholm J, Juul S, Jørgensen JO, Astrup J, Bjerre P, Feldt-Rasmussen U, Hagen C, Jørgensen J, Kosteljanetz M, Kristensen L, Laurberg P, Schmidt K, Weeke J. Incidence and late prognosis of cushing's syndrome: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(1):117-23.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method. *Methods*. 2001;25:402-8.

Loose DS, Kan PB, Hirst MA, Marcus RA, Feldman D. Ketoconazole blocks adrenal steroidogenesis by inhibiting cytochrome P450-dependent enzymes. *J Clin Invest.* 1983;71(5):1495-9.

Loose DS, Stover EP & Feldman D. Ketoconazole binds to glucocorticoid receptors and exhibits glucocorticoid antagonist activity in cultured cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1983;72:404-408.

Maggio R, Novi F, Scarselli M, Corsini GU.The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology.*FEBS J.* 2005;272(12):2939-46.

Magiakou MA, Mastorakos G, Oldfield EH, Gomez MT, Doppman JL, Cutler GB Jr, Nieman LK, Chrousos GP. Cushing's syndrome in children and adolescents. Presentation, diagnosis, and therapy. *N Engl J Med*. 1994;331(10):629-36.

Mane VP, Heuer MA, Hillyer P, Navarro MB, Rabin RL. Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR analysis. *J Biomol Tech*. 2008;19(5):342-7.

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;39:385-95.

Miller VA, Benedetti FM, Rigas JR, Verret AL, Pfister DG, Straus D, Kris MG, Crisp M, Heyman R, Loewen GR, Truglia JA, Warrell RP Jr. Initial clinical trial of a selective retinoid X receptor ligand, LGD1069. *J Clin Oncol*. 1997;15(2):790-5.

Minniti G, Brada M. Radiotherapy and radiosurgery for Cushing's disease. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(8):1373-80.

Misbin RI, Canary J, Willard D. Aminoglutethimide in the treatment of Cushing's syndrome. *J Clin Pharmacol.* 1976;16:645-51.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998;78:189-225.

Morris D, Grossman A. The medical management of Cushing's syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;970:119-33.

Munemura M, Cote TE, Tsuruta K, Eskay RL, Kebabian JW. The dopamine receptor in the intermediate lobe of the rat anterior pituitary gland: pharmacological characterization. *Endocrinology*. 1980;106:1676-1683.

Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A.The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev*. 1998;19(5):647-72.

Newell-Price J. Cushing's syndrome.*Clin Med*. 2008;8(2):204-8.

Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(5):1526-40.

Nieman LK, Chrousos GP, Kellner C, Spitz IM, Nisula BC, Cutler GB, Merriam GR, Bardin CW, Loriaux DL. Successful treatment of Cushing's syndrome with the glucocorticoid antagonist RU 486. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;61(3):536-40.

Nutting, CM, Page, SR. Iatrogenic Cushing's syndrome due to nasal betamethasone: a problem not to be sniffed. *Postgrad Med J* 1995;71:231-2.

Oldfield EH, Chrousos GP, Schulte HM, Schaaf M, McKeever PE, Krudy AG, Cutler GB Jr, Loriaux DL, Doppman JL. Preoperative lateralization of ACTH-secreting pituitary microadenomas by bilateral and simultaneous inferior petrosal venous sinus sampling. *N Engl J Med*. 1985 Jan 10;312(2):100-3.

Paez-Pereda M, Kovalovsky D, Hopfner U, Theodoropoulou M, Pagotto U, Uhl E, et al. Retinoic acid prevents experimental Cushing syndrome. *J Clin Invest*. 2001;108:1123-31.

Paiva I, Ribeiro C. Terapêutica farmacológica da doença de Cushing. *Acta Méd Port.* 2005;18:69-76.

Panetta R, Patel YC. Expression of mRNA for all five human somatostatin receptors (hSSTR1-5) in pituitary tumors. *Life Sci*. 1995;56(5):333-42.

Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB.The somatostatin receptor family. *Life Sci*. 1995;57(13):1249-65.

Patel YC, Srikant CB. Somatostatin receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 1997;8(10):398-405.

Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*. 1999;20(3):157-98.

Patil CG, Veeravagu A, Prevedello DM, Katznelson L, Vance ML, Laws ER Jr. Outcomes after repeat transsphenoidal surgery for recurrent Cushing's disease. Neurosurgery. 2008;63(2):266-70.

Pereira MA, Halpern A, Salgado LR, Mendonça BB, Nery M, Liberman B, Streeten DH, Wajchenberg BL. A study of patients with Nelson's syndrome. *Clin Endocrinol.*1998;49(4):533-9.

Petersenn S, Rasch AC, Bohnke C & Schulte HM. Identification of an upstream pituitary-active promoter of human somatostatin receptor subtype 5. *Endocrinology.* 2002; 143: 2626-34.

Petersenn S, Rasch AC, Presch S, Beil FU & Schulte HM. Genomic structure and transcriptional regulation of the human somatostatin receptor type 2. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 157:75-85.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001;29:2002-7.

Pitha-Rowe I, Petty WJ, Kitareewan S, Dmitrovsky E. Retinoid target genes in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2003;17:1723-30.

Pivonello R, De Martino MC, Cappabianca P, De Leo M, Faggiano A, Lombardi G, Hofland LJ, Lamberts SW, Colao A. 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.

Pivonello R, Ferone D, de Herder WW, Kros JM, De Caro ML, Arvigo M, Annunziato L, Lombardi G, Colao A, Hofland LJ, Lamberts SW.Dopamine receptor expression and function in corticotroph pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(5):2452-62.

Porterfield JR, Thompson GB, Young WF Jr, Chow JT, Fryrear RS, van Heerden JA, Farley DR, Atkinson JL, Meyer FB, Abboud CF, Nippoldt TB, Natt N, Erickson D, Vella A, Carpenter PC, Richards M, Carney JA, Larson D, Schleck C, Churchward M, Grant CS. Surgery for Cushing's syndrome: an historical review and recent ten-year experience. *World J Surg*. 2008;32(5):659-77.

Resmini E, Dadati P, Ravetti JL, Zona G, Spaziante R, Saveanu A, Jaquet P,Culler MD, Bianchi F, Rebora A, Minuto F, Ferone D Rapid pituitary tumor shrinkage with dissociation between antiproliferative and antisecretory effects of a long-acting octreotide in an acromegalic patient. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:1592–1599.

Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*. 2000;288(5463):154-7.

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S. Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Totowa: *Humana Press*; 2000;365-386. Available program from: http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_wwwcgi.

Salgado LR, Fragoso MC, Knoepfelmacher M, Machado MC, Domenice S, Pereira MA, de Mendonça BB. Ectopic ACTH syndrome: our experience with 25 cases. *Eur J Endocrinol.* 2006;155:725-33.

Santen RJ, Misbin RI: Aminoglutethimide: review of pharmacology and clinical use. *Pharmacotherapy*. 1981;1:95-120.

Saveanu A, Gunz G, Guillen S, Dufour H, Culler MD, Jaquet P. Somatostatin and dopamine-somatostatin multiple ligands directed towards somatostatin and dopamine receptors in pituitary adenomas. *Neuroendocrinology*. 2006;83:258-63.

Saveanu, A., Lavaque, E., Gunz, G., Barlier, A., Kim, S., Taylor, J.E.,Culler, M.D., Enjalbert, A., Jaquet, P. Demonstration of enhanced potency of a chimeric somatostatin–dopamine molecule, BIM-23A387, in suppressing growth hormone and prolactin secretion from human pituitary somatotroph adenoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:5545-52.

Schade R, Andersohn F, Suissa S, Haverkamp W, Garbe E. Dopamine agonists and the risk of cardiac-valve regurgitation. *N Engl J Med.* 2007;356(1):29-38.

Schmid HA. Pasireotide (SOM230): Development, mechanism of action and potential applications. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 286:69-74.

Schmid HA, Schoeffter P. Functional activity of the multiligand analog SOM230 at human recombinant somatostatin receptor subtypes supports its usefulness in neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology.* 2004; 80:47-50.

Sevarino KA, Felix R, Banks CM, Low MJ, Montminy MR, Mandel G, Goodman RH. Cell-specific processing of preprosomatostatin in cultured neuroendocrine cells.*J Biol Chem*. 1987;262(11):4987-93.

Shalet S, Mukherjee A. Pharmacological treatment of hypercortisolism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008;15(3):234-8.

Sheehan JM, Vance ML, Sheehan JP, Ellegala DB, Laws ER Jr: Radiosurgery for Cushing's disease after failed transsphenoidal surgery. *J Neurosurg.* 2000;93:738-42.

Silva AP, Schoeffter P, Weckbecker G, Bruns C, Schmid HA Regulation of CRH-induced secretion of ACTH and corticosterone by SOM230 in rats. *Eur J Endocrinol.* 2005;153:7-10.

Sonino N, Fava GA, Fallo F, Franceschetto A, Belluardo P, Boscaro M. Effect of the serotonin antagonists ritanserin and ketanserin in Cushing's disease. *Pituitary*. 2000;3:55-9.

Sonino N, Fava GA. Psychiatric disorders associated with Cushing's syndrome. Epidemiology, pathophysiology and treatment. *CNS Drugs*. 2001;15(5):361-73.

Sonino N, Zielezny M, Fava GA, Fallo F, Boscaro M. Risk factors and long-term outcome in pituitary-dependent Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(7):2647-52.

Stack J, Surprenant A. Dopamine actions on calcium currents, potassium currents and hormone release in rat melanotroph. *J Physiol.* 1991;493:37-58.

Stalla GK, Brockmeier SJ, Renner U, Newton C, Buchfelder M, Stalla J, Müller OA. Octreotide exerts different effects in vivo and in vitro in Cushing's disease. *Eur J Endocrinol.* 1994;130(2):125-31.

Stefaneanu, L., Kovacs, K., Horvath, E., Buchfelder, M., Fahlbusch, R., Lancranjan, L. Dopamine D2 receptor gene expression in human adenohypophysial adenomas. *Endocrine.* 2001;14, 329-36.

Steiger M, Jost W, Grandas F, Van Camp G. Risk of valvular heart disease associated with the use of dopamine agonists in Parkinson's disease: a systematic review. *J Neural Transm*. 2009;116(2):179-91.

Stévenaert A, Perrin G, Martin D, Beckers A. Cushing's disease and corticotrophic adenoma: results of pituitary microsurgery. *Neurochirurgie*. 2002;48:234-65.

Suri D, Weiss RE. Effect of pioglitazone on adrenocorticotropic hormone and cortisol secretion in Cushing's disease. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:1340-6.

Trainer PJ, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol*. 1991;34(4):317-30.

Trainer PJ, Lawrie HS, Verhelst J, Howlett TA, Lowe DG, Grossman AB, Savage MO, Afshar F, Besser GM.Transsphenoidal resection in Cushing's disease: undetectable serum cortisol as the definition of successful treatment. *Clin Endocrinol*. 1993;38(1):73-8.

Vance ML. Cushing's disease: radiation therapy. *Pituitary*. 2009;12:11-4.

Van der Hoek J, Hofland LJ, Lamberts SW. Novel subtype specific and universal somatostatin analogues: clinical potential and pitfalls. *Curr Pharm Des*. 2005;11(12):1573-92.

Van der Hoek J, Lamberts SW, Hofland LJ. The role of somatostatin analogs in Cushing's disease. *Pituitary*. 2004;7(4):257-64.

Van der Hoek J, Waaijers M, van Koetsveld PM, Sprij-Mooij D, Feelders RA, Schmid HA, Schoeffter P, Hoyer D, Cervia D, Taylor JE, Culler MD, Lamberts SW, Hofland LJ. Distinct functional properties of native somatostatin receptor subtype 5 compared with subtype 2 in the regulation of ACTH release by corticotroph tumor cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289(2):278-87.

Van Waveren Hogervorst CO, Koppeschaar HP, Zelissen PM, Lips CJ, Garcia BM. Cortisol secretory patterns in Cushing's disease and response to cyproheptadine treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(2):652-5.

Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Höllt V. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B).*FEBS Lett*. 1992;311(3):290-4.

Vaughan M. Signaling by heterotrimeric G proteins minireview series. *J Biol Chem.* 1998;273(2):667-8.

Walz MK, Alesina PF, Wenger FA, Deligiannis A, Szuczik E, Petersenn S, Ommer A, Groeben H, Peitgen K, Janssen OE, Philipp T, Neumann HP, Schmid KW, Mann K. Posterior retroperitoneoscopic adrenalectomy--results of 560 procedures in 520 patients.*Surgery*. 2006;140(6):943-8.

Weber MM, Lang J, Abedinpour F, Zeilberger K, Adelmann B, Engelhardt D: Different inhibitory effect of etomidate and ketoconazole on the human adrenal steroid biosynthesis. *Clin Investig.* 1993;71:933-938,

Yin D, Kondo S, Takeuchi J, Morimura T. Induction of apoptosis in murine ACTH-secreting pituitary adenoma cells by bromocriptine. *FEBS Lett*. 1994;339(1-2):73-5.

Zanettini R, Antonini A, Gatto G, Gentile R, Tesei S, Pezzoli G. Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson's disease. *N Engl JMed* 2007;356(1):39-46.