Viviani De Marco

**Estudo dos genes *Tbx19* e *Crhr1* em cães da raça
poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente**

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

Área de concentração: Endocrinologia
Orientadora: Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça

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

De Marco, Viviani

Estudo dos genes *Tbx19* e *Crhr1* em cães da raça poodle com hipercortisolismo
ACTH-dependente / Viviani De Marco. -- São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Berenice Bilharinho de Mendonça.

Descritores: 1.Hipersecreção hipofisária de ACTH/etiologia 2.Receptores de
hormônio liberador de corticotropina/fisiologia 3.Fatores de transcrição/fisiologia
4.Mutação/genética 5.Polimorfismo genético/genética 6.Cães

USP/FM/SBD-103/10

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

Dedicatória

*Dedico esta tese aos meus pais, Roque e
Elídia, por todo amor, dedicação e apoio
incondicional*

Agradecimentos

À minha querida orientadora Profa. Dra. Berenice B. Mendonça por ter me aceitado como aluna; pelo exemplo de profissional competente, dedicada e ética, que consegue ser chefe e ao mesmo tempo amiga, sendo por isso admirada por todos que a rodeiam; por me disponibilizar um tempinho sempre que foi necessário mesmo com tantos compromissos; pelo constante otimismo e incentivo à pesquisa e pelos sábios conselhos pessoais...

Um agradecimento especial às minhas “co-orientadoras” Luciani e Ana Elisa pelos preciosos ensinamentos de bancada, auxílio na elaboração dos protocolos, revisão deste trabalho, carinho e amizade. Muito obrigada!

À minha querida mentora da endocrinologia e pesquisa, Márcia Jericó, a quem serei eternamente grata pelo incentivo à pesquisa e que se tornou uma amiga muito querida.

Ao Dr Paulo P. S. Oliveira do Instituto do Coração (InCor) pela grandiosa colaboração neste trabalho.

À Dra. Ana Cláudia Latronico e ao Dr Alexander Jorge pelas preciosas sugestões durante as reuniões de Biologia Molecular.

Aos amigos que ganhei ao longo desses anos: Estela, Luciana Montenegro, Antônio, Regina, Luciana Brito, Ericka, Helena, Letícia, Marisa e Giseli pela agradável convivência e incentivo.

A todas as biólogas e funcionárias do LIM/42 pela competência, dedicação e boa vontade: Miriam, Cristina, Nilda, Luciane, Márcia, Cristiane, Ana, Cidinha, Neide e Fran, que tanto auxiliam e facilitam o nosso trabalho no laboratório.

Ao meu esposo Paulo pelo amor, companheirismo, paciência, compreensão e auxílio na formatação desta tese. Te amo muito!

Aos meus pais, Roque e Elídia por todo amor e esforço para me proporcionarem uma boa educação e por terem me possibilitado obter mais uma conquista, que representa uma grande realização profissional e pessoal.

À minha irmã Beti pela constante torcida, amizade, palavras de otimismo e carinho.

Ao coordenador da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Guarulhos pelo apoio e autorização para a coleta de dados no Hospital Veterinário.

Às residentes do Hovet-UnG e aos meus alunos que auxiliaram na coleta de dados: Cínthia, Valter, Ana Maria, Bruna, Thelma, Viviane, Juliana, Ariane, Adriane, Viviam e Ricardo.

A todos os proprietários dos cães com síndrome de Cushing pelo carinho e dedicação, fundamentais para a realização deste trabalho.

E, por fim, ao “melhor amigo do homem”. Continuarei trabalhando para o bem estar dos meus queridos pacientes caninos.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	Introdução.....	1
1.1	Embriogênese da hipófise anterior	3
1.2	Etiologia do hipercortisolismo endógeno em cães.....	8
1.3	Aspectos epidemiológicos do hipercortisolismo ACTH-dependente em cães.....	10
1.4	Características clínicas e laboratoriais do hipercortisolismo ACTH-dependente em cães.....	11
1.5	Diagnóstico do hipercortisolismo ACTH-dependente	15
1.5.1	Testes hormonais.....	15
1.5.2	Ultrassom das glândulas adrenais	16
1.6	Tumorigênese dos corticotrofinomas.....	18
1.7	<i>Tbx19</i>	24
1.7.1	Estrutura gênica e proteica do <i>Tbx19</i>	24
1.7.2	Papel do <i>Tbx19</i> nos corticotrofos	25
1.8	<i>Crhr1</i>	27
1.8.1	CRH e o eixo corticotrófico.....	27
1.8.2	Estrutura gênica e proteica do <i>Crhr1</i>	28
1.8.3	Papel do <i>Crhr1</i> na hiperfunção corticotrófica	32
2	Objetivos.....	36
3	Métodos.....	38
3.1	Considerações éticas.....	39
3.2	Casuística	39
3.2.1	Grupo de animais doentes	39
3.2.2	Grupo controle	40
3.2.3	Casos familiares	44
3.3	Avaliação laboratorial.....	45
3.4	Avaliação por imagem	46
3.5	Avaliação molecular.....	47
3.5.1	Extração de DNA.....	47

3.5.2	Amplificação de DNA genômico por reação de polimerização em cadeia (PCR)	48
3.5.3	Oligonucleotídeos para amplificação dos genes <i>Tbx19</i> e <i>Crhr1</i>	49
3.5.4	Protocolos para amplificação dos genes <i>Tbx19</i> e <i>Crhr1</i>	51
3.5.5	Sequenciamento automático	52
3.6	Análise das variantes alélicas dos genes <i>Tbx19</i> e <i>Crhr1</i> por enzimas de restrição.....	54
3.6.1	Análise da variante alélica do gene <i>Tbx19</i>	54
3.6.2	Análise da variante alélica do gene <i>Crhr1</i>	55
3.7	Efeito da variante alélica na estrutura tridimensional da proteína... 55	
4	Resultados.....	57
4.1	Caracterização dos animais.....	58
4.2	Gene <i>Tbx19</i>	59
4.3	Gene <i>Crhr1</i>	63
4.3.1	Descrição do animal com a variante alélica p.V97M	66
4.3.2	Análise do efeito da variante alélica p.V97M no hipercortisolismo ACTH-dependente.....	68
5	Discussão	71
6	Conclusões	85
7	Anexos.....	87
8	Referências.....	90

Lista de abreviaturas

Lista de abreviaturas

ACTH	Corticotrofina ou corticotropina
BMP4	Membro da família da proteína morfogênica óssea
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina ou corticotropina
CRHR1	Receptor tipo 1 do CRH
CRHR2	Receptor tipo 2 do CRH
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo
FGF8	Membro da família dos fatores de crescimento de fibroblastos
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
GR	Receptor de glicocorticóide
HAD	Hipercortisolismo ACTH-dependente
Kb	Kilobases
Lhx3	Gene <i>homeobox</i> LIM 3
Lhx4	Gene <i>homeobox</i> LIM 4
Neuro D1	<i>Neurogenic differentiation transcrip factor</i>
Pax6	Membro da família de genes Box pareados
PCR	Reação de polimerização em cadeia
Pit-1	Fator de transcrição positivo pituitário específico 1
Pitx-1	<i>Pituitary homeobox 1</i>
POMC	Proopiomelanocortina
Prop-1	Gene profeta do fator de transcrição específico da pituitária
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase</i> PCR

SF1	Fator esteroideogênico 1
Wnt	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>

Lista de Figuras

Lista de figuras

Figura 1	Representação esquemática da expressão dos genes envolvidos na embriogênese e desenvolvimento hipofisário de camundongo resultando na diferenciação das 5 linhagens celulares específicas da adenohipófise.....	6
Figura 2	Cão da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente apresentando abdomen abaulado, secundário à obesidade visceral e hepatomegalia.....	12
Figura 3	Cão da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente apresentando atrofia cutânea, telangectasia e estriações violáceas.....	13
Figura 4	Representação esquemática de dois modelos de tumorigênese hipofisária: (A) teoria hipotalâmica e (B) teoria hipofisária.....	20
Figura 5	Gene <i>Tbx19</i> canino com 8 exons e a região T-box (área de domínio de ligação ao DNA).....	25
Figura 6	Receptor acoplado à proteína G. A dissociação da subunidade G α s do complexo da proteína G leva à ativação da adenilciclase com produção de AMP cíclico...	30
Figura 7	Representação esquemática do gene <i>Crhr1</i> canino, com suas duas isoformas: a forma ativa <i>Crhr1α</i> com 13 exons (A) e a forma inativa <i>Crhr1β</i> com 14 exons (B).....	32
Figura 8	Heredograma das três famílias de cães da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente familiar.....	44
Figura 9	Três cães com hipercortisolismo ACTH-dependente da	

	família 1.....	45
Figura 10	Eletoferograma mostrando a substituição de uma adenina por guanina (A → G) em heterozigose no exon 7 do gene <i>Tbx19</i> com troca de aminoácido (p. S343G) em dois cães não aparentados com hipercortisolismo ACTH-dependente.....	60
Figura 11	Localização da região T-box do gene <i>Tbx19</i> e da variante alélica p.S343G no exon 7.....	61
Figura 12	Comparação das sequências peptídicas do gene <i>Tbx19</i> entre diferentes espécies.....	61
Figura 13	Digestão enzimática do fragmento contendo o polimorfismo S343G com a enzima <i>MSP I</i> em 2 cães controles (A) e em 2 cães não aparentados com hipercortisolismo ACTH-dependente (B).....	62
Figura 14	Sequência selvagem do exon 4 do gene <i>Crhr1</i> de um cão controle (A) e substituição G > A em heterozigose com troca de aminoácido (p.V97M) em um cão com hipercortisolismo ACTH-dependente (B).....	64
Figura 15	Alinhamento das sequências peptídicas do gene <i>Crhr1</i> entre as diferentes espécies, mostrando que o aminoácido valina na posição 97 é bem conservado.....	65
Figura 16	Digestão enzimática do fragmento contendo a variação alélica p.V97M com a enzima <i>Bstu I</i> em 50 cães controle e no animal com hipercortisolismo ACTH-dependente portador da mutação (M).....	65
Figuras 17-A e B	Animal com hipercortisolismo ACTH-dependente, portador da variante alélica V97M, apresentando marcante distensão abdominal, obesidade visceral,	

	alopecia, atrofia cutânea e telangectasia.....	68
Figura 18	Rearranjo estrutural da proteína mutada (vermelho) e alteração da superfície de contato entre o receptor mutado (contendo a metionina) e o ligante, comparando-se as proteínas mutada e selvagem do <i>Crhr1</i>	69
Figura 19	Sequências de aminoácidos (43-50, 76-84 e 68-109) do CRHR1 consideradas importantes para a ligação de alta afinidade ao agonista. A seta vermelha indica a localização da variante alélica p.V97M.....	80
Figura 20	Interações entre a cadeia principal da valina (Val97) e o ligante CHR através de duas ligações de hidrogênio intermoleculares.....	81

Lista de Tabelas

Lista de tabelas

Tabela 1	Características clínicas, laboratoriais e hormonais dos 50 cães da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente.....	41
Tabela 2	Hipercortisolismo ACTH-dependente familiar.....	44
Tabela 3	<i>Primers</i> intrônicos <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) para amplificação do gene <i>Tbx19</i> canino e tamanho do fragmento.....	50
Tabela 4	<i>Primers</i> intrônicos <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) para amplificação do <i>Crhr1</i> canino e tamanho do fragmento...	51
Tabela 5	Frequência alélica e genotípica da variante alélica p.S343G em 50 cães com hipercortisolismo ACTH-dependente (HAD) e 50 cães normais.....	62
Tabela 6	Variantes alélicas identificadas no <i>Tbx19</i> e suas respectivas frequências em 50 cães com hipercortisolismo ACTH-dependente.....	63
Tabela 7	Variantes alélicas identificadas no gene <i>Crhr1</i> e suas respectivas frequências em 50 cães com hipercortisolismo ACTH-dependente.....	70

Resumo

De Marco V. Estudo dos genes *Tbx19* e *Crhr1* em cães da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010:103p.

O hipercortisolismo ACTH-dependente (HAD), também chamado de doença de Cushing, é uma das endocrinopatias mais comumente diagnosticadas na espécie canina. A sintomatologia clínica ocorre, secundariamente, aos efeitos gliconeogênicos, catabólicos, antiinflamatórios e imunossupressores dos glicocorticóides sobre vários sistemas orgânicos. Há uma marcante predisposição da doença na raça poodle e casos familiares têm sido diagnosticados sugerindo uma causa genética. As alterações moleculares que levam ao desenvolvimento do HAD em cães permanecem indefinidas. Dentre os genes implicados no desenvolvimento dos corticotrofos e na regulação do eixo corticotrófico, destacam-se o *Tbx19* e o *Crhr1*, respectivamente. O *Tbx19* é um fator de transcrição obrigatório para a transcrição do gene da proopiomelanocortina (POMC) e para a diferenciação terminal dos corticotrofos. Como está presente, exclusivamente, em corticotrofos normais e adenomatosos, foi proposto seu envolvimento na secreção excessiva de ACTH na doença de Cushing. A presença de *CRHR1* nos corticotrofinomas na espécie humana e canina levantou a hipótese da sua participação na tumorigênese hipofisária, promovendo uma estimulação celular prolongada, mesmo na ausência de hormônios hipotalâmicos. Um aumento da expressão do *CRHR1* foi demonstrado nos tumores corticotróficos, apesar da secreção autônoma de ACTH e dos níveis portais suprimidos de CRH em pacientes humanos e caninos com doença de Cushing. Os objetivos do presente trabalho foram pesquisar a presença de mutações germinativas nas regiões codificadoras dos genes *Tbx19* e *Crhr1* em cães com HAD. Para tanto, estudamos 50 cães da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente (33 fêmeas e 17 machos), com idade média de 8,71 anos e 50 cães controle da mesma raça (32 fêmeas e 18 machos) com idade superior a 6 anos (média de 9,38 anos) e sem endocrinopatias. O DNA genômico foi extraído e amplificado através da reação de polimerização em cadeia (PCR), utilizando-se oligonucleotídeos (*primers*) específicos para os genes *Tbx19* e *Crhr1*. Foi identificada uma nova variante alélica tanto no *Tbx19* como no *Crhr1*, ambas não descritas na literatura. No gene *Tbx19*, a variante p. S343G foi encontrada em dois cães não aparentados, mas também em dois controles normais, sugerindo tratar-se de um novo polimorfismo. Já a variante p. V97M do *Crhr1* foi encontrada, em heterozigose em um animal com HAD, porém não foi observada em cem alelos normais. O códon 97 está localizado no domínio extracelular aminoterminal do gene *Crhr1*, de extrema importância para a ligação com alta afinidade ao ligante. O estudo molecular da estrutura quaternária da

proteína mutada, seguido da avaliação da energia de ligação da superfície de contato entre o hormônio e o receptor revelou um rearranjo estrutural com alteração da superfície de contato entre o CRH e o seu receptor CRHR1, resultando em uma energia de ligação 17% superior à do receptor selvagem. Em conclusão, esse estudo não identificou alterações no gene *Tbx19* associadas ao hipercortisolismo ACTH-dependente canino, mas por outro lado, identificou pela primeira vez, uma mutação ativadora no *Crhr1*, provavelmente responsável pelo hipercortisolismo ACTH-dependente em um cão da raça poodle.

Descritores: 1.Hipersecreção hipofisária de ACTH/etiologia 2.Receptores de hormônio liberador de corticotropina/fisiologia 3.Fatores de transcrição/fisiologia 4.Mutação/genética 5.Polimorfismo genético/genética 6.Cães

Summary

De Marco V. Study of *Tbx19* and *Crhr1* genes in Poodle dogs with ACTH-dependent hypercortisolism [thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2010:103p.

The ACTH-dependent hypercortisolism (ADH), also called Cushing's disease, is one of the most commonly diagnosed endocrine diseases in dogs. The symptoms occur due to glucocorticoids excess leading to gluconeogenic, catabolic, anti-inflammatory and immunosuppressive effects in multiple organs and systems. There is a high incidence of Cushing's disease in Poodles and familial disease has been identified suggesting a genetic involvement. The molecular changes that lead to the development of ACTH-dependent hypercortisolism in dogs remain undefined. Among genes implicated in corticotroph development and in corticotropic axis regulation, we would like to point out *Tbx19* and *Crhr1*, respectively. *Tbx19* gene is a transcription factor required for transcription of the proopiomelanocortin gene and for terminal differentiation of the corticotroph. Inactivating mutations in that gene are associated with human isolated ACTH deficiency. Since *Tbx19* is present exclusively in normal and adenomatous corticotroph cells, its involvement in the secretion of ACTH in Cushing's disease was proposed. The presence of *CRHR1* in corticotrophinomas in humans and dogs raised the possibility of its involvement in pituitary tumorigenesis, promoting prolonged cell stimulation, even in the absence of hypothalamic hormones. An increased expression of the *CRHR1* mRNA was demonstrated in human and canine ACTH-secreting pituitary adenomas, despite the autonomous ACTH secretion and the low portal levels of CRH. The aim of this study was to investigate *Tbx19* and *Crhr1* coding region mutations in Poodle dogs with ACTH-dependent hypercortisolism. We studied 50 Poodle dogs with ADH (33 females and 17 males) with a mean age of 8.71 years and 50 control dogs of the same breed (32 females and 18 males) older than 6 years (mean 9.38 years) and without endocrinopathies. Genomic DNA was extracted from peripheral blood, amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using specific intronic primers and submitted to automatic sequence. We identified a new allelic variant in the *Tbx19* and *Crhr1* coding regions. The allelic variant p. S343G in the *Tbx19* gene was found in two unrelated dogs, but also in two normal controls, suggesting that this is a new polymorphism. The *Crhr1* allelic variant p. V97M was found in heterozygosity in one animal with ACTH-dependent hypercortisolism, but was not observed in one hundred normal alleles. The codon 97 is located in the extracellular amino terminal domain of the *Crhr1* and is extremely important for high affinity ligand binding. The molecular analysis of the quaternary structure of normal and mutated proteins, followed by evaluation of the binding energy of the contact surface between the hormone and the receptor showed a structural

rearrangement of the mutated protein by changing the contact surface between the CRH and its receptor CRHR1, resulting in a binding energy 17% higher than the wild type. In conclusion, this study did not identify Tbx19 mutations associated with canine ACTH-dependent hypercortisolism, but on the other hand, we first identified a Crhr1 gain-of-function mutation probably responsible for ACTH-dependent hypercortisolism in a Poodle dog of our cohort.

Descriptors: 1.Pituitary ACTH hypersecretion/etiology 2.Receptors, corticotropin-releasing hormone/physiology 3.Transcription factors/physiology 4.Mutation/genetics 5.Polimorphism, genetic/genetics 6.Dogs

1 Introdução

A hipófise canina é uma glândula endócrina localizada na base do crânio e conecta-se ao hipotálamo através do infundíbulo. Consiste de 3 lobos: o anterior, o posterior e o lobo intermediário. O lobo posterior deriva do neuroectoderma, enquanto o anterior e o intermediário derivam do tecido ectodérmico oral (1).

A adenohipófise situa-se anteriormente à neurohipófise e se divide em *pars distalis*, que compreende a maior parte da adenohipófise e é responsável pela secreção dos hormônios; *pars intermedia*, que se localiza entre a *pars distalis* e a *pars nervosa* e contorna o lumen residual da bolsa de Rathke e a *pars tuberalis*, que consiste de projeções dorsais de células parenquimatosas que rodeiam o pedúnculo infundibular (2). A hipófise é uma glândula mestra envolvida nas funções do crescimento, metabolismo e reprodução e esse funcionamento complexo é mediado por 6 hormônios secretados por 5 tipos de células. Cada tipo celular é definido pelo hormônio produzido: corticotrofo (ACTH), tireotrofo (TSH), gonadotrofo (LH, FSH), somatotrofo (GH) e lactotrofo (PRL). O lobo posterior da hipófise corresponde às projeções axonais de neurônios hipotalâmicos dos núcleos supra-óptico e paraventricular e armazena e secreta ocitocina e hormônio antidiurético (1).

Nos animais domésticos, os tumores funcionais da hipófise, geralmente, derivam das células corticotróficas da *pars distalis* e, menos frequentemente, da *pars intermedia* e estão associados à síndrome clínica de hipercortisolismo. A espécie canina é certamente a mais acometida, seguida da espécie equina e felina (3).

Os tumores hipofisários são frequentes em seres humanos, perfazendo 10 a 15% de todas as neoplasias intracranianas. As células produtoras de hormônio corticotrófico (ACTH) constituem 15-20% da população adenohipofisária e cerca de 10 a 15% dos adenomas hipofisários são representados pelos corticotrofinomas que causam a doença de Cushing (4).

A incidência da doença de Cushing em cães é maior do que em humanos, caracterizada por sintomatologia clínica bastante diversificada e alta morbidade (5). Apesar disso, a patogênese e a base molecular desta endocrinopatia permanece indefinida.

1.1 Embriogênese da hipófise anterior

A glândula hipofisária é formada precocemente na vida embrionária a partir de dois tecidos embriológicos diferentes: o ectoderma oral e o neuroectoderma, que originarão os lobos hipofisários anterior e posterior, respectivamente. Uma evaginação do teto da cavidade bucal do embrião (bolsa de Rathke) estende-se para frente e para cima em direção ao cérebro e se reúne com uma proliferação do assoalho do 3º ventrículo. Esta última se converte na neuro-hipófise e a região derivada da cavidade oral dará origem à adeno-hipófise. A interação embrionária dessas duas estruturas é imprescindível para que ocorra a diferenciação celular e formação da hipófise anterior (2).

A embriogênese hipofisária ocorre de forma sequencial e organizada sob o controle de diversas moléculas sinalizadoras provenientes do

diencéfalo ventral e dos tecidos adjacentes à futura bolsa de Rathke, tais como BMPs (membros da família da proteína morfogênica óssea), FGFs (membros da família dos fatores de crescimento de fibroblastos), SHH (*sonic hedgehog*) e componentes da via Notch, que ativam fatores de transcrição como o *Lhx3*, *Lhx4*, *Prop1*, *Pitx1/2*, *Pax6*, *Pit1* e *Hesx1*, os quais desempenham papel na migração, proliferação e diferenciação das cinco linhagens celulares hipofisárias (Figura 1), quais sejam: somatotrofos, tireotrofos, lactotrofos, corticotrofos e gonadotrofos (6, 7). Muitos desses fatores de transcrição são codificados por genes *homeobox*, cujas proteínas contém um homeodomínio, região de ligação ao DNA, que apresenta elevada homologia estrutural entre as espécies. Estes fatores de transcrição são expressos em fases distintas e específicas do desenvolvimento hipofisário, podendo ser restrita a um determinado período ou durante toda a vida pós-natal (8).

A expressão do gene *Bmp4* no diencéfalo ventral inicia a evaginação do ectoderma oral, promovendo a formação da bolsa de Rathke rudimentar. O FGF8 é necessário para a expressão dos genes *Lhx3* e *Lhx4*, os quais por sua vez permitem a formação da bolsa de Rathke definitiva e estimulam a proliferação das células precursoras hipofisárias. O gene *Bmp2* promove a diferenciação terminal dos tipos celulares da hipófise, não sendo expresso durante a fase de proliferação celular (8-11).

O *Hesx1* tem sua expressão limitada ao período inicial da embriogênese hipofisária, sendo fundamental na diferenciação de todas as linhagens celulares. A expressão do *Prop1* é necessária para a expressão

definitiva do *Pit1* (oficialmente denominado *Pou1f1*) nos somatotrofos, galactotrofos e tireotrofos e coincide com a diminuição da expressão do *Hesx1*. Também é importante na diferenciação dos corticotrofos, visto que indivíduos com mutações neste gene podem apresentar também deficiência de ACTH (8).

O gene codificador da subunidade α -glicoproteica (α -Gsu), componente fundamental do TSH, LH e FSH, também se torna ativo precocemente. O gene *Pitx1* é um dos primeiros a ser expresso, precedendo a formação da bolsa de Rathke e é considerado um regulador geral da transcrição hipofisária, pois a maioria dos genes codificadores de hormônios é ativado pela proteína PITX1. Sua expressão persiste na vida adulta nas linhagens secretoras de POMC, TSH e LH/FSH. O gene *Pitx2*, outro membro da família *Pitx*, também está expresso nos estágios iniciais do desenvolvimento hipofisário (12, 13).

As linhagens somatotróficas, lactotróficas e tireotróficas requerem a presença do *Prop1* e *Pou1f1* para sua diferenciação, sendo que *Gata2* e o *Sf1* são necessários para a diferenciação terminal dos gonadotrofos. O *Gata2* e *Pou1f1* são coexpressos nos tireotrofos, sendo ambos importantes para a ativação dos genes tireotrofo-específicos (8, 9).

O factor inibidor de leucemia (*Lif*) é expresso durante o desenvolvimento das células corticotróficas e atua em sinergismo com o CRH, aumentando a expressão da POMC e reprimindo a diferenciação das células *Lhx3* dependentes (somatotrofos, tireotrofos, gonadotrofos e lactotrofos) (14).

Na linhagem de corticotrofos, a transcrição do gene da *POMC* requer interação direta entre *Pitx1*, *Neuro D1* e um novo fator de transcrição, presente somente em células que expressam a *POMC*, denominado de *Tbx19*, anteriormente chamado de *Tpit*. A interação entre esses fatores é crítica para a transcrição celular específica do gene da *POMC* e para integração dos sinais endócrinos que regulam a sua expressão. A expressão do *Neuro D1* desencadeia o início da diferenciação dos corticotrofos e melanotrofos enquanto que a ativação do *Tbx19* possibilita a diferenciação terminal de ambas as linhagens. Outra função atribuída ao *Tbx19* é a repressão de diferenciações celulares alternativas das células que expressam a *POMC*, já que na sua ausência os corticotrofos se diferenciam em gonadotrofos (15).

Figura 1 Representação esquemática da expressão dos genes envolvidos na embriogênese e desenvolvimento hipofisário de camundongo resultando na diferenciação das 5 linhagens celulares específicas da adenohipófise (7)

A glândula hipofisária canina contém duas linhagens celulares que expressam a proopiomelanocortina (POMC), os corticotrofos que produzem ACTH no lobo anterior e os melanotrofos que produzem α -MSH no lobo intermediário (16). Os corticotrofos são as primeiras células a alcançarem a diferenciação terminal na adenohipófise fetal canina, à semelhança da espécie humana (17). A POMC é processada em corticotrofina (ACTH) pela proconvertase 1 (PC1) nos corticotrofos da hipófise anterior e em hormônio melanotrófico (α -MSH) pela proconvertase 2 (PC2) nos melanotrofos do lobo intermediário de roedores e caninos (18). Em humanos, esse lobo intermediário involui durante a vida fetal, sendo que a maior fonte de MSH para pigmentação cutânea é a produção local na pele. Apesar dessas diferenças, os mecanismos regulatórios da produção hipofisária de ACTH são similares entre essas duas espécies (19).

O lobo intermediário canino é constituído por dois tipos celulares distintos, as células tipo A e tipo B. As células tipo A, típicas da *pars intermedia*, são as mais predominantes e na análise imunohistoquímica coram para o α -MSH e mais fracamente para o ACTH e a beta-lipotropina. As células tipo B, coram intensamente para o ACTH, à semelhança da *pars distalis*, mas não para α -MSH (20, 21). A *pars intermedia* no cão está sob controle inibitório do tônus dopaminérgico (21, 22), porém a liberação do ACTH pelas células B continua sendo influenciada pelo CRH (21). Embora a doença de Cushing em cães seja, prevalentemente causada por adenomas na *pars distalis*, níveis elevados de peptídeos derivados da POMC também podem se originar de transformação neoplásica da *pars intermedia*,

contribuindo para a hipersecreção de ACTH nos casos de hipercortisolismo ACTH-dependente (23, 24).

1.2 Etiologia do hipercortisolismo endógeno em cães

O hipercortisolismo, também chamado de síndrome de Cushing, é uma condição clínica caracterizada por concentrações persistentemente elevadas de cortisol na corrente sanguínea de origem endógena ou exógena (iatrogênica), e sintomatologia bastante diversificada decorrente dos efeitos gliconeogênicos, imunossupressores, antiinflamatórios e catabólicos dos glicocorticóides em vários sistemas orgânicos (18, 25).

O hipercortisolismo endógeno é um distúrbio endócrino bastante frequente em cães com mais de 6 anos de idade (26). Cerca de 80 a 85% dos casos de hipercortisolismo endógeno ou espontâneo são secundários a uma excessiva secreção de ACTH pela hipófise com consequente hiperplasia adrenocortical e hipersecreção de glicocorticóides (hipercortisolismo ACTH-dependente). Os 15 a 20% dos casos remanescentes são causados por tumores adrenocorticais benignos ou malignos (18, 26). Muito raramente, casos de hipercortisolismo endógeno causados, concomitantemente, por tumores hipofisários secretores de ACTH e tumores adrenais secretores de cortisol são relatados na espécie canina (27). Recentemente, foi relatado um caso de tumor neuroendócrino no pâncreas com metástases em fígado, promovendo secreção ectópica de ACTH e hipercortisolismo em um cão pastor alemão de 8 anos de idade (28).

Considera-se que mais de 90% dos cães com hipercortisolismo ACTH-dependente apresentam tumor hipofisário (corticotrofinoma), condição esta denominada de doença de Cushing (29). Porém há relatos de alguns cães, particularmente da raça poodle, com evidências clínico-laboratoriais de hipercortisolemia e adrenomegalia bilateral sem a constatação de um tumor hipofisário à necrópsia, sugerindo a presença de distúrbios na retroalimentação negativa do eixo corticotrófico ou de distúrbios hipotalâmicos como causa de hipersecreção de ACTH e hiperplasia dos corticotrofos. No entanto o defeito hipotalâmico não está bem estabelecido em cães (30, 31).

Aproximadamente 85% dos tumores corticotróficos funcionais em cães são microadenomas, compostos por células cromóforas bem diferenciadas, com tamanho inferior a 10 mm de diâmetro. Aqueles com tamanho superior a 10 mm são denominados de macroadenomas e têm o potencial de comprimir estruturas adjacentes e causar sintomatologia neurológica à medida que expandem dorsalmente em direção ao hipotálamo e tálamo. Os carcinomas hipofisários, por sua vez, são extremamente raros (3, 32).

O adenoma hipofisário derivado da *pars distalis* é a forma mais prevalente na espécie canina (3). Adenomas a partir da *pars intermedia* compreendem cerca de 6,5% dos casos, sendo mais frequentes em cães idosos, devido possivelmente a uma neurodegeneração dopaminérgica, reduzindo o seu efeito inibitório e favorecendo a secreção de ACTH (24).

O ACTH canino é um hormônio peptídico de 39 aminoácidos, sendo os seus primeiros 24 aminoácidos responsáveis por sua atividade biológica, diferindo do ACTH humano em apenas um aminoácido na posição 37 (33). O ACTH é processado a partir de uma grande molécula precursora, a proopiomelanocortina (POMC), cuja expressão está bastante aumentada nos corticotrofos adenomatosos (18, 34).

A transcrição do gene da POMC, bem como a liberação de ACTH pela hipófise anterior em condições normais, é controlada por fatores estimulatórios, notadamente o hormônio hipotalâmico CRH (hormônio liberador de corticotrofina) e a AVP (arginina vasopressina) e fatores inibitórios representados pelos glicocorticóides. Porém, na doença de Cushing, esse controle hormonal fisiológico é parcialmente perdido (35, 36).

1.3 Aspectos epidemiológicos do hipercortisolismo ACTH-dependente em cães

O primo reconhecimento da doença de Cushing em cães data de 1939 (37). Atualmente, ela é considerada uma das endocrinopatias mais comumente diagnosticadas nesta espécie (18). A incidência em cães supera aquela observada em seres humanos, sendo estimada em 1 a 2 casos para cada 1000 cães atendidos por ano, contra 1,2 – 2,4 casos novos para cada 1.000.000 pessoas atendidas por ano (5, 38). Ocorre também, raramente, em outras espécies animais como felinos e equinos (39).

O hipercortisolismo ACTH-dependente acomete, principalmente, cães com mais de 6 anos de idade, sendo a média em torno de 11 anos,

com uma discreta predisposição para o sexo feminino (18, 26, 40). Aproximadamente 75% dos cães pesam menos de 20 kg. As raças mais predispostas são poodle, teckel, beagle, terrier brasileiro, yorkshire terrier, scottish terrier, labrador, boxer e pastor alemão (18, 25, 41).

A raça poodle, no entanto, é merecedora de destaque por ser a raça mais frequentemente acometida em estudos epidemiológicos (18, 40). Um estudo epidemiológico realizado no serviço de clínica médica de pequenos animais do hospital veterinário da Universidade Guarulhos entre 2006 e 2008 apontou uma frequência de endocrinopatias em torno de 10%. Dentre as endocrinopatias caninas, o hipercortisolismo endógeno totalizou 58,3% (n=109/187) dos casos, sendo que 60,5% dos animais eram da raça poodle. Outro dado que chama a atenção, segundo a minha experiência profissional, é o fato de que poodles muito jovens, entre 1 e 4 anos de idade, têm sido diagnosticados com essa doença mais frequentemente, sendo que alguns deles apresentam familiares próximos, como irmã, irmão, pai ou mãe, com o mesmo diagnóstico. Esses achados, aliados à marcante predisposição racial, sugerem um importante envolvimento genético na origem do hipercortisolismo ACTH-dependente.

1.4 Características clínicas e laboratoriais do hipercortisolismo ACTH-dependente em cães

A exposição crônica a níveis elevados de cortisol resulta em uma combinação clássica de sintomas clínicos e achados de exame físico que se estabelecem de forma insidiosa e progressiva. Não raramente, os animais

apresentam uma evolução clínica da doença de pelo menos 6 meses no ato do diagnóstico. Tais características clínicas incluem: polifagia, poliúria, polidipsia, marcante distensão abdominal secundária à obesidade visceral e hepatomegalia (Figura 2), taquipnéia, atrofia e fraqueza muscular, letargia, intolerância ao calor, alterações no ciclo estral, atrofia testicular, além de diversas alterações cutâneas representadas por alopecia não pruriginosa, atrofia cutânea, telangectasia, estriações (Figura 3), comedos, hiperpigmentação, calcinose cutânea e piodermite recidivante (18, 26, 42, 43).

Figura 2 : Cão da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente apresentando abdomen abaulado, secundário à obesidade visceral e hepatomegalia

Figura 3: Cão da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente apresentando atrofia cutânea, telangectasia e estriações violáceas

Além do quadro clínico típico, o hipercortisolismo prolongado pode predispor ao desenvolvimento de sérias complicações clínicas, como pancreatite, diabetes mellitus, hipertensão arterial, cistite de repetição e tromboembolismo pulmonar (44).

Diversas alterações hematológicas e bioquímicas podem ser identificadas em cães com síndrome de Cushing. O hemograma, geralmente, revela uma discreta eritrocitose, leucocitose por neutrofilia sem desvio à esquerda, linfopenia, eosinopenia, monocitose e trombocitose. A urina apresenta-se diluída com densidade inferior a 1,020 em 85% dos casos, sendo a hipostenúria um achado frequente (densidade < 1,008). Além disso, 50% dos animais têm infecção do trato urinário inferior, demonstrado por leucocitúria e bacteriúria (25).

As principais alterações bioquímicas séricas são: aumento da fosfatase alcalina (FA), da alanina aminotransferase (ALT), hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperglicemia discreta. Aproximadamente 20% dos cães desenvolvem diabetes mellitus concomitantemente à doença de Cushing (18, 26).

A elevação da FA se deve à colestase hepática e, principalmente, à indução de uma isoforma da fosfatase alcalina pelos glicocorticóides, que ocorre exclusivamente na espécie canina. O aumento da ALT se deve aos danos hepatocelulares decorrentes da esteatose hepática e acúmulo de glicogênio no hepatócito. A hiperlipidemia ocorre secundariamente à lipólise mais acentuada da gordura visceral, devido ao aumento da atividade da enzima lipase hormônio sensível e à remoção prejudicada dos triglicerídeos plasmáticos, devido à inibição da enzima lipoproteína lipase. Discreta hiperglicemia deve resultar do aumento da gliconeogênese hepática e do antagonismo à ação da insulina exercido pelos glicocorticóides (18).

A hipertensão sistêmica é detectada em mais de 60% dos cães com hipercortisolismo endógeno podendo inclusive ocorrer hipertrofia concêntrica de ventrículo esquerdo. A elevação dos níveis pressóricos ocorre secundariamente ao hipercortisolismo crônico, devido ao aumento da sensibilidade às catecolaminas, à maior secreção de renina, à redução das prostaglandinas vasodilatadoras e ao aumento da secreção de alguns mineralocorticóides (44).

1.5 Diagnóstico do hipercortisolismo ACTH-dependente

1.5.1 Testes hormonais

Para a confirmação do diagnóstico de hipercortisolismo ACTH-dependente, a integridade do *feedback* negativo sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal deve ser avaliada através do teste de depressão com dexametasona, e os níveis plasmáticos basais de ACTH devem ser mensurados (41).

O teste de depressão com dexametasona apresenta uma elevada sensibilidade, de 85% a 100%, e uma acurácia em torno de 95% (25, 39, 41), porém a presença de doenças não adrenais concomitantes aumenta a chance de se obter um resultado falso-positivo, reduzindo sua especificidade para 73% (41, 45). Uma dose baixa de dexametasona é capaz de suprimir a secreção de ACTH hipofisário em cães normais através de *feedback* negativo e, conseqüentemente, reduzir a concentração sérica de cortisol. O cortisol é mensurado imediatamente antes e 8 horas após a aplicação endovenosa de 0,01 mg/kg de dexametasona. Em cães com hipercortisolismo endógeno, os níveis de cortisol sérico não sofrem redução abaixo do valor de referência pré-determinado e utilizado pela maioria dos laboratórios que é de 1,4 µg/dL. Cães normais, geralmente, apresentam valores de cortisol 8 horas após dexametasona inferiores a 1 µg/dL. Resultados entre 1,0 e 1,4 µg/dL devem ser retestados (18, 41).

A discriminação entre o hipercortisolismo endógeno ACTH-dependente do ACTH-independente não é possível através do teste de

depressão com dexametasona. Para tanto, há necessidade da dosagem plasmática de ACTH e da avaliação ultrassonográfica das glândulas adrenais. Os tumores adrenocorticais funcionais e o hipercortisolismo iatrogênico suprimem a secreção endógena de ACTH através do mecanismo de *feedback* negativo, o que não acontece com os casos de hipercortisolismo ACTH-dependente resultantes da secreção excessiva de ACTH (46).

As concentrações plasmáticas basais normais de ACTH variam de 20 a 60 pg/mL em cães, de acordo com o método utilizado. Cães com hipercortisolismo ACTH-dependente apresentam valores superiores a 40 pg/mL em 85% dos casos, sendo os valores dos 15% restantes dentro da normalidade, porém inadequados para o hipercortisolismo endógeno. Os valores inferiores a 10 ou a 20 pg/mL, na dependência da sensibilidade do teste empregado, sugerem supressão hipofisária e, portanto, uma causa não ACTH-dependente (18, 25).

1.5.2 Ultrassom das glândulas adrenais

Rotineiramente, ambas as adrenais são visualizadas em cães com doença de Cushing e podem apresentar dimensões normais ou aumentadas, com manutenção da sua forma e contorno, mostrando aspecto homogêneo e hipoecogênico em relação à cortical renal adjacente. A mensuração da espessura do polo caudal é considerada a mais fidedigna para a identificação de adrenomegalia do que a mensuração do seu comprimento

(47, 48). Em cães normais a glândula adrenal direita tem em média 2,24 cm de comprimento e 0,58 cm de espessura e a adrenal esquerda 2,49 cm de comprimento e 0,61 cm de espessura (49) Valores da espessura do pólo caudal superiores a 0,7 cm são sugestivos de adrenomegalia em animais com peso médio de 10 Kg como os da raça poodle (50, 51). A glândula adrenal direita pode, eventualmente, não ser visualizada, devido à sua topografia mais cranial. Outros fatores que podem dificultar a visualização de ambas as adrenais são a presença de gases estomacais ou intestinais e a conformação corpórea de tórax profundo (48, 50, 52).

Cães com tumor adrenal apresentam adrenomegalia com contornos irregulares, ecotextura heterogênea, presença de calcificação unilateral e atrofia da glândula contralateral (18).

A realização da ressonância magnética (RM) aumenta sensivelmente a acurácia do diagnóstico da doença de Cushing ao permitir a identificação de microadenomas hipofisários, mas ainda não está disponível para a classe veterinária em nosso estado. Os exames de tomografia e RM requerem anestesia geral do animal por aproximadamente 1 a 2 horas, os quais se encontram debilitados na maioria das vezes e, além disso, é necessário um alto investimento financeiro (53).

Apesar do diagnóstico da doença de Cushing ter se estabelecido na espécie canina há aproximadamente 70 anos, há poucos relatos na literatura veterinária abordando a etiologia do hipercortisolismo ACTH-dependente, a tumorigênese corticotrófica e seus aspectos moleculares.

1.6 Tumorigênese dos corticotrofinomas

Na última década, houve avanços consideráveis no conhecimento do desenvolvimento da hipófise anterior, na patogênese dos tumores hipofisários, bem como nos fatores envolvidos na progressão tumoral.

Há duas teorias para a origem dos corticotrofinomas: a teoria hipotalâmica e a teoria hipofisária ou monoclonal. Segundo a teoria hipotalâmica, a exposição crônica dos corticotrofos a concentrações elevadas dos fatores estimulatórios hipotalâmicos, como CRH ou AVP, poderia levar ao desenvolvimento de hiperplasia e, posteriormente, de adenomas (Figura 4) (54). Defeitos nos receptores de glicocorticóides seriam capazes de promover uma maior estimulação das células corticotróficas, devido à diminuição do efeito inibitório do cortisol, com consequente aumento da síntese da POMC e do CRH. Adicionalmente, a neurodegeneração dopaminérgica evidenciada em cães idosos e a menor expressão de receptores dopaminérgicos D2 em células corticotróficas, resultariam na redução do tônus inibitório sobre os corticotrofos, promovendo sua hiperplasia. A ocorrência de mutações somáticas em células hiperplasiadas provocaria o desenvolvimento de um adenoma (55).

A constatação de recidivas a longo prazo em pacientes humanos que sofreram ressecção cirúrgica do microadenoma corticotrófico, a identificação de hiperplasia hipofisária na ausência de adenomas em alguns casos isolados e respostas terapêuticas a drogas dopaminérgicas ou antiserotoninérgicas reforçam a hipótese de distúrbios neuroendócrinos associados à etiologia da doença de Cushing (56, 57).

Por outro lado, a teoria hipofisária assume que os tumores hipofisários são primários e resultam da expansão de um clone tumoral desenvolvido a partir de mutação somática de uma célula corticotrófica (4, 14, 54). As evidências para sustentar tal teoria compreendem: a total remissão dos sintomas e a ausência de recidivas em 80% dos casos após remoção cirúrgica do corticotrofinoma, a inexistência de hiperplasia nas áreas adjacentes ao tumor e, principalmente, a comprovação definitiva do caráter monoclonal desses tumores através de estudos de inativação do cromossomo X e da análise da perda da heterozigose (58, 59). Este último representou um marco importante na investigação da etiopatogenia dos corticotrofinomas, fortalecendo a hipótese de que mutações somáticas precedem a expansão clonal de uma célula corticotrófica modificada (14, 60, 61).

Clayton e cols (2000) confirmaram a origem monoclonal dos adenomas hipofisários humanos, mas também demonstraram que tumores recorrentes são, frequentemente, derivados de clones independentes do clone original e inicial do tumor (62). Dessa forma, é possível que o padrão monoclonal em alguns casos seja adquirido, posteriormente, a uma fase prolongada de crescimento policlonal em resposta a fatores estimulatórios, havendo a seleção de um determinado clone celular que irá se desenvolver e anulação do restante dos clones (63).

No contexto da teoria hipofisária, o processo de tumorigênese hipofisária envolve várias etapas, sendo desencadeado por um evento iniciador, representado por uma mutação somática e, subsequentemente,

por eventos promotores que permitem a expansão do clone tumoral (Figura 4). Esta expansão pode ser sustentada por fatores tróficos, intrínsecos ou extrínsecos (4). As alterações moleculares que levam ao desenvolvimento destes tumores são apenas, parcialmente, conhecidas. Dentre os múltiplos eventos que podem contribuir para a iniciação da patogênese dos adenomas hipofisários estão as alterações cromossômicas e a expressão de protooncogenes específicos da hipófise. Fatores permissivos para a expansão clonal da célula hipofisária transformada incluem: estimuladores hipotalâmicos, fatores de crescimento intra-hipofisários, ausência de fatores inibitórios e alterações na sinalização da regulação do ciclo celular (4, 14, 64, 65).

Figura 4: Representação esquemática de dois modelos de tumorigênese hipofisária: (A) teoria hipotalâmica e (B) teoria hipofisária (57)

Apesar de vários estudos sobre a patogênese dos corticotrofinomas em humanos, sua etiologia permanece indefinida. Pesquisas em diversos oncogenes (*c-Erb B2/neu*, *c-MYC*, *PKC*, *RET*, *c-FOS*, *c-MYB* e *RAS*) não identificaram anormalidades que sugiram sua participação na tumorigênese corticotrófica. O PTTG (*pituitary tumor-transforming gene*), que age através do FGF (fator de crescimento dos fibroblastos) no processo de angiogênese tumoral, teve sua expressão aumentada em apenas um corticotrofinoma dentre vários outros investigados, o que não nos permite concluir se ele apresenta algum papel na formação do tumor ou se sua maior expressão ocorreu subsequentemente a ele (14, 66).

Genes supressores tumorais (*MEN1*, *RB*, *CDKN2A*) envolvidos nas neoplasias mais comuns não estão envolvidos na grande maioria dos adenomas hipofisários (66, 67). As mutações no gene supressor tumoral *p53* são consideradas as alterações gênicas mais frequentes em neoplasias malignas em humanos, porém o seu envolvimento nos tumores hipofisários parece estar restrito ao comportamento agressivo do tumor e não à sua formação (60). A família de proteínas inibitórias do ciclo celular (*p21*, *p27* e *p16*) assim como o gene retinoblastoma (*Rb1*) têm sido estudados em corticotrofinomas. Camundongos *Knock out* para *Rb1* e *p27* desenvolvem tumores na *pars intermedia*, porém mutações nesses genes não foram identificadas em adenomas hipofisários humanos. Uma expressão reduzida de *P27* pode ser encontrada em tumores hipofisários malignos em comparação a adenomas ou hipófise normal (57, 60).

A secreção de ACTH é controlada principalmente pela transcrição do gene da *POMC* e do *CRH*, sendo a transcrição destes genes regulada pelos glicocorticóides (GCs). A ação inibitória dos GCs sobre o gene da *POMC* ocorre pela sua interação com elementos negativos responsivos aos GCs, localizados na região promotora do gene da *POMC*. Mutações nesta região também não foram encontradas em corticotrofinomas humanos (14).

Outros mecanismos que poderiam estar envolvidos na tumorigênese dos corticotrofinomas compreendem as alterações na tradução das proteínas dos hormônios hipotalâmicos estimuladores das células corticotróficas (CRH e AVP), através de mutações ou alterações na expressão de seus receptores CRHR1 e AVP-R do tipo V3, respectivamente (14).

Os GCs exercem sua função através da ligação ao seu receptor (GR), portanto alterações no GR poderiam explicar a resistência aos GCs encontrada nos corticotrofinomas. Mutações somáticas no gene do *GR* foram descritas em tumores ectópicos secretores de ACTH, na síndrome de Nelson e em um paciente com histórico de resistência generalizada aos GCs com subsequente desenvolvimento de doença de Cushing. Porém, o estudo da região codificadora e das regiões de transição intron/exon do gene *GR* em 18 corticotrofinomas não identificou nenhuma mutação (68).

Até o presente momento, não há evidências de mutações nos receptores de glicocorticóides (68), de ACTH (69), de CRH (70) e de vasopressina (71) na doença de Cushing humana, enquanto que mutações da proteína G são incomuns (72).

A pesquisa de mutações somáticas nos genes *Gsa*, *K-ras*, *N-ras*, *H-ras* e *GR* em corticotrofinomas de cães teve resultado negativo (73). Recentemente, Teshima e col (2009) demonstraram aumento da expressão da POMC, do CRHR1 e da 11 beta hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 e diminuição da expressão da 11 beta hidroxisteróide desidrogenase tipo 1 em corticotrofinomas de cães, sugerindo uma alteração nos receptores dos glicocorticóides (34). No entanto, estas investigações ainda não elucidaram as bases moleculares dos corticotrofinomas em cães.

A literatura é repleta de relatos heterogêneos de fatores de crescimento e oncogenes específicos super ou subexpressos em adenomas, porém eles não necessariamente representam a causa direta do tumor, especialmente, porque muitos desses fatores são induzidos após a transformação celular e devem ser considerados mais um epifenômeno do que fator etiológico (61).

Um grande número de fatores de transcrição implicados na organogênese da glândula hipofisária tem sido estudado em diferentes adenomas hipofisários em humanos, comparativamente a tecidos hipofisários normais, visando o entendimento molecular de neoplasias endócrinas. Trata-se de genes *homeobox* expressos em fases diferentes da embriogênese hipofisária e de grande importância para a transcrição de genes codificadores das linhagens celulares específicas da hipófise (14, 16). Mutações inativadoras desses fatores de transcrição como o *PROP1*, *PIT1* e *TBX19*, estão associadas a deficiências hormonais e à hipoplasia de células hipofisárias em humanos (61).

Considerando-se a importância do *Tbx19* no desenvolvimento dos corticotrofos e do *Crhr1* na regulação da secreção do ACTH, é possível que alterações nesses genes possam contribuir para a patogênese do hipercortisolismo ACTH-dependente em cães.

1.7 *Tbx19*

1.7.1 Estrutura gênica e proteica do *Tbx19*

O *Tbx19*, também denominado de *Tpit*, pertence à família de fatores de transcrição T-box e foi inicialmente identificado apenas como fator adjuvante transcricional do fator homeobox *Pit1*. No entanto, sua importância é singular, visto ser um fator de transcrição corticotrofo-restrito necessário para a expressão do gene da proopiomelanocortina (*POMC*) em células indiferenciadas da hipófise. A expressão do gene *Tbx19* é responsável pelo início da diferenciação das duas linhagens que expressam a *POMC*, ou seja, os corticotrofos e os melanotrofos, e pela diferenciação terminal dos corticotrofos da hipófise (16, 74).

Nos corticotrofos, a transcrição do gene da *POMC* envolve a interação física entre o PITX1 e o NEURO D1. O *Neuro D1* é expresso apenas nas células corticotróficas e deve contribuir de alguma forma para a diferenciação desta linhagem, mas nem *Neuro D1* nem *Pitx1* são suficientes para que ocorra a expressão específica de melanotrofos e corticotrofos a partir da *POMC* (16).

Os genes pertencentes à família T-box caracterizam-se por apresentar um domínio de ligação ao DNA altamente conservado, denominado de T-box, descoberto, inicialmente, na sequência do locus T do camundongo ou o chamado gene *Brachyury* e estão presentes em todos os vertebrados. Várias doenças têm sido associadas a mutações nesses genes no homem (75, 76).

O *Tbx19* canino localiza-se no cromossomo 7 e apresenta 2 transcritos: um contendo 8 exons, 1338 pb, codificando uma proteína de 445 aa; e outro com 6 exons (com excisão dos exons 1 e 6), 945 pb e proteína de 314 aa. A proteína ativa TBX19 origina-se da transcrição de 8 exons (Figura 5) e é 93,5% idêntica a do homem e 90,8% idêntica a dos murinos (77).

Figura 5: Gene *Tbx19* canino com 8 exons e a região T-box (área de domínio de ligação ao DNA). As linhas tracejadas indicam local de "splicing"

1.7.2 Papel do *Tbx19* nos corticotrofos

Na hipófise murina adulta, o *Tbx19* está expresso somente nos corticotrofos no lobo anterior e nos melanotrofos no lobo intermediário,

sendo que sua expressão não foi detectada em neurônios hipotalâmicos positivos para POMC (16). Estudo imunohistoquímico de hipófise de camundongos *knock out* para o gene *Tbx19* (*Tbx19* $-/-$) revelou ausência de células que expressam a POMC, hipoplasia do lobo intermediário, deficiência de ACTH e de corticosteróides, além de adrenais hipoplásicas (78). Já camundongos *knock out* para o gene *Neuro D1* (*Neuro D1* $-/-$) apresentaram apenas um atraso na diferenciação dos corticotrofos, refletindo sua importância maior na diferenciação inicial desta linhagem celular e a do *Tbx19* na diferenciação terminal (79).

Mutações no gene *TBX19* em seres humanos foram, primeiramente, descritas por Lamolet e cols (2001) (16). Nos últimos anos, foram relatadas várias mutações com perda de função deste gene, associadas a pacientes com deficiência isolada de ACTH neonatal, por transmissão recessiva, confirmando o seu papel fundamental na diferenciação terminal corticotrófica e regulação da POMC em seres humanos (16, 19, 74, 80-82).

Em experimentos de ganho de função em camundongos transgênicos, a expressão ectópica de *Tbx19* na porção rostral da hipófise embrionária precoce foi capaz de ativar a transcrição do gene da *POMC*, promovendo sua expressão em células hipofisárias não diferenciadas (16). Um estudo em adenomas corticotróficos humanos revelou 85% de positividade na expressão de *TBX19* nos tumores examinados por imunohistoquímica e hibridização *in situ* (15). Dentre os quatro casos com expressão ausente de *TBX19*, um era um macroadenoma corticotrófico silencioso e os outros três remanescentes, eram tecidos parcialmente

necrosados e fibrosados. A expressão de *TBX19* foi da mesma forma, identificada nas células corticotróficas normais. A hibridização *in situ* demonstrou que os transcritos de *TBX19* foram coexpressos com o RNAm de POMC tanto em adenomas corticotróficos quanto em corticotrofos normais, não sendo identificado, porém, em outros tipos de adenomas hipofisários (15).

Em estudos de expressão gênica, através de PCR em tempo real, verificou-se que, embora *TBX19* esteja presente em todas as células corticotróficas hipofisárias, sua expressão é mais abundante em células adenomatosas secretoras de ACTH de pacientes humanos com doença de Cushing, reforçando sua importância na transcrição da POMC e na diferenciação dos corticotrofos nos tumores hipofisários secretores de ACTH (83).

Considerando o envolvimento do gene *TBX19* na tumorigênese hipofisária em humanos, nos propusemos a investigar o seu papel na etiologia do hipercortisolismo ACTH-dependente em cães.

1.8 *Crhr1*

1.8.1 CRH e o eixo corticotrófico

O CRH, produzido e secretado pelos neurônios do núcleo paraventricular hipotalâmico, é o maior regulador do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. É secretado no sistema portal hipofisário em resposta a vários estímulos, incluindo o estresse. Quando alcança a célula

corticotrófica, o CRH se liga ao seu receptor de membrana, CRHR1, que apresenta sete domínios transmembrana acoplado à proteína G, levando à ativação da via proteína kinase A (PKA). Nos corticotrofos, a sinalização do CRH leva à estimulação da liberação do ACTH e ativação da transcrição do gene codificador da POMC. A liberação de ACTH, por sua vez, estimula a síntese e secreção de cortisol na zona fasciculada das adrenais. O cortisol exerce efeito inibitório tanto sobre o ACTH hipofisário quanto sobre o CRH hipotalâmico em situações normais. Este *feedback* negativo é uma característica crucial no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Em vigência de um tumor corticotrófico, no qual a secreção de ACTH ocorre de forma autônoma e em concentrações mais elevadas, o *feedback* negativo hipofisário é parcialmente perdido, havendo resistência à ação dos glicocorticóides (18, 19).

1.8.2 Estrutura gênica e proteica do *Crhr1*

O CRH canino apresenta uma grande homologia ao CRH humano e age através de sua ligação a receptores específicos da superfície membranal das células alvo (84). O CRH e seus três peptídeos relacionados (urocortina 1, 2, 3) desempenham papéis importantes na coordenação de respostas endócrinas, autonômicas, metabólicas e comportamentais ao estresse. O CRH e seus receptores estão, ainda, implicados na modulação de funções adicionais do SNC, como apetite, audição, neurogênese e atua periféricamente no sistema endócrino, cardiovascular, reprodutivo, gastrointestinal e imunológico (85).

Há 2 tipos de genes que codificam os receptores de CRH, *Crhr1* e *Crhr2*, compostos por 415 e 411 aa, respectivamente, na espécie canina (86). O *CRHR1* foi identificado e clonado, primeiramente, a partir de um adenoma hipofisário humano secretor de ACTH (87).

Os receptores de CRH pertencem à grande família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR), subfamília B1, cujos membros incluem receptores para o GHRH, secretina, PTH, calcitonina, glucagon, peptídeos glucagon-like e peptídeo intestinal vasoativo. Caracterizam-se pela presença de 7 hélices hidrofóbicas inseridas na membrana plasmática, sendo 3 alças intracelulares, 3 alças extracelulares, um domínio extracelular aminoterminal (N-domínio) e um domínio intracelular carboxiterminal. O domínio intracelular é acoplado à proteína Gs (proteína G estimulatória) que, após a ligação do hormônio à porção extracelular, estimula a adenilciclase e a produção de AMPc, resultando em modificações agudas pós-traducionais das proteínas alvo através da PKA (proteína quinase A), como também no núcleo, regulando a transcrição gênica através das proteínas ativadoras de elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), iniciando uma cascata de eventos intracelulares que levam aos efeitos biológicos específicos da corticotrofina (Figura 6) (88-90). Por sua vez, o domínio extracelular aminoterminal deste receptor é responsável pela grande afinidade e seletividade de ligação ao hormônio correspondente (91-95).

Figura 6: Receptor acoplado à proteína G. A dissociação da subunidade $G_{\alpha s}$ do complexo da proteína G leva à ativação da adenilciclase com produção de AMP cíclico.

O CRHR1 está amplamente expresso na hipófise anterior, no córtex cerebral, cerebelo, amígdala, hipocampo, bulbo olfatório, bem como em tecidos periféricos como testículos, ovários, placenta, tecido adiposo, adrenais, baço, pele e coração (85, 96). O CRHR1, presente na hipófise anterior tem alta afinidade pelo seu ligante CRH. O CRHR2 apresenta especificidade para urocortina 2 e 3, e ambos os receptores se ligam à urocortina 1 de maneira similar (97). Uma identidade superior a 70% é identificada entre os genes *Crhr1* e *Crhr2*, porém são expressos de forma distinta no SNC e nos tecidos periféricos, sugerindo funções fisiológicas diversificadas. As sequências mais conservadas entre *Crhr1* e *Crhr2* localizam-se nas alças intracelulares (relacionadas ao sítio de ligação à proteína G estimulatória) e nas sete hélices transmembranas, estando a

menor homologia localizada no domínio aminoterminal, região esta responsável pela ligação ao agonista, visto a diferença entre os ligantes (85, 98, 99).

O *Crhr1* foi clonado em inúmeras espécies de vertebrados, de anfíbios aos humanos, sendo a homologia entre as espécies superior a 80% (100). O *Crhr1* canino localiza-se no cromossomo 9 e apresenta 2 transcritos: um contendo 13 exons, 1248 pb, codificando uma proteína de 415 aa; e outro com 14 exons, 1347 pb e 448 aa. Em seres humanos, são inúmeras as isoformas deste gene, mas a maioria delas apresenta deficiência na ligação ou sinalização do receptor (100, 101).

A proteína ativa do CRHR1 origina-se da transcrição de 13 exons presentes na sequência gênica do *Crhr1* (Figura 7). Assim como o homem, o cão também apresenta uma isoforma com 14 exons, denominada de CRHR1 β , cuja ligação e afinidade ao agonista é bastante reduzida. A excisão do exon 6 permite a expressão de CRHR1 α , que representa a principal variante funcional do receptor que medeia, primariamente, as ações do CRH. Dessa forma, o CRHR1 β pode ser considerado um pró-hormônio, sem importância fisiológica (85, 87, 92, 101). Ratos e camundongos não expressam o *Crhr1* β (102).

Figura 7: Representação esquemática do gene *Crhr1* canino, com suas duas isoformas: a forma ativa *Crhr1α* com 13 exons (A) e a forma inativa *Crhr1β* com 14 exons (B).

1.8.3 Papel do *Crhr1* na hiperfunção corticotrófica

Estudos clínicos demonstraram que a maioria dos adenomas hipofisários tem receptores para hormônios hipotalâmicos e respondem ao seu estímulo. Pacientes com produção ectópica de GRH ou CRH por tumores extra-hipotalâmicos desenvolvem hiperplasia da célula hipofisária-alvo (103). Camundongos transgênicos que hiperexpressam o GHRH humano desenvolveram hiperplasia somatotrófica aos 8 meses de idade com progressão para adenoma secretor de GH aos 12 meses (104). Ratos tratados com doses elevadas de CRH por um período prolongado desenvolveram hiperplasia corticotrófica sem evidências de formação de tumor, mas este experimento teve um período de tempo limitado pelos efeitos adversos do excesso de corticosteróides. As evidências apontadas

por este estudo e outros (105, 106) sugerem que uma estimulação hormonal hipotalâmica crônica e excessiva pode resultar em aumento da secreção hormonal hipofisária bem como multiplicação celular, favorecendo um mecanismo de promoção do tumor, implicado na transformação neoplásica na adenohipófise (103).

Outros modelos animais sustentam o conceito de que a estimulação crônica com CRH contribui para o desenvolvimento de tumores hipofisários subsequentes a uma hiperplasia (57). A presença de CRHR1 nos corticotrofinomas levantou a hipótese de que receptores hormonais desempenhassem algum papel na tumorigênese hipofisária. Pacientes humanos com doença de Cushing exibem hipersecreção de ACTH em resposta aos testes estimulatórios dinâmicos com CRH, mesmo sendo a secreção de ACTH autônoma e mesmo estando os níveis portais basais de CRH suprimidos nessas condições (103, 107-109). Em concordância a esses dados clínicos, observa-se, também *in vitro*, um incremento dos níveis de ACTH de maneira dose-dependente pelas células corticotróficas adenomatosas frente ao estímulo com CRH (110, 111).

Em cães com hipercortisolismo ACTH-dependente, os achados são um pouco controversos, havendo estudos que apresentam hipo, normo ou hipersecreção de ACTH em resposta ao estímulo com CRH. Mas, de forma geral, pode-se observar persistência da responsividade ao CRH com elevação das concentrações de ACTH (112-115). Assim como em seres humanos, as concentrações de CRH no fluido cerebrospinal de cães com

doença de Cushing encontram-se suprimidas, secundariamente ao hipercortisolismo típico da doença (116).

Dois estudos não identificaram efeito estimulatório do CRH sobre a proliferação dos corticotrofos e a secreção de ACTH *in vitro* em células corticotróficas normais e adenomatosas tanto de cães quanto de pacientes humanos com doença de Cushing (117, 118). No entanto, vários outros estudos demonstraram que as células adenomatosas corticotróficas não só respondem ao CRH de forma dose-dependente, mas também que o estímulo crônico com CRH não dessensibiliza os seus receptores (110, 111).

A pesquisa de mutações somáticas ativadoras na região codificadora do *CRHR1* em células corticotróficas adenomatosas humanas *in vitro* (hCA) foi negativa, porém foi observada uma hiperexpressão de *CRHR1* (70, 119).

A demonstração da presença de RNAm de CRH em células corticotróficas adenomatosas e a correlação linear entre os níveis de RNAm do CRH e a progressão tumoral sugere que uma provável estimulação autócrina e/ou parácrina mediada pelo CRH esteja envolvida no potencial proliferativo do tumor, uma vez que os níveis de RNAm do CRH em macroadenomas foram significativamente maiores do que em microadenomas (120). Esse achado é suportado por diversos trabalhos que relatam a secreção ectópica excessiva de CRH por carcinomas prostáticos e gangliocitomas, causando hiperplasia corticotrófica secundária (121, 122). Outros experimentos demonstraram a capacidade mitogênica do CRH sobre as células corticotróficas de ratos (106).

A expressão de CRHR1 permanece elevada em células corticotróficas adenomatosas humanas, mesmo quando submetidas à exposição crônica ao CRH, inexistindo uma dessensibilização nos corticotrofos com relação à liberação de ACTH. Por outro lado, a estimulação crônica com CRH em células corticotróficas normais tanto de ratos (123-126) como de seres humanos (96) causa *down-regulation* e dessensibilização do CRHR1, sugerindo um provável distúrbio regulatório nos receptores das células neoplásicas (127).

Outro estudo demonstrou que as alterações relacionadas à expressão do CRHR1 se devem a distúrbios tanto numéricos quanto de distribuição, de modo que os sítios de ligação ao CRHR1 foram identificados, exclusivamente, na periferia celular em adenomas corticotróficos, enquanto que em células normais, sua distribuição foi intracelular, sugerindo um distúrbio do processo de internalização, associado a um defeito de processamento do CRHR1 nos corticotrofos adenomatosos (128). Dessa forma, os níveis elevados de transcritos de CRHR1 descritos no trabalho anterior poderiam representar um mecanismo contra-regulatório para compensar este defeito (127).

Constata-se, assim, que ambos os genes *Tbx19* e *Crhr1* desempenham papéis importantes no desenvolvimento e na regulação dos corticotrofos. Na medicina veterinária, a determinação da etiologia molecular da doença de Cushing é bastante promissora, visto a alta prevalência desta doença na espécie canina, principalmente na raça poodle com relatos de casos familiares e com acometimento de animais cada vez mais jovens.

2 Objetivos

Pesquisar a presença de mutações germinativas na região codificadora dos genes *Tbx19* e *Crhr1* em cães da raça poodle com diagnóstico de hipercortisolismo ACTH-dependente.

3 Métodos

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP/aprovação nº 755/05) e o consentimento informado formal foi concedido pelos proprietários dos animais.

3.2 Casuística

3.2.1 Grupo de animais doentes

Foram incluídos no estudo 50 animais (33 fêmeas e 17 machos) da espécie canina da raça poodle procedentes de 46 famílias com diagnóstico de hipercortisolismo ACTH-dependente, com idade média de $8,7 \pm 2,8$ anos (variação de 1,5 a 14 anos), atendidos no Serviço de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Universidade Guarulhos (UnG). O diagnóstico de hipercortisolismo ACTH-dependente foi embasado na anamnese, exame físico, exames laboratoriais, testes hormonais, ultrassonografia abdominal, utilizando-se os seguintes critérios de seleção:

1. Cães apresentando pelo menos uma das seguintes alterações clínicas: polifagia, poliúria, polidipsia, obesidade visceral, distensão abdominal, taquipnéia, fraqueza muscular, alopecia não pruriginosa, atrofia cutânea, telangiectasia

2. Cães apresentando pelo menos uma das seguintes alterações laboratoriais: elevação da fosfatase alcalina, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperglicemia, densidade urinária inferior a 1,025
3. Supressão inadequada das concentrações séricas de cortisol (cortisol $\geq 1,4 \mu\text{g/dL}$) após 8 horas da administração endovenosa de 0,01 mg/kg de dexametasona
4. Níveis plasmáticos de ACTH superiores a 17 pg/mL para confirmação de hipercortisolismo ACTH-dependente
5. Imagem ultrassonográfica das glândulas adrenais apresentando formas preservadas, simetria, contornos regulares, ecotextura e ausência de nodulações e calcificações

A identificação e as características laboratoriais dos 50 cães com hipercortisolismo ACTH-dependente encontram-se na Tabela 1.

3.2.2 Grupo controle

Para o rastreamento de variantes alélicas identificadas nos genes *Tbx19* e *Crhr1*, foram estudados 50 cães controles (32 fêmeas e 18 machos) da raça poodle, com idade superior a 6 anos (média de 9,4 anos e variação de 6 a 16 anos), hígidos, não obesos e sem endocrinopatias pela avaliação clínica.

Tabela 1: Características clínicas, laboratoriais e hormonais dos 50 cães da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente

Animais	Idade (anos)	Sexo	Peso (kg)	ACTH basal (pg/mL)	Cortisol pós-dexa (ug/dL)	Glicemia jejum (mg/dL)	ALT (UI/L)	FA (UI/L)	Colesterol (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)	Densidade Urinária	Espessura da adrenal por US	
												AD (cm)	AE (cm)
1	8	F	9,2	56	10,2	138	298	1164	223	73	1,034	0,52	0,57
2	1,5	F	7,3	25	4,6	81	420	295	463	172	1,026	0,50	0,50
3	4	M	8,5	32	17,0	82	570	234	439	161	1,024	0,54	0,60
4	10	M	9,2	55	3,3	69	76	93	548	224	1,016	0,96	0,84
5	7	F	9,7	37	2,8	76	310	465	522	286	1,020	0,63	0,69
6	12	F	8,2	23	4,5	349	316	547	310	456	1,024	0,73	0,73
7	7	F	7,5	20	2,5	253	136	264	238	233	1,032	0,73	0,86
8	11	M	6,4	25	13,1	92	349	317	414	112	1,012	0,78	0,73
9	9	M	7,8	56	3,4	71	95	625	332	211	1,011	0,67	0,80
10	8	M	9,0	113	2,9	97	390	1599	468	212	1,01	0,68	0,82
11	10	F	6,2	45	3,8	85	509	254	314	125	1,012	0,67	0,69
12	9	M	6,7	22	2,7	77	195	1074	715	175	1,004	0,72	0,62
13	6	F	10,0	24	3,2	74	283	568	699	102	1,032	0,5	0,58
14	4	F	6,9	85	8,7	105	128	808	480	77	1,012	0,79	0,77
15	9	F	6,3	32	1,5	64	53	51	176	52	1,006	0,94	0,84
16	5	F	9,8	25	2,5	84	47	59	176	76	1,012	0,7	0,73
17	11	M	9,7	22	3,7	91	62	87	355	127	1,044	1,04	0,95
18	6	F	7,3	35	6,3	99	34	183	152	50	1,011	0,79	0,82
19	11	M	6,6	25	3,2	70	300	424	100	35	1,016	0,66	0,63
20	11	M	6,1	52	8,0	139	133	611	297	73	1,036	0,72	0,73
21	11	F	7,9	32	1,5	77	229	278	226	113	1,048	0,78	0,75

continua...

Tabela 1: Características clínicas, laboratoriais e hormonais dos 50 cães da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente (continuação)

Animais	Idade (anos)	Sexo	Peso (kg)	ACTH basal (pg/mL)	Cortisol pós-dexa (ug/dL)	Glicemia jejum (mg/dL)	ALT (UI/L)	FA (UI/L)	Colesterol (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)	Densidade Urinária	Espessura da adrenal por US	
												AD (cm)	AE (cm)
22	11	F	7,4	30	5,7	70	129	99	471	202	1,008	1,02	0,92
23	5	F	9,5	38	6,9	91	745	745	386	113	1,018	0,80	0,90
24	11	F	8,0	172	3,3	90	58	80	493	124	1,022	0,75	0,81
25	3	F	6,8	42	3,6	63	104	71	214	86	1,025	0,55	0,57
26	9	F	8,7	113	4,7	90	62	209	450	190	1,018	0,62	0,68
27	8	F	7,5	25	8,2	75	41	106	117	59	1,018	0,67	0,76
28	10	F	8,3	30	2,5	70	120	78	431	179	1,007	0,90	0,8
29	8	M	9,5	48	7,5	85	78	211	392	233	1,008	NV	0,66
30	8	F	6,8	128	9,6	77	271	379	233	156	1,018	NV	0,65
31	5	F	10,0	23	4,2	113	214	232	557	186	1,02	0,73	0,83
32	10	F	9,3	22	10,0	68	237	1359	408	260	1,02	NV	0,78
33	6	F	7,0	25	4,1	69	60	118	496	76	1,02	0,70	0,69
34	10	M	8,7	38	1,6	74	467	1250	309	158	1,006	0,94	0,85
35	9	F	8,2	42	7,1	140	379	929	673	99	1,008	NV	0,74
36	14	F	8,3	20	9,8	79	106	1551	374	381	1,022	0,53	0,58
37	10	F	5,8	25	4,0	89	35	303	516	111	1,012	0,84	0,91
38	9	F	5,4	34	5,5	91	90	183	475	156	1,018	0,80	0,84
39	14	M	6,9	20	3,6	60	364	223	609	387	1,022	0,84	0,78
40	8	M	7,2	41	9,0	91	116	794	283	184	1,018	0,65	0,75
41	12	F	9,0	32	7,0	74	26	169	356	292	1,02	0,87	0,88
42	14	F	7,2	25	2,0	73	103	342	353	73	1,02	0,65	0,65

continua...

Tabela 1: Características clínicas, laboratoriais e hormonais dos 50 cães da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente (conclusão)

Animais	Idade (anos)	Sexo	Peso (kg)	ACTH basal	Cortisol pós-dexa	Glicemia jejum	ALT	FA	Colesterol	Triglicérides	Densidade	Espessura da adrenal por US	
				(pg/mL)	(ug/dL)	(mg/dL)	(UI/L)	(UI/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	Urinária	AD (cm)	AE (cm)
43	9	M	7,5	45	7,8	92	152	850	424	209	1,014	1,02	0,92
44	6	M	6,3	49	4,2	65	165	300	486	159	1,008	0,60	0,65
45	9	M	7,0	45	10,3	89	286	619	450	191	1,008	0,68	0,70
46	7	F	8,3	32	3,4	62	284	355	175	166	1,008	0,75	0,70
47	10	M	6,4	35	6,6	94	115	438	611	390	1,028	0,65	0,68
48	9	F	9,3	37	3,7	95	268	528	723	156	1,024	0,6	0,59
49	10	F	5,2	30	2,3	95	87	135	377	273	1,018	NV	0,65
50	11	F	7,0	45	4,3	73	86	317	311	61	1,026	0,78	0,80
Média	8,7		7,8	43	5,4	93,4	204	459	396	169	1,018	0,73	0,74
DP	2,8		1,3	30	3,3	47,5	158	401	156	96	0,01	0,14	0,11
VR				20-60	< 1,0	80-110	07 a 92	10-160	100-270	100-200	1,025-1,045	0,3-0,7	

Legenda: F = fêmea, M = macho, US = ultrassom; AD = adrenal direita; AE = adrenal esquerda; DP = desvio padrão; VR = valor de referência, NV = não visualizada

Os casos 1, 2 e 3; 28 e 29; 36 e 37 são casos familiares

3.2.3 Casos familiares

Dentre os 50 cães com hipercortisolismo ACTH-dependente estudados, 3 casos apresentavam doença familiar (Tabela 2, Figuras 8 e 9)

Tabela 2: Hipercortisolismo ACTH-dependente familiar

Família	Caso	Idade (anos)	Sexo
1	Propósito: caso 2	1,5	F
	Afetados: caso 3	4,0	M
	caso 1	8,0	F
2	Índice: caso 28 (mãe)	10	F
	Afetado: caso 29 (filho)	8	M
3	Índice: caso 36 (mãe)	14	F
	Afetado: caso 37 (filha)	10	F

Figura 8: Heredograma das três famílias de cães da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente familiar. Os indivíduos com a doença são representados com símbolos cheios (● e ■). O caso índice encontra-se indicado por uma flecha.

Figura 9: Três cães com hipercortisolismo ACTH-dependente da família 1

3.3 Avaliação laboratorial

Os exames laboratoriais realizados foram: alanina aminotransferase (método cinético; aparelho Celm SB 190, Lagoa Santa, MG), fosfatase alcalina (método cinético; aparelho: Celm SB 190, Lagoa Santa, MG), colesterol (método ponto final; kit Labtest, Lagoa Santa, MG), triglicérides (método ponto final; kit Labtest, Lagoa Santa, MG), glicemia (glicosímetro portátil, Advantage, Roche, Brasil) e exame de urina tipo I (densidade pelo método de refratometria e aspectos químicos através de tira de bioquímica seca – COMBUR 10 TEST UX, Roche, Brasil). Todos os exames laboratoriais citados acima foram realizados, previamente à instituição de

qualquer terapia, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Guarulhos.

A dosagem sérica de cortisol foi realizada em laboratório veterinário particular, através do método de radioimunoensaio (Coat-A-Count® Cortisol; Siemens, Los Angeles, EUA), que é considerado um método tradicional e adequado para a avaliação da função adrenal, alcançando 100% de sensibilidade e especificidade (129). O coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram inferiores a 5,1% e 6,4%, respectivamente.

A determinação de ACTH plasmático foi efetuada no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM/42 - do HCFMUSP, utilizando-se um ensaio imunoradiométrico (ELSA-ACTH, CIS Bio international, Gif Sur Yvette, França). Optamos por um kit para dosagem de ACTH humano por falta de kit específico para cães e devido à alta homologia da molécula de ACTH entre estas duas espécies (18). O coeficiente de variação intra-ensaio foi inferior a 6,1% e o coeficiente de variação inter-ensaio inferior a 5,3%. As amostras de plasma foram colhidas em tubos plásticos contendo 1 mg/mL de EDTA, sendo imediatamente refrigeradas após a coleta e transportadas ao laboratório em isopor com cubos de gelo num prazo máximo de 1 h, para posterior centrifugação em centrífuga refrigerada a 1600 g por 15 min a 4°C e estoque da amostra a -70°C até a realização do ensaio.

3.4 Avaliação por imagem

A ultrassonografia abdominal foi realizada em todos os cães com teste de depressão positivo para hipercortisolismo endógeno e sempre pelo

mesmo observador, utilizando-se o aparelho Pie Medical 485 Anser (Philipsweg, Holanda) e transdutor convexo de 5,0 e 7,5 MHz, no Serviço de Imagem da Universidade Guarulhos.

3.5 Avaliação molecular

3.5.1 Extração de DNA

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico de 50 cães com hipercortisolismo ACTH-dependente e de 50 cães controles, machos e fêmeas, utilizando-se protocolos padronizados pela técnica *salting out*.

Cinco mililitros de sangue venoso foram colhidos em tubo contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos, utilizando-se um volume de solução de lise (NH_4Cl 114 mM, NH_4HCO_3 1 mM) duas vezes maior que o volume de sangue e incubado a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 4000 g (Sorvall, RT7, Alemanha), sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento de lise de glóbulos vermelhos foi repetido uma vez.

O botão de células brancas foi suspenso em 9 mL de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10mM pH 8,0) com 180 µl de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 150 µl de proteinase K na concentração de 10 mg/mL (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA), e incubado a 37°C por 18 horas. Após

este período, 3,6 mL de solução saturada de NaCl a 6 M foi adicionada, seguido de agitação do conjunto vigorosamente durante 15 segundos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 4000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA foi precipitado acrescentando-se dois volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se, cuidadosamente, por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo. Em seguida, lavado com etanol a 70% durante 5 minutos, repetindo-se a operação por mais três vezes. Finalmente, o DNA foi lavado em etanol absoluto, seguido de secagem por centrifugação a vácuo (Eppendorf, Concentrator 5301, Alemanha). Após o procedimento, o DNA foi ressuspense em tampão TE a 10:0,1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0) (130).

A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em um espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 µg/mL). Foi estabelecido que a relação acima de 1,75 entre as leituras em 260 e 280 nm seria a ideal para a caracterização da pureza do material. As amostras foram armazenadas a 4°C até sua utilização.

3.5.2 Amplificação de DNA genômico por reação de polimerização em cadeia (PCR)

O DNA genômico foi amplificado através da reação de polimerização em cadeia (PCR), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para os genes *Tbx19* e *Crhr1*. Em um volume final de 50 µl, foram utilizados 100 ng de DNA genômico, 200 µM de cada

desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 0,5 mM (20 pmol) de cada *primer*, 1,5 U da enzima “GoTaq” DNA polimerase (5 U/μL) (Promega Corporation, WI, EUA), além do tampão da reação fornecido pelo fabricante contendo 1,5 mM de MgCl₂. Para a amplificação dos exons do gene *Crhr1* foi necessária a adição de 0,4 M de betaína.

3.5.3 Oligonucleotídeos para amplificação dos genes *Tbx19* e *Crhr1*

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para amplicação dos 8 exons do gene *Tbx19* (Tabela 3) e dos 13 exons do gene *Crhr1* (Tabela 4) foram desenhados através do programa *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi_bin/primer3/primer3_www.cgi) e testados quanto à sua viabilidade através do programa *Amplify*.

Tabela 3: *Primers* intrônicos *forward* (F) e *reverse* (R) para amplificação do gene *Tbx19* canino e tamanho do fragmento

<i>Primer</i>	Sequência	Fragmento (pb)
1F	5' GAACGCTTCTCCGCCAAGTTT 3'	341
1R	5' CCTCTGAGTGAAGAAGGGCA 3'	
2F	5' GCCACCCAGGGATCCCCT 3'	392
2R	5' GGAGAAGAGGCCCGGTGAGGA 3'	
3F	5' TGGTTATCACCCCTGCTACCA 3'	232
3R	5' GTTTACACACACGCAGCCAC 3'	
4F	5' ACTAATGCTTCTTGTCTTTG 3'	122
4R	5' AGAAGATTTTACTGACATT 3'	
5F	5'CAGGAGCAATAAGTGCAAGCCA 3'	370
5R	5' TGTGGCCCACCCAGTGTTC A 3'	
6F	5' CGACATTCCGTGTCGTTTACA 3'	328
6R	5' TACACCCAAGGGTTTAATTA 3'	
7F	5' TGTGGCATATGGTTGACATGGTA 3'	329
7R	5' ACCAATGAGGAAGTTGCTGGA 3'	
8F	5' GTCAGGACAGCTATTGTACGCT 3'	515
8R	5' CCTGCCCTAGGATCCTGCCT 3'	

Os exons 6, 7, 8 bem como os exons 9, 10, 11 e 12 do *Crhr1* foram amplificados em um mesmo fragmento. Os protocolos de amplificação de ambos os genes foram desenvolvidos durante o estudo.

Tabela 4: *Primers* intrônicos *forward* (F) e *reverse* (R) para amplificação do *Crhr1* canino e tamanho do fragmento

Primer	Sequência	Fragmento (pb)
1F	5' CTGAGTCAGGAGACGGCGCA 3'	422
1R	5' TCATTGTGGCGAAGCTGCTG 3'	
2F	5' TTGGGATCCTAGGCTTGATG 3'	413
2R	5' GCAAGATTCCAGGTCTCCAG 3'	
3F	5' GAACGAATGCTGGATCCCTA 3'	456
3R	5' TCTCGTGGATAACAACCAC 3'	
4F	5' AGATGGACGAACCAATGGAC 3'	581
4R	5' AGTCTCCTTCCCACCCTGTC 3'	
5F	5' GGGAAGGGGAATAACTACCG 3'	401
5R	5' GTCTCTTGGAACCTCTGGCA 3'	
6-8F	5' TCCTCAGTTTCCCCATCCATA 3'	993
6-8R	5' TGAGGTACAGGCTCTCAGCC 3'	
9-12F	5' GAGGCATTGTGTTGGGATCT 3'	1235
9-12R	5' CAGGTCCCTAATGAGGATGC 3'	
13F	5' ACGTGTA CTGCTGCTTGTGG 3'	419
13R	5' GAGAGCAGCCATAGTCTGGG 3'	

3.5.4 Protocolos para amplificação dos genes *Tbx19* e *Crhr1*

Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador (9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes exceto o DNA) para confirmação da especificidade da reação. As amostras amplificadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 1,5% preparado com TAE 1X (Tris 0,004 M; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,001 M pH 8,0) e corado com brometo de etídio (Sigma, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 0,5 µg/mL de gel e observadas em um transiluminador com luz ultravioleta, sendo então fotografadas com filme Polaroid (667-3 ¼ X 4

¼) ou através de sistema digital para aquisição de imagem (Zoom Browser EX; UltraCAM digital imaging) para confirmação da amplificação do fragmento de interesse.

O programa de amplificação para os fragmentos do *Tbx19* (anexo 1) consistiu de: 1 ciclo de 5 minutos a 98°C, seguidos por 40 ciclos de 45 segundos a 98°C, 30 segundos a 50-54°C (temperatura de hibridação variável de acordo com os exons), 45 segundos a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

O programa de amplificação para os fragmentos do gene *Crhr1* (anexo 1) consistiu de: um ciclo de 5 minutos a 98°C, seguidos por 40 ciclos de 45 segundos a 98°C, 30 segundos a 50-58°C (temperatura de hibridação variável de acordo com os exons), 45 segundos a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O tempo de extensão para os fragmentos maiores, exons 6-8 (993 pb) e 9-12 (1235 pb), foi de 3 minutos a 72°C.

3.5.5 Sequenciamento automático

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi determinada a partir da comparação da intensidade de sinal emitido pelo fragmento amplificado com a intensidade emitida pelos fragmentos de um marcador de peso molecular conhecido em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à uma reação de purificação enzimática com 2 µL da enzima “ExoSAP-IT” para 5 µL de produto de PCR contendo as enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* e exonuclease I (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido)

durante 15 minutos a uma temperatura de 37° C, seguida por 15 minutos a 80 °C. Após a purificação, o material foi submetido a uma reação de seqüenciamento seguindo as instruções do “kit” “ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Sete ng de produto de PCR purificado, 2 µL de “BigDye Terminator”, 10,5 µL de tampão de seqüenciamento e 5 pmol de um dos “primers” específicos para cada exon foram submetidos ao protocolo de seqüenciamento que consistiu em 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por cinco segundos e 60 °C por quatro minutos, realizado em um termociclador (9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O produto da reação de seqüenciamento foi precipitado segundo o protocolo isopropanol/etanol. As amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços (“MicroAmp optical 96-well Reaction Plate”, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e cerca de 80 µL de isopropanol 75% foram acrescentados a cada poço. A placa permaneceu em repouso por 10 minutos e, então, foi centrifugada a 3700 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa e cerca de 150 µL de etanol 70% foi adicionado a cada poço. A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 3700 g. O sobrenadante foi descartado e a placa permaneceu invertida em temperatura ambiente, protegida da luz, até que o álcool evaporasse totalmente.

Foram acrescentados 15 µL de formamida (“Formamida Hi-Di”, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) a cada poço e esse material foi submetido a uma eletroforese capilar no seqüenciador automático “ABI

Prism 3100 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise foi realizada pelo programa "Sequencing Analysis 3.7" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados do Ensembl (<http://www.ensembl.org>) sob a identificação ENSCAFT00000024243 para o gene *Tbx19* e ENSCAFT00000021555 para o gene *Crhr1* e do Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sob a identificação ID 449029 e NM 001005758-1 para o gene e o RNAm do *Tbx19*, respectivamente; e ID 610380 e XP 852965.1 para *Crhr1*.

3.6 Análise das variantes alélicas dos genes *Tbx19* e *Crhr1* por enzimas de restrição

3.6.1 Análise da variante alélica do gene *Tbx19*

A variante alélica encontrada no exon 7 (codon 343) do *Tbx19* cria um sítio de clivagem para a enzima *Msp I* e, por este motivo, foi utilizada a técnica de digestão enzimática para determinar a frequência deste achado no grupo controle a partir de DNA genômico.

A reação de digestão enzimática foi realizada em um volume final de 20 ul utilizando-se 10 ul do produto de PCR do exon 7, 1 ul da enzima *Msp I*, 2 ul do tampão específico para a enzima durante 4h a 37°C. Um controle de reação, ao qual não foi adicionada a enzima, e um controle com a variante alélica foram utilizados no experimento. Os produtos da digestão foram

submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 4% em tampão TAE e os fragmentos de DNA foram visualizados em luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio, utilizando-se o marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A sequência que compreendia a variante alélica apresentava dois fragmentos de 82 e 247 pb, enquanto a sequência normal apresentava um fragmento de 329 pb.

3.6.2 Análise da variante alélica do gene *Crhr1*

A variante alélica encontrada no exon 4 (códon 97) do gene *Crhr1* elimina o sítio de clivagem para a enzima *Bst* I. Para determinar a frequência deste achado no grupo controle, foi utilizada a técnica de digestão enzimática, utilizando-se a mesma metodologia anteriormente descrita. A digestão com a enzima *Bst* I origina dois fragmentos de 449 e 132 pb no alelo selvagem e um fragmento de 581 pb no alelo com a variante.

3.7 Efeito da variante alélica na estrutura tridimensional da proteína

Para melhor compreensão do efeito funcional da variante alélica identificada no códon 97 do *Crhr1* foi realizado o estudo da estrutura tridimensional da proteína normal e mutada. A mutação foi modelada usando como estrutura-molde a estrutura cristalográfica com PDB id 3EHT, que inclui o domínio extracelular do CRHR1 em complexo com o peptídeo CRH (95). Para avaliar se a mutação interfere na ligação do receptor com o ligante, foi realizada a otimização da estrutura por minimização de energia,

seguida da estimativa da energia de ligação da superfície de contato entre o hormônio e o receptor.

Para o cálculo da energia de ligação entre o receptor e o ligante foi utilizado o programa Yasara (131) e uma fórmula que utiliza o campo de força YAMBER3, representada por:

$$\Delta (\Delta G_{\text{lig}}) = \Delta G_{\text{compl}} - (\Delta G_{\text{rec}} + \Delta G_{\text{lig}})$$

$\Delta (\Delta G_{\text{lig}})$ = energia livre de ligação na superfície de contato entre o receptor e o ligante;

- ΔG_{compl} = energia livre do complexo receptor-ligante;
- ΔG_{rec} = energia livre do receptor;

ΔG_{lig} = energia livre do ligante.

4 Resultados

4.1 Caracterização dos animais

Durante a primeira avaliação clínica no Serviço de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Universidade Guarulhos, os 50 cães com hipercortisolismo ACTH-dependente (33 F/17 M), representando 46 casos-índice, apresentavam idade cronológica média de $8,7 \pm 2,8$ anos e sintomatologia clínica compatível com a doença. A triagem laboratorial inicial consistiu de dosagem sérica de colesterol, triglicérides, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, glicemia, densidade urinária, teste de depressão com dexametasona, além de ultrassonografia abdominal.

A hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia foram constatadas em 78% ($n = 39/50$) e 74% ($n = 37/50$) dos casos, respectivamente, sendo os valores médios de colesterol de 396 ± 156 mg/dL e de triglicérides de 169 ± 96 mg/dL. Níveis sanguíneos elevados de fosfatase alcalina foram observados em 78% ($n = 39/50$) dos casos (valor médio de 459 ± 401 UI/L) e de alanina aminotransferase em 70% ($n = 35/50$), sendo o valor médio de 204 ± 158 UI/L. A densidade urinária abaixo dos valores de referência (1025 - 1045) foi identificada em 80% dos animais ($n = 40/50$), dos quais 20% ($n = 10/50$) apresentaram hipostenúria (densidade ≤ 1008). A hiperglicemia foi identificada em seis animais (12%), sendo dois deles diabéticos insulino-dependentes.

Todos os animais apresentaram ausência de supressão dos níveis séricos de cortisol 8 horas após a aplicação endovenosa de dexametasona na dose de 0,01 mg/kg, sendo o valor médio de $5,4 \pm 3,3$ µg/dL, confirmando o quadro de hipercortisolismo endógeno. A constatação do hipercortisolismo

ACTH-dependente se deu através de concentrações plasmáticas basais de ACTH superiores a 17 pg/mL na totalidade dos casos, com média de 42 ± 30 pg/mL.

A ultrassonografia abdominal revelou glândulas adrenais simétricas, com contornos regulares, ecotextura homogênea, ausência de nodulações e calcificações. Os valores médios da espessura do polo caudal das glândulas adrenais direita e esquerda foram de $0,73 \pm 0,14$ e $0,74 \pm 0,11$ cm, respectivamente. Cães com hipercortisolismo ACTH-dependente têm em média valores de espessura de polo caudal superiores ou iguais a 0,7 cm (51).

4.2 Gene *Tbx19*

Uma nova variação alélica na região codificadora do gene *Tbx19* foi identificada em dois animais não aparentados com hipercortisolismo ACTH-dependente, casos 6 e 11, dentre os 50 cães estudados. Caracteriza-se por uma troca de adenina por guanina (A → G) no codon 343 em heterozigose com troca de aminoácido (p. S343G) (Figura 10).

Figura 10: Eletroferograma mostrando a substituição de uma adenina por guanina (A → G) em heterozigose no exon 7 do gene *Tbx19* com troca de aminoácido (p.S343G) em dois cães não aparentados com hipercortisolismo ACTH-dependente.

Essa troca de serina (AGC) por glicina (GGC) resulta em modificação nas propriedades físico-químicas do aminoácido, já que a serina é um aminoácido hidrofílico (polar) e a glicina hidrofóbico (apolar). Entretanto, esta região está situada fora da área de domínio de ligação ao DNA, T-box, que compreende desde o final do exon 1 até o início do exon 5 (Figura 11). Além disso, foi constatado que a serina na posição 343 não é conservada entre as diversas espécies (Figura 12).

Figura 11: Localização da região T-box do gene *Tbx19* e da variante alélica p.S343G no exon 7

Canis lupus familiaris	RNHSPSVNLISSNNLQVFSGPDSWTSLSSTPHTSILSVPHTS	SGPINPGPSP	359
Homo sapiens	RNHSPSVNLISSNNLQVFSGPDSWTSLSSTPHASILSVPHTN	NGPINPGPSP	359
Mus musculus	RNHSPSVNLISSNNLQVFSGPDSWTSLSSTPHASILSVPHSN	NGPINPGPSP	357
Bos taurus	RNHSPSVNLISSNNLQVFSGADNWTLSSTPHASILSVPHTS	SGPVNPGPS	358
Gallus gallus	RNHSPTVNFESSNNLQVFSGHDSWTLPSPPHANLLSVPHTK	GATSPGPS	327

Figura 12: Comparação das sequências peptídicas do gene *Tbx19* entre diferentes espécies.

Para avaliar a importância dessa alteração, estudamos 100 alelos normais através da técnica de digestão enzimática utilizando-se a enzima *Msp I*, sendo a mesma alteração encontrada em heterozigose em 2 animais (Figura 13). A variante p.S343G resultou em uma frequência alélica de 2% ($n=2/100$) e frequência genotípica de 4% ($n = 2/50$) em ambos os grupos (Tabela 5).

Tabela 5: Frequência alélica e genotípica da variante alélica p.S343G em 50 cães com hipercortisolismo ACTH-dependente (HAD) e 50 cães normais

Fenótipo	Frequência alélica		Frequência genotípica		
	A	G	AA	AG	GG
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
HAD	98 (98)	2 (2)	48 (96)	2 (4)	0
Controles	98 (98)	2 (2)	48 (96)	2 (4)	0

Figura 13: Digestão enzimática do fragmento contendo o polimorfismo S343G com a enzima *MSP I* em 2 cães controle (A) e em 2 cães não aparentados com hipercortisolismo ACTH-dependente (B).

Outras variações alélicas intrônicas, ainda não descritas na literatura, foram encontradas ao longo do gene *Tbx19* e estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6: Variantes alélicas identificadas no *Tbx19* e suas respectivas frequências em 50 cães com hipercortisolismo ACTH-dependente

Exon / Intron	Variante alélica	Frequência populacional
		n (%)
Intron 6	IVS 6-28 t > c heterozigose	1 (2)
	IVS 6-29 t > c homozigose	4 (8)
Intron 6	IVS 6-29 t > c heterozigose	16 (32)
	IVS 6-52 c > t homozigose	1 (2)
Intron 6	IVS 6-52 c > t heterozigose	14 (28)
Intron 7	IVS 7-50 c > t homozigose	15 (30)
	IVS 7-50 c > t heterozigose	12 (24)
Exon 7	S343G heterozigose	2 (4)

As alterações intrônicas identificadas em nossa casuística foram avaliadas através do programa *NetGene2* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>) e não alteram o reconhecimento do sítio do acceptor constitutivo do gene *Tbx19*.

4.3 Gene *Crhr1*

Na análise do seqüenciamento do *Crhr1* canino, foram encontradas duas variações alélicas, uma de localização exônica e uma intrônica (Tabela 8).

Uma nova alteração exônica em heterozigose no exon 4 do *Crhr1*, causando a troca de uma guanina por adenina (G → A) no codon 97 com consequente troca de valina por metionina (p. V97M), foi identificada em um animal (caso 43) com hipercortisolismo ACTH-dependente (Figura 14). Embora tanto a valina (GTG) quanto a metionina (ATG) sejam aminoácidos apolares, a Val97 é altamente conservada entre as diferentes espécies (Figura 15).

Além disto, esta troca ocorreu na porção aminoterminal do domínio extracelular do receptor *Crhr1*, região esta de alta afinidade pelo ligante (94, 95).

Figura 14: Sequência selvagem do exon 4 do gene *Crhr1* de um cão controle (A) e substituição G>A em heterozigose com troca de aminoácido (p.V97M) em um cão com hipercortisolismo ACTH-dependente (B).

Canis lupus familiaris	YFYGVRYNTTNGYRECLANGSWAARVNYSECQEILSGEKKSKVHYHVAV 120
Equus caballus	YFYGVRYNTTNGYRECLANGSWAARVNYSECQEILTEEEKSKVHYHVAV 120
Pan troglodytes	FFYGVRYNTTNGYRECLANGSWAARVNYSECQEILNEEEKSKVHYHVAV 120
Macaca mulatta	FFYGVRYNTTNGYRECLANGSWAARVNYSECQEILNEEEKSKVHYHVAV 120
Homo sapiens	FFYGVRYNTTNGYRECLANGSWAARVNYSECQEILNEEEKSKVHYHVAV 120
Bos taurus	FFYGVRYNTTNGYRECLANGTWAARVNYSECQEILSEEKSKVHYHIAV 120
Mus musculus	FFYGVRYNTTNGYRECLANGSWAARVNYSECQEILNEEEKSKAHYIYIAV 120
Rattus norvegicus	FFYGVRYNTTNGYRECLANGSWAARVNYSECQEILNEEEKSKVHYHVAV 120
Ovis Áries	FFYGVRYNTTSNGYRVCLANGTWAARVNHSECQEILSEGEKSKAHYHIAV 120
Gallus gallus	FFYGVRYNTTNGYRECLANGSWAARVNYSQCQEILSEEKSKLHYHIAV 120

Figura 15: Alinhamento das sequências peptídicas do gene *Crhr1* entre as diferentes espécies, mostrando que o aminoácido valina na posição 97 é bem conservado

A variante alélica p.V97M não foi encontrada em 100 alelos de cães da raça poodle do grupo controle, assim como no filho normal do animal portador desta variante, analisados pela técnica de digestão enzimática com a enzima *Bst* I (Figura 16).

Figura 16: Digestão enzimática do fragmento contendo a variação alélica p.V97M com a enzima *Bst* I em 50 cães controle e no animal com hipercortisolismo ACTH-dependente portador da mutação (M)

4.3.1 Descrição do animal com a variante alélica p.V97M

O animal portador (caso 43) da variante alélica p.V97M foi avaliado aos 9 anos de idade, com história clínica sugestiva de hipercortisolismo há pelo menos 12 meses. O animal apresentava sintomatologia clínica e fenótipo clássicos da doença de Cushing canina, como poliúria, polidipsia, polifagia, fraqueza muscular, marcante distensão abdominal secundária à adiposidade visceral e hepatomegalia, atrofia cutânea e telangectasia (Figuras 17 A e B), o que ressalta a cronicidade e evolução progressiva da doença. Segundo o proprietário, as alterações clínicas que o fizeram procurar o veterinário foram o aumento do volume e da frequência urinária, perda excessiva de pêlos, distensão abdominal e cansaço fácil. O apetite, embora voraz, não o alarmou, pois segundo ele, “o animal sempre se alimentou bem”.

Os exames laboratoriais realizados para investigação da síndrome de Cushing revelaram níveis elevados de colesterol (424 mg/dL), triglicérides (209 mg/dL), FA (850 UI/L), ALT (152 UI/L) e densidade urinária diminuída (1,014). Foi, então, realizado o teste de depressão com dexametasona, estando os seus níveis séricos de cortisol 8 horas após a aplicação endovenosa de 0,01 mg/kg de dexametasona elevados (7,8 µg/dL) e compatíveis com hipercortisolismo endógeno. Posteriormente, foi mensurada a concentração plasmática basal de ACTH, cujo resultado (45 pg/mL) confirmou o hipercortisolismo ACTH-dependente. Aliado a isso, o exame ultrassonográfico abdominal revelou aumento da espessura das glândulas adrenais direita (1,0 cm) e esquerda (0,92 cm), ambas de contornos

regulares, ecotextura homogênea e ecogenicidade reduzida, além de hepatomegalia com hiperecogenicidade generalizada.

O tratamento com mitotano foi iniciado 20 dias após a data da primeira consulta, quando todos os exames já haviam sido concluídos, na dose de 25 mg/kg a cada 12 horas durante sete dias (fase de indução) e, posteriormente, 25 mg/kg duas vezes por semana (fase de manutenção). O animal apresentou melhora parcial, sendo necessários ajustes na posologia do mitotano diversas vezes durante os 10 meses subsequentes de terapia. Já aos 10 anos de idade, ele apresentou uma recidiva do quadro, sendo necessária uma nova indução com o mitotano, porém o proprietário por motivos financeiros e pessoais optou por interromper o tratamento. Através de contato telefônico, tive a informação de que o animal veio a óbito após 6 meses da interrupção do tratamento com sintomas respiratórios.

A segregação familiar consistiu apenas no estudo de um dos filhos do paciente, já que seus pais e irmãos eram desconhecidos e os outros filhos haviam sido doados. O filho não é portador da variante alélica p.V97M e também não apresentava sintomas de doença de Cushing aos 5 anos de idade, mantendo-se assintomático até o presente momento aos 7 anos.

Figuras 17-A e B: Animal com hipercortisolismo ACTH-dependente, portador da variante alélica V97M, apresentando marcante distensão abdominal, obesidade visceral, alopecia, atrofia cutânea e telangectasia.

4.3.2 Análise do efeito da variante alélica p.V97M no hipercortisolismo

ACTH-dependente

A variante alélica p.V97M está situada na porção aminoterminal extracelular da proteína CRHR1, considerada o determinante primário para a ligação do receptor (94, 95). Alterações na estrutura tridimensional do domínio extracelular do CRHR1 comprometem a ativação do receptor bem como sua afinidade pelo ligante (94, 132).

O estudo da estrutura quaternária da proteína mutada e selvagem seguido da avaliação da energia de ligação da superfície de contato entre o hormônio e o receptor foram realizados para melhor compreensão do envolvimento desta variante na patogênese do hipercortisolismo ACTH-dependente. A avaliação da estrutura tridimensional do complexo demonstrou que houve um rearranjo estrutural do receptor e alteração da superfície de contato entre o receptor mutado e o ligante, comparando-se a proteína mutada e selvagem (Figura 18).

Para avaliar se a mutação interfere no modo de ligação do receptor com o seu ligante, foi realizada a otimização da estrutura por minimização de energia, seguida da estimativa da energia de ligação da superfície de contato entre o hormônio e o receptor.

A energia livre de ligação na superfície de contato entre o receptor normal e o ligante, Δ (ΔG_{lig}), foi de 1893 KJ/mol e o do receptor mutado foi de 2134 KJ/mol, representando um aumento de 17% na afinidade de ligação de CRH pelo *Crhr1*. Este incremento da energia livre de ligação entre a superfície de contato do ligante com o receptor sugere que a variante p.V97M seja uma mutação com ganho de função.

Figura 18: Rearranjo estrutural da proteína mutada (vermelho) e alteração da superfície de contato entre o receptor mutado (contendo a metionina) e o ligante, comparando-se as proteínas mutada e selvagem do *Crhr1*

Uma variação alélica intrônica, IVS 4-35 a > g, foi encontrada em 21 cães não relacionados, sendo 11 em homozigose e 10 em heterozigose (Tabela 8). Verificou-se, através do programa *NetGene 2*, que esta alteração intrônica não altera o reconhecimento do sítio do acceptor constitutivo do gene *Crhr1*. A variante alélica p.R76P, que leva à substituição de uma arginina por uma prolina no codon 76, embora já descrita como polimorfismo (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=rs24563391) não foi identificada em nossa casuística.

Tabela 7: Variantes alélicas identificadas no gene *Crhr1* e suas respectivas frequências em 50 cães com hipercortisolismo ACTH-dependente

Exon/Intron	Variante alélica	Estado da Variante Alélica	Frequência n (%)
Exon 4	V97M	Heterozigose	1 (2)
Intron 4	IVS 4 -35 a>g	Homozigose	11 (22)
	IVS 4 -35 a>g	Heterozigose	10 (20)

5 Discussão

O hipercortisolismo ACTH dependente é uma das endocrinopatias mais freqüentes da espécie canina, com apresentação clínica similar à doença humana (133). A grande incidência desta doença na espécie canina, a marcante predisposição racial e o aparecimento da doença em animais jovens e relacionados entre si, despertaram nosso interesse em pesquisar suas bases moleculares.

Selecionamos a raça poodle para estudo molecular por ser a raça mais predisposta à doença de Cushing em diversos trabalhos (18, 25, 26) e em virtude das três famílias apresentadas neste trabalho com doença familiar serem desta raça. Adicionalmente aos nossos três casos, há somente mais duas famílias com casos de doença de Cushing familiar descritos na literatura envolvendo, porém, raças não apontadas como sendo as mais predispostas para esta doença (134, 135). Na primeira delas, foram relatados sete casos de doença de Cushing em cães da raça dandie dinmont terrier, relacionados entre si, sugerindo um provável envolvimento genético na tumorigênese dos corticotrofinomas caninos (134). Já na segunda família, foram descritos 11 cães aparentados da raça dachshund de pêlo duro (135).

Um dos nossos casos familiares (caso 2) desenvolveu HAD com apenas 1 ano e 5 meses de idade. Até o presente trabalho, apenas 5 cães com HAD com menos de 2 anos de idade foram relatados (18). A grande maioria dos casos de hipercortisolismo endógeno têm idade superior a 6 anos, com média de 11 anos (18, 26, 40, 136). Da mesma forma, em nossa casuística a média de idade foi de $8,7 \pm 2,8$ anos, destacando-se sete cães (14%) com idade inferior a 6 anos.

Todos os cães com hipercortisolismo ACTH-dependente incluídos neste estudo molecular apresentaram os sintomas clínicos mais comumente associados à síndrome de Cushing, tais como polifagia, poliúria, polidipsia, abdomen abaulado, fraqueza muscular, alopecia, atrofia cutânea e telangectasia, em proporções variáveis na dependência da evolução da doença. A poliúria tende a ser um dos principais motivos que levam o proprietário a procurar o médico veterinário, sendo documentada em aproximadamente 85% dos casos. Ela decorre da interferência do cortisol sobre a secreção ou ação do hormônio antidiurético e do aumento da taxa de filtração glomerular (26).

A polifagia também está presente em mais de 90% dos cães com doença de Cushing, porém, inicialmente este achado não parece despertar tanto a atenção do proprietário, a menos que ele apresente coprofagia, apetite depravado, ingestão de corpos estranhos e ansiedade excessiva na hora de se alimentar (18).

Mais de 70% dos cães que compuseram a nossa casuística apresentaram níveis elevados de colesterol, triglicérides, FA e ALT, semelhantemente à frequência apontada em outros estudos epidemiológicos (40). Tais anormalidades bioquímicas são consideradas as mais frequentes da doença de Cushing (25).

O teste de depressão com dexametasona foi utilizado neste trabalho por ser considerado o mais sensível (95%) para o diagnóstico de hipercortisolismo ACTH-dependente (25). A constatação de níveis plasmáticos basais de ACTH superiores a 17 pg/mL (valor este determinado

pela sensibilidade do teste empregado) caracteriza um estado de hipercortisolismo ACTH-dependente. Vários kits humanos para a mensuração de ACTH podem ser empregados na espécie canina, pois apresentam uma ótima reação cruzada com o ACTH de cães (18). Os valores de referência mais confiáveis são aqueles medidos por método imunoradiométrico (IRMA), uma vez que a dosagem do ACTH por radioimunoensaio apresenta uma grande variação do coeficiente intra e interensaio, tornando os seus resultados pouco confiáveis. Os valores de referência para a espécie canina medidos por IRMA foram de 13 a 46 pg/mL em um estudo (46). A concentração endógena de ACTH é, usualmente, superior a 40 pg/mL em cães com HAD e inferior a 20 pg/mL em cães com tumor adrenal ou com síndrome de Cushing iatrogênica (25, 137). Segundo a literatura, 85 a 90% dos cães com HAD têm concentração endógena de ACTH $\geq$ 40 pg/mL (18, 26), porém esta frequência foi de apenas 36% (n = 18/50) em nossa casuística, com valores variando de 20 a 172 pg/mL. Nossos dados nos permitem modificar este conceito da literatura veterinária e nossa sugestão é que níveis mensuráveis de ACTH na presença de sintomas clínicos de síndrome de Cushing associado à depressão negativa ao teste com dexametasona sejam suficientes para o diagnóstico de HAD.

Várias modalidades de imagem podem ser empregadas para auxiliar na diferenciação do hipercortisolismo proveniente de tumor hipofisário do hipercortisolismo proveniente de tumor adrenal, como o ultrassom (US) abdominal, a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM) de crânio. A RM é considerada a técnica mais sensível para a

visualização da hipófise, sendo capaz de identificar massas hipofisárias pequenas em 50% dos cães com HAD na ausência de sintomas neurológicos. Porém, tanto a TC quanto a RM apresentam algumas limitações, tais como disponibilidade de aparelhos sofisticados, custo elevado e necessidade de anestesia geral do animal (26), razões estas pelas quais não realizamos tais procedimentos em nossa casuística. Por outro lado, o US abdominal é uma técnica simples, amplamente utilizada e bastante eficiente na identificação de massas abdominais, contribuindo para a exclusão de tumores adrenais como causa de hipercortisolismo endógeno. Rotineiramente, ambas as glândulas adrenais são visualizadas em cães com doença de Cushing, embora a glândula direita apresente topografia mais cranial e acesso mais difícil, não tendo sido visualizada em 10% da nossa casuística. Na doença de Cushing, as adrenais apresentam dimensões normais ou aumentadas, porém sua forma e contorno continuam preservados, mostrando-se homogêneas e hipoecogênicas em relação às corticais renais adjacentes. A espessura das glândulas adrenais de cães normais varia bastante conforme o peso do animal, compreendendo valores de 0,3 a 0,7 cm (47), mas, geralmente, não excede 0,6 cm em cães de pequeno porte (48) como é o caso do poodle. Alguns autores consideram adrenomegalia os valores de espessura da glândula adrenal superiores a 0,7 cm (138) e outros superiores a 0,75 cm (41). Em nossa casuística observamos espessura adrenal superior a 0,7 cm em 62% dos casos.

Apesar da sua grande morbidade e alta frequência na população canina, a patogênese e as bases moleculares da doença de Cushing permanecem indefinidas. Considerando-se a importância dos genes *Tbx19* no desenvolvimento dos corticotrofos e do *Crhr1* na regulação da secreção do ACTH, nossa hipótese é que esses genes estejam envolvidos na patogênese do hipercortisolismo ACTH-dependente em cães.

O *Tbx19* é um fator de transcrição obrigatório para a transcrição do gene da proopiomelanocortina e para a diferenciação terminal dos corticotrofos. Sua expressão é restrita às duas linhagens celulares que expressam a POMC, ou seja, os melanotrofos e os corticotrofos. Essa exclusividade levantou a hipótese de seu envolvimento na deficiência isolada de ACTH (16), bem como na secreção excessiva de ACTH nos adenomas corticotróficos. Várias mutações inativadoras no gene *TBX19* com herança autossômica recessiva foram relatadas em pacientes com deficiência neonatal e isolada de ACTH, confirmando o seu papel fundamental na diferenciação terminal dos corticotrofos e na regulação da POMC em humanos (16, 19, 74, 80-82).

No presente trabalho, investigamos a presença de mutações ativadoras germinativas no gene *Tbx19* em cães com hipercortisolismo ACTH-dependente. No entanto, não foram identificadas quaisquer mutações em nossa casuística composta por 50 cães com HAD. Entretanto, uma nova variante no gene *Tbx19*, p.S343G foi identificada em heterozigose em dois animais (4%). Essa troca de serina (AGC) por glicina (GGC) no códon 343 configura uma troca de aminoácido hidrofílico (serina) por um hidrofóbico

(glicina) e está situada fora da área de domínio de ligação ao DNA, o T-box, que compreende desde o final do exon 1 ao início do exon 5. Esta variação alélica também foi encontrada em heterozigose em dois cães do grupo controle e a frequência alélica e genotípica não foram diferentes entre os cães com HAD e controles. Além disso, a avaliação comparativa da sequência de aminoácidos do *Tbx19* mostrou que a Ser343 não é conservada entre as espécies.

As outras quatro variações alélicas encontradas no gene *Tbx19*, ainda não descritas na literatura, são de localização intrônica e não há predição de alteração do sítio de *splicing*.

Nosso trabalho, utilizando uma grande casuística composta exclusivamente de cães da raça poodle, mais predisposta a HAD, não identificou envolvimento do gene *Tbx19* na patogênese do hipercortisolismo ACTH-dependente em cães da raça poodle.

Recentemente, um estudo do gene *Tbx19* em células adenomatosas corticotróficas de 23 cães com doença de Cushing não identificou a presença de mutações somáticas (77). Esses 23 animais compunham 18 diferentes raças, sendo apenas um deles da raça poodle. Uma nova variação alélica V63M foi identificada em heterozigose na região T-box do *Tbx19*, tanto no tecido tumoral quanto no DNA genômico de um único animal da raça *bernese mountain dog*, mas que também estava presente no grupo controle da mesma raça (n = 9/24; 37,5%). Essa variação alélica, no entanto, não foi identificada em nosso grupo estudado, sugerindo que talvez seja uma particularidade da raça *bernese mountain dog*. Da mesma forma,

nenhuma mutação somática na região codificadora do gene *TBX19* foi identificada em células adenomatosas secretoras de ACTH em 8 pacientes humanos com doença de Cushing (139).

A presença de CRHR1 nos corticotrofinomas humanos levantou a hipótese de que receptores hormonais desempenhassem algum papel na tumorigênese hipofisária, promovendo uma estimulação celular prolongada, mesmo na ausência de hormônios hipotalâmicos (87, 123, 127). Tumores corticotróficos humanos e de cães hiperexpressam o *CRHR1* apesar da secreção autônoma de ACTH, além de apresentarem maior sensibilidade ao CRH (34, 70, 103).

A análise histológica de hipófises de cães com hipercortisolismo ACTH-dependente revelou adenoma hipofisário em 84% dos casos, mas também identificou casos isolados de hiperplasia corticotrófica difusa sem a constatação de tumores, sugerindo-se um distúrbio hipotalâmico com excessiva secreção de CRH e estimulação hipofisária secundária, porém tal etiologia ainda não foi documentada na medicina veterinária (140). Células hipofisárias corticotróficas residuais têm sido identificadas após a realização da hipofisectomia na espécie humana e canina, permanecendo funcionais e responsivas ao CRH, favorecendo as recidivas do quadro (141). Um estudo com seguimento de 2 anos após a realização de hipofisectomia transfenoidal em 150 cães com doença de Cushing, apontou uma frequência de recidiva de 25% dos casos, similar àquela encontrada em seres humanos, que varia de 5 a 30% (142).

No presente estudo, identificamos uma nova variante alélica na região codificadora do *Crhr1*, a p.V97M, em um cão com hipercortisolismo ACTH-dependente. Essa mutação em heterozigose está localizada no exon 4 e promoveu a troca de valina por metionina no códon 97, sendo ambos os aminoácidos hidrofóbicos.

O códon 97 situa-se na porção aminoterminal do domínio extracelular do receptor CRHR1, região esta considerada a determinante primária da ligação do receptor ao CRH (94, 95). Alterações na estrutura tridimensional do domínio extracelular do CRHR1 comprometem a ativação do receptor bem como sua afinidade pelo ligante (85, 91-95, 132).

A ligação do CRH aos sítios de ligação do CRHR1 tem sido amplamente investigada através de estudos de receptores quiméricos e apontam os resíduos 1-118 do domínio N-terminal, mais especificamente as sequências de aminoácidos 43-50 e 76-84 (em humanos) e 68-109 (em camundongos) como sendo as regiões mais importantes para a ligação de agonistas com alta afinidade ao CRHR1 (85, 93, 98, 99) (Figura 19).

Figura 19: Sequências de aminoácidos (43-50, 76-84 e 68-109) do *Crhr1* consideradas importantes para a ligação de alta afinidade ao agonista. A seta vermelha indica a localização da variante alélica p.V97M (85).

Mais recentemente, Pioszak e cols (2008) relataram a importância das interações da cadeia principal da valina, resíduo 97 (sítio da mutação V97M), com o CRH para a obtenção de alta afinidade de ligação (95). Essa interação se dá através de duas ligações de hidrogênio intermoleculares entre os átomos oxigênio e nitrogênio da amida C-terminal do ligante (CHR) e átomos nitrogênio amídico e oxigênio carbonílico da cadeia principal do receptor (resíduo Val97) (Figura 20).

Figura 20: Interações entre a cadeia principal da valina (Val97) e o ligante CHR através de duas ligações de hidrogênio intermoleculares (95)

O estudo da estrutura molecular quaternária e a otimização da proteína mutada por minimização de energia comparativamente à proteína selvagem, permitiu observarmos um rearranjo estrutural do receptor com alteração da superfície de contato entre o receptor mutado e o ligante. Adicionalmente, a constatação de valores superiores da energia de ligação da superfície de contato entre o ligante (CHR) e o receptor mutado (CRHR1m) representou um aumento de 17% na afinidade de ligação, reforçando a hipótese de uma mutação ativadora no *Crhr1* estar envolvida na patogênese do hipercortisolismo ACTH-dependente neste cão da raça poodle.

Mutações ativadoras constitutivas dos receptores acoplados à proteína G mimetizam estados de excesso de agonista, mesmo diante de

concentrações baixas do agonista e estão localizadas, usualmente, na porção transmembrana (“serpentina”) do receptor (143). A ativação constitutiva do sistema da adenilciclase resulta de mutações ativadoras da subunidade alfa da proteína G estimulatória (gsp). Mutações na gsp ocorrem em 40% dos tumores hipofisários secretores de GH (somatotrofinomas) e 10% dos tumores hipofisários não funcionantes. Sua prevalência em corticotrofinomas é baixa, sendo identificada em 9% de 32 tumores analisados (72).

Receptores da tireotrofina (TSHR) têm sido amplamente estudados como modelos de mutações ativadoras não só sediadas na porção transmembrana, mas também no seu domínio extracelular aminoterminal na região de ligação ao TSH (143). Casos de hipertireoidismo congênito não auto-imune têm sido descritos secundariamente a mutações germinativas *de novo* no domínio extracelular do TSHR (144).

Tem sido postulado que, além da influência que o domínio aminoterminal extracelular dos GPCR exerce sobre a ligação de alta afinidade do receptor pelo ligante, ele também atue como um antagonista interno, capaz de aferir propriedades agonistas ou antagonistas, dependendo se está ligado ou não ao seu ligante. De acordo com um modelo de ativação de GPCR, o receptor deve existir em duas conformações distintas: conformação silenciosa (“S”) e conformação ativa (“A”). O ligante quando acoplado ao receptor estabiliza o receptor em sua forma ativa (“A”) (143). A identificação de diferentes mutações dos receptores de tireotrofina indica que a conformação inativa do GPCR não

ligado seja estabilizada por interações entre o domínio extracelular N-terminal e as alças extracelulares. A ruptura dessas interações tridimensionais necessárias para manter o receptor silencioso ativa a porção “serpentina” do receptor, aumentando a afinidade do domínio extracelular pelo ligante, levando uma atividade constitutiva dependente do ligante (143-145).

Nossos achados sugerem que, embora infrequente, é possível que o *Crhr1* esteja envolvido na gênese dos corticotrofinomas em cães da raça poodle, uma vez que essas células tumorais mantêm sua habilidade de resposta ao CRH a níveis similares àqueles necessários para estimular corticotrofos normais (115, 146). Essa hipótese assume que o CRH estimula o crescimento dos corticotrofos, causando uma hiperplasia ou mesmo uma neoplasia após estimulação contínua e crônica, bem como a síntese e secreção de ACTH.

A manifestação tardia de HAD em nosso animal portador da mutação V97M poderia falar contra a causa genética da doença. Entretanto, outros modelos de doenças germinativas, tais como a retinite pigmentosa (147) e as neoplasias endócrinas múltiplas (148), são bem conhecidos. No presente caso, o incremento na estimulação e secreção do ACTH secundariamente ao aumento da afinidade do CRH pelo seu receptor *Crhr1* pode ter necessitado de vários anos para promover uma hiperplasia corticotrófica ou quem sabe, uma neoplasia. Infelizmente, essas questões permanecerão indefinidas, pois uma grande limitação deste trabalho foi a não realização de tomografia computadorizada do crânio para a visualização de massa

hipofisária e da necrópsia do animal para a identificação de hiperplasia ou neoplasia corticotrófica, uma vez que o achado da mutação ocorreu posteriormente ao óbito do animal.

O presente estudo trouxe novos conhecimentos sobre as bases moleculares do hipercortisolismo ACTH-dependente em cães. Em resumo, identificamos em um animal com hipercortisolismo ACTH-dependente a nova mutação p.V97M no gene *Crhr1*, que resulta no aumento da afinidade do CRHR1 ao seu ligante CRH, causando o fenótipo de Cushing. Essa mutação, embora infrequente, uma vez comprovada por estudos *in vitro*, será a primeira causa monogênica de hipercortisolismo ACTH-dependente descrita em cães.

6 Conclusões

- 1- Descrevemos o primeiro estudo de pesquisa de mutações germinativas dos genes *Tbx19* e *Crhr1* em uma ampla casuística de cães da raça poodle com hipercortisolismo ACTH-dependente, incluindo três casos familiares.
- 2- Não encontramos alterações no gene *Tbx19* que justifiquem o seu envolvimento na patogênese do hipercortisolismo ACTH-dependente em cães, porém identificamos um novo polimorfismo, o p.S343G, na região codificadora do gene *Tbx19*.
- 3- Identificamos uma nova variante alélica p.V97M no gene *Crhr1*, associada ao fenótipo de síndrome de Cushing em um cão da raça poodle que resultou em maior energia de ligação do receptor CRHR1 ao CRH, sugerindo tratar-se de uma mutação ativadora responsável pela etiologia do hipercortisolismo ACTH-dependente em um cão da raça poodle.
- 4- Não identificamos mutações nos genes *Tbx19* e *Crhr1* nos três casos familiares de hipercortisolismo ACTH-dependente em cães da raça poodle sugerindo que outros genes possam estar envolvidos na etiologia da doença

7 Anexos

Anexo A. Protocolo das condições de PCR para amplificação do gene *Tbx19*

- **Exon 1** - 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **50°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.
- **Exon 2** - 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **55°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min. Para amplificação deste exon foi utilizada Betaína, na concentração de 0,4 M.
- **Exon 3** - 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **52°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.
- **Exon 4** - 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **50°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.
- **Exon 5** - 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **53°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.
- **Exon 6** - 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **51°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.
- **Exon 7** - 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **50°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.
- **Exon 8** - 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **50°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.

Anexo B. Protocolo das condições de PCR para amplificação do gene *Crhr1*

Exon 1- 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **50°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.

Exon 2- 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **58°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.

Exon 3- 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **50°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.

Exon 4- 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **58°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.

Exon 5- 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **50°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.

Exon 678- 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **50°C** 30 segundos; 72°C 03 min) 40 ciclos; 72°C 5 min.

Exon 9-12 - 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **55°C** 30 segundos; 72°C 03 min) 40 ciclos; 72°C 5 min.

Exon 13- 98°C 05 min, (98°C 45 seg; **58°C** 30 segundos; 72°C 45 seg) 40 ciclos; 72°C 5 min.

- Foi utilizada Betaína na concentração de 0,4 M para amplificação de todos os exons deste gene.

8 Referências

1. Greco DS, Stabenfeldt GH. O sistema endócrino. In: Cunningham JG, Klein BG, editors. Tratado de Fisiologia Veterinária. 4^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier editora ltda; 2008. p. 421-9.
2. Dickson WM. Glândulas endócrinas. In: Swenson MJ, Reece WO, editors. Dukes Fisiologia dos animais domésticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p. 571-9.
3. Capen CC. Tumors of the endocrine glands. In: Meuten DJ, editor. Tumors in domestic animals. Iowa state: Blackwell; 2002. p. 607-21.
4. Faglia G. Epidemiology and pathogenesis of pituitary adenomas. *Acta Endocrinol (Copenh)*1993 Jul;129 Suppl 1:1-5.
5. de Bruin C, Meij BP, Kooistra HS, Hanson JM, Lamberts SW, Hofland LJ. Cushing's disease in dogs and humans. *Horm Res*2009 Jan;71 Suppl 1:140-3.
6. Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Genetic Regulation of Pituitary Gland Development in Human and Mouse. *Endocr Rev*2009 Oct 16.
7. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev*2007 Jul;87(3):933-63.
8. Scully KM, Rosenfeld MG. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science*2002 Mar 22;295(5563):2231-5.
9. Sheng HZ, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter SS, Mahon KA, et al. Multistep control of pituitary organogenesis. *Science*1997 Dec 5;278(5344):1809-12.
10. Sheng HZ, Westphal H. Early steps in pituitary organogenesis. *Trends Genet*1999 Jun;15(6):236-40.
11. Watkins-Chow DE, Camper SA. How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? *Trends Genet*1998 Jul;14(7):284-90.
12. Tremblay JJ, Lanctot C, Drouin J. The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol Endocrinol*1998 Mar;12(3):428-41.
13. Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, et al. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev*1998 Jun 1;12(11):1691-704.
14. Antonini SRC, M. Etiopatogênese Molecular dos Tumores Corticotróficos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*2002;46(4):361-71.
15. Vallette-Kasic S, Figarella-Branger D, Grino M, Pulichino AM, Dufour H, Grisoli F, et al. Differential regulation of proopiomelanocortin

and pituitary-restricted transcription factor (TPIT), a new marker of normal and adenomatous human corticotrophs. *J Clin Endocrinol Metab*2003 Jul;88(7):3050-6.

16. Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, et al. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell*2001 Mar 23;104(6):849-59.

17. Sasaki F, Nishioka S. Fetal development of the pituitary gland in the beagle. *Anat Rec*1998 Jun;251(2):143-51.

18. Feldman EC, Nelson RW. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 3 th ed ed. Philadelphia: W.B.Saunders Co; 2004.

19. Drouin J, Bilodeau S, Vallette S. Of old and new diseases: genetics of pituitary ACTH excess (Cushing) and deficiency. *Clin Genet*2007 Sep;72(3):175-82.

20. Halmi NS, Peterson ME, Colurso GJ, Liotta AS, Krieger DT. Pituitary intermediate lobe in dog: two cell types and high bioactive adrenocorticotropin content. *Science*1981 Jan 2;211(4477):72-4.

21. Kooistra HS, Greven SH, Mol JA, Rijnberk A. Pulsatile secretion of alpha-MSH and the differential effects of dexamethasone and haloperidol on the secretion of alpha-MSH and ACTH in dogs. *J Endocrinol*1997 Jan;152(1):113-21.

22. Zerbe CA, Clark TP, Sartin JL, Kemppainen RJ. Domperidone treatment enhances corticotropin-releasing hormone stimulated adrenocorticotrophic hormone release from the dog pituitary. *Neuroendocrinology*1993;57(2):282-8.

23. Rijnberk A, Mol JA, Kwant MM, Crougths RJ. Effects of bromocriptine on corticotrophin, melanotrophin and corticosteroid secretion in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Endocrinol*1988 Aug;118(2):271-7.

24. Gallelli MF, Cabrera Blatter MF, Castillo V. A comparative study by age and gender of the pituitary adenoma and ACTH and alpha-MSH secretion in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Res Vet Sci*2009 Aug 13.

25. Peterson ME. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *Clin Tech Small Anim Pract*2007 Feb;22(1):2-11.

26. Guptill L, Scott-Moncrieff JC, Widmer WR. Diagnosis of canine hyperadrenocorticism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*1997 Mar;27(2):215-35.

27. Greco DS, Peterson ME, Davidson AP, Feldman EC, Komurek K. Concurrent pituitary and adrenal tumors in dogs with

hyperadrenocorticism: 17 cases (1978-1995). *J Am Vet Med Assoc* 1999 May 1;214(9):1349-53.

28. Galac S, Kooistra HS, Voorhout G, van den Ingh TS, Mol JA, van den Berg G, et al. Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. *Domest Anim Endocrinol* 2005 Apr;28(3):338-48.

29. Herrtage ME. Hiperadrenocorticismo canino. In: Mooney CT, Peterson ME, editors. *Manual de endocrinologia canina e felina*. 3a ed. São Paulo: Roca; 2009. p. 181-206.

30. Capen CC. The endocrine glands. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, editors. *Pathology of domestical animals*. 4a ed. San Diego: Academic Press; 1993.

31. La Perle KMD, Capen CC. Endocrine system. In: M.D. M, Zachary JF, editors. *Pathologic basis of veterinary disease*. 4th ed. St Louis: Mosby Elsevier; 2007. p. 693-741.

32. Bailey DB, Page RL. Tumors of endocrine system. In: Withrow SJ, Vail DM, editors. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4a ed. St Louis: Saunders Elsevier; 2007. p. 583-9.

33. Mol JA, van Mansfeld AD, Kwant MM, van Wolferen M, Rothuizen J. The gene encoding proopiomelanocortin in the dog. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991;125 Suppl 1:77-83.

34. Teshima T, Hara Y, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY, Tagawa M. Expression of genes related to corticotropin production and glucocorticoid feedback in corticotroph adenomas of dogs with Cushing's disease. *Domest Anim Endocrinol* 2009 Jan;36(1):3-12.

35. Hammer GD, Fairchild-Huntress V, Low MJ. Pituitary-specific and hormonally regulated gene expression directed by the rat proopiomelanocortin promoter in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 1990 Nov;4(11):1689-97.

36. Raff H, Findling JW. A physiologic approach to diagnosis of the Cushing syndrome. *Ann Intern Med* 2003 Jun 17;138(12):980-91.

37. Chastain CBG, V.K. . *Clinical Endocrinology of Companion Animals*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1986.

38. Lindholm J, Juul S, Jorgensen JO, Astrup J, Bjerre P, Feldt-Rasmussen U, et al. Incidence and late prognosis of cushing's syndrome: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Jan;86(1):117-23.

39. Behrend EN, Kemppainen RJ, Clark TP, Salman MD, Peterson ME. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs: a survey of internists and dermatologists. *J Am Vet Med Assoc* 2002 Jun 1;220(11):1643-9.

40. Ling GV, Stabenfeldt GH, Comer KM, Gribble DH, Schechter RD. Canine hyperadrenocorticism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 117 cases. *J Am Vet Med Assoc* 1979 Jun 1;174(11):1211-5.
41. Behrend EN, Kemppainen RJ. Diagnosis of canine hyperadrenocorticism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2001 Sep;31(5):985-1003, viii.
42. Yanovski JA, Cutler GB, Jr. Glucocorticoid action and the clinical features of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994 Sep;23(3):487-509.
43. Stewart LJ. The integumentary changes of hyperadrenocorticism. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1994 Aug;9(3):123-6.
44. Nichols R. Complications and concurrent disease associated with canine hyperadrenocorticism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1997;27(2):309-20.
45. Kaplan AJ, Peterson ME, Kemppainen RJ. Effects of disease on the results of diagnostic tests for use in detecting hyperadrenocorticism in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1995 Aug 15;207(4):445-51.
46. Gould SM, Baines EA, Mannion PA, Evans H, Herrtage ME. Use of endogenous ACTH concentration and adrenal ultrasonography to distinguish the cause of canine hyperadrenocorticism. *J Small Anim Pract* 2001 Mar;42(3):113-21.
47. Barthez PY, Nyland TG, Feldman EC. Ultrasonography of the adrenal glands in the dog, cat, and ferret. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1998 Jul;28(4):869-85.
48. Grooters AM, Biller DS, Theisen SK, Miyabayashi T. Ultrasonographic characteristics of the adrenal glands in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: comparison with normal dogs. *J Vet Intern Med* 1996 May-Jun;10(3):110-5.
49. Widmer WR, Gupstill L. Imaging techniques for facilitating diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 1995 Jun 15;206(12):1857-64.
50. Barthez PY, Nyland TG, Feldman EC. Ultrasonographic evaluation of the adrenal glands in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1995 Nov 1;207(9):1180-3.
51. De Marco V. Hiperadrenocorticism e hipotireoidismo na espécie canina: avaliação da histopatologia cutânea e da ultrassonografia abdominal e cervical como metodologia diagnóstica [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2001.

52. Voorhout G. X-ray-computed tomography, nephrotomography, and ultrasonography of the adrenal glands of healthy dogs. *Am J Vet Res*1990 Apr;51(4):625-31.
53. Duesberg CA, Feldman EC, Nelson RW, Bertoy EH, Dublin AB, Reid MH. Magnetic resonance imaging for diagnosis of pituitary macrotumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc*1995 Mar 1;206(5):657-62.
54. Biller BM. Pathogenesis of pituitary Cushing's syndrome. Pituitary versus hypothalamic. *Endocrinol Metab Clin North Am*1994 Sep;23(3):547-54.
55. Castillo VA, Gallelli MF. Corticotroph adenoma in the dog: Pathogenesis and new therapeutic possibilities. *Res Vet Sci*2009 Sep 3.
56. Krieger DT. Physiopathology of Cushing's disease. *Endocr Rev*1983 Winter;4(1):22-43.
57. Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev*1998 Dec;19(6):798-827.
58. Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*1990 Dec;71(6):1427-33.
59. Schulte HM, Oldfield EH, Allolio B, Katz DA, Berkman RA, Ali IU. Clonal composition of pituitary adenomas in patients with Cushing's disease: determination by X-chromosome inactivation analysis. *J Clin Endocrinol Metab*1991 Dec;73(6):1302-8.
60. Dahia PL, Grossman AB. The molecular pathogenesis of corticotroph tumors. *Endocr Rev*1999 Apr;20(2):136-55.
61. Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*2003 Dec;112(11):1603-18.
62. Clayton RN, Pfeifer M, Atkinson AB, Belchetz P, Wass JA, Kyrodimou E, et al. Different patterns of allelic loss (loss of heterozygosity) in recurrent human pituitary tumors provide evidence for multiclonal origins. *Clin Cancer Res*2000 Oct;6(10):3973-82.
63. Clayton RN, Farrell WE. Clonality of pituitary tumours: more complicated than initially envisaged? *Brain Pathol*2001 Jul;11(3):313-27.
64. Herman-Bonert V, Fagin JA. Molecular pathogenesis of pituitary tumours. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*1995 Apr;9(2):203-23.
65. Herman V, Drazin NZ, Gonsky R, Melmed S. Molecular screening of pituitary adenomas for gene mutations and rearrangements. *J Clin Endocrinol Metab*1993 Jul;77(1):50-5.
66. Grossman AB. The molecular biology of pituitary tumors: a personal perspective. *Pituitary*2008 Dec 5.

67. Heaney AP, Melmed S. Molecular targets in pituitary tumours. *Nat Rev Cancer*2004 Apr;4(4):285-95.
68. Antonini SR, Latronico AC, Elias LL, Cukiert A, Machado HR, Liberman B, et al. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in ACTH-secreting pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*2002 Nov;57(5):657-62.
69. Morris DG, Kola B, Borboli N, Kaltsas GA, Gueorguiev M, McNicol AM, et al. Identification of adrenocorticotropin receptor messenger ribonucleic acid in the human pituitary and its loss of expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*2003 Dec;88(12):6080-7.
70. Dieterich KD, Gundelfinger ED, Ludecke DK, Lehnert H. Mutation and expression analysis of corticotropin-releasing factor 1 receptor in adrenocorticotropin-secreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*1998 Sep;83(9):3327-31.
71. Dahia PL, Ahmed-Shuaib A, Jacobs RA, Chew SL, Honegger J, Fahlbusch R, et al. Vasopressin receptor expression and mutation analysis in corticotropin-secreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab*1996 May;81(5):1768-71.
72. Williamson EA, Ince PG, Harrison D, Kendall-Taylor P, Harris PE. G-protein mutations in human pituitary adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas. *Eur J Clin Invest*1995 Feb;25(2):128-31.
73. van Wijk PA, Rijnberk A, Croughs RJ, Meij BP, van Leeuwen IS, Sprang EP, et al. Molecular screening for somatic mutations in corticotropic adenomas of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Endocrinol Invest*1997 Jan;20(1):1-7.
74. Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Couture C, Gauthier Y, Brue T, David M, et al. Human and mouse TPIT gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev*2003 Mar 15;17(6):711-6.
75. Papaioannou VE, Silver LM. The T-box gene family. *Bioessays*1998 Jan;20(1):9-19.
76. Smith J. T-box genes: what they do and how they do it. *Trends Genet*1999 Apr;15(4):154-8.
77. Hanson JM, Mol JA, Leegwater PA, Bilodeau S, Drouin J, Meij BP. Expression and mutation analysis of Tpit in the canine pituitary gland and corticotroph adenomas. *Domest Anim Endocrinol*2008 Apr;34(3):217-22.
78. Vallette-Kasic S, Pulichino AM, Gueydan M, Barlier A, David M, Malpuech G, et al. A neonatal form of isolated ACTH deficiency frequently associated with Tpit gene mutations. *Endocr Res*2004 Nov;30(4):943-4.

79. Lamolet B, Poulin G, Chu K, Guillemot F, Tsai MJ, Drouin J. Tpit-independent function of NeuroD1(BETA2) in pituitary corticotroph differentiation. *Mol Endocrinol*2004 Apr;18(4):995-1003.
80. Metherell LA, Savage MO, Dattani M, Walker J, Clayton PE, Farooqi IS, et al. TPIT mutations are associated with early-onset, but not late-onset isolated ACTH deficiency. *Eur J Endocrinol*2004 Oct;151(4):463-5.
81. Pulichino AM, Lamolet B, Vallette-Kasic S, Poulin G, Chu K, Guillemot F, et al. Tpit-/-NeuroD1-/- mice reveal novel aspects of corticotroph development. *Endocr Res*2004 Nov;30(4):551-2.
82. Atasay B, Aycan Z, Evliyaoglu O, Adiyaman P, Gunlemez A, Unal S, et al. Congenital early onset isolated adrenocorticotropin deficiency associated with a TPIT gene mutation. *J Pediatr Endocrinol Metab*2004 Jul;17(7):1017-20.
83. Tateno T, Izumiyama H, Doi M, Yoshimoto T, Shichiri M, Inoshita N, et al. Differential gene expression in ACTH -secreting and non-functioning pituitary tumors. *Eur J Endocrinol*2007 Dec;157(6):717-24.
84. Mol JA, van Wolferen M, Kwant M, Meloen R. Predicted primary and antigenic structure of canine corticotropin releasing hormone. *Neuropeptides*1994 Jul;27(1):7-13.
85. Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev*2006 May;27(3):260-86.
86. Vita N, Laurent P, Lefort S, Chalon P, Lelias JM, Kaghad M, et al. Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. *FEBS Lett*1993 Nov 29;335(1):1-5.
87. Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*1993 Oct 1;90(19):8967-71.
88. Aguilera G, Wynn PC, Harwood JP, Hauger RL, Millan MA, Grewe C, et al. Receptor-mediated actions of corticotropin-releasing factor in pituitary gland and nervous system. *Neuroendocrinology*1986;43(1):79-88.
89. Harmar AJ. Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol*2001;2(12):REVIEWS3013.
90. Gudermann T, Nurnberg B, Schultz G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-

protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med*1995 Feb;73(2):51-63.

91. Dautzenberg FM, Kilpatrick GJ, Wille S, Hauger RL. The ligand-selective domains of corticotropin-releasing factor type 1 and type 2 receptor reside in different extracellular domains: generation of chimeric receptors with a novel ligand-selective profile. *J Neurochem*1999 Aug;73(2):821-9.

92. Perrin MH, Grace CR, Riek R, Vale WW. The three-dimensional structure of the N-terminal domain of corticotropin-releasing factor receptors: sushi domains and the B1 family of G protein-coupled receptors. *Ann N Y Acad Sci*2006 Jul;1070:105-19.

93. Grace CR, Perrin MH, Gulyas J, Digruccio MR, Cantle JP, Rivier JE, et al. Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*2007 Mar 20;104(12):4858-63.

94. Perrin MH, Grace CR, Digruccio MR, Fischer WH, Maji SK, Cantle JP, et al. Distinct structural and functional roles of conserved residues in the first extracellular domain of receptors for corticotropin-releasing factor and related G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*2007 Dec 28;282(52):37529-36.

95. Pioszak AA, Parker NR, Suino-Powell K, Xu HE. Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *J Biol Chem*2008 Nov 21;283(47):32900-12.

96. Kageyama K, Suda T. Role and action in the pituitary corticotroph of corticotropin-releasing factor (CRF) in the hypothalamus. *Peptides*2009 Apr;30(4):810-6.

97. Castro MG, Morrison E, Perone MJ, Brown OA, Murray CA, Ahmed I, et al. Corticotrophin-releasing hormone receptor type 1: generation and characterization of polyclonal antipeptide antibodies and their localization in pituitary cells and cortical neurones in vitro. *J Neuroendocrinol*1996 Jul;8(7):521-31.

98. Liaw CW, Grigoriadis DE, Lovenberg TW, De Souza EB, Maki RA. Localization of ligand-binding domains of human corticotropin-releasing factor receptor: a chimeric receptor approach. *Mol Endocrinol*1997 Jun;11(7):980-5.

99. Wille S, Sydow S, Palchaudhuri MR, Spiess J, Dautzenberg FM. Identification of amino acids in the N-terminal domain of corticotropin-releasing factor receptor 1 that are important determinants of high-affinity ligand binding. *J Neurochem*1999 Jan;72(1):388-95.

100. Dautzenberg FM, Kilpatrick GJ, Hauger RL, Moreau J. Molecular biology of the CRH receptors-- in the mood. *Peptides* 2001 May;22(5):753-60.
101. Dieterich KD, Lehnert H, De Souza EB. Corticotropin-releasing factor receptors: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997;105(2):65-82.
102. Tsai-Morris CH, Buczko E, Geng Y, Gamboa-Pinto A, Dufau ML. The genomic structure of the rat corticotropin releasing factor receptor. A member of the class II G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 1996 Jun 14;271(24):14519-25.
103. Asa SL. The role of hypothalamic hormones in the pathogenesis of pituitary adenomas. *Pathol Res Pract* 1991 Jun;187(5):581-3.
104. Stefanescu L, Kovacs K, Horvath E, Asa SL, Losinski NE, Billestrup N, et al. Adenohypophysial changes in mice transgenic for human growth hormone-releasing factor: a histological, immunocytochemical, and electron microscopic investigation. *Endocrinology* 1989 Nov;125(5):2710-8.
105. Gertz BJ, Contreras LN, McComb DJ, Kovacs K, Tyrrell JB, Dallman MF. Chronic administration of corticotropin-releasing factor increases pituitary corticotroph number. *Endocrinology* 1987 Jan;120(1):381-8.
106. McNicol AM, Kubba MA, McTeague E. The mitogenic effects of corticotrophin-releasing factor on the anterior pituitary gland of the rat. *J Endocrinol* 1988 Aug;118(2):237-41.
107. Takeda R, Ito T, Kawato M, Nakabayashi H, Miyamori I, Morise T, et al. ACTH secretory responsiveness of pituitary adrenotroph cell tumor to adrenocorticotropin-releasing factor in Cushing's disease and Nelson's syndrome. *Exp Clin Endocrinol* 1986 Jun;87(1):31-7.
108. Hermus AR, Pieters GF, Pesman GJ, Smals AG, Benraad TJ, Kloppenborg PW. Responsivity of adrenocorticotropin to corticotropin-releasing hormone and lack of suppressibility by dexamethasone are related phenomena in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1986 Apr;62(4):634-9.
109. Allolio B, Gunther RW, Benker G, Reinwein D, Winkelmann W, Schulte HM. A multihormonal response to corticotropin-releasing hormone in inferior petrosal sinus blood of patients with Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1990 Nov;71(5):1195-201.
110. Grino M, Boudouresque F, Conte-Devolx B, Gunz G, Grisoli F, Oliver C, et al. In vitro corticotropin-releasing hormone (CRH) stimulation of adrenocorticotropin release from corticotroph adenoma

cells: effect of prolonged exposure to CRH and its interaction with cortisol. *J Clin Endocrinol Metab*1988 Apr;66(4):770-5.

111. Horvath SE, Asa SL, Kovacs K, Adams LA, Singer W, Smyth HS. Human pituitary corticotroph adenomas in vitro: morphologic and functional responses to corticotropin-releasing hormone and cortisol. *Neuroendocrinology*1990 Mar;51(3):241-8.

112. Orth DN, Peterson ME, Drucker WD. Plasma immunoreactive proopiomelanocortin peptides and cortisol in normal dogs and dogs with Cushing's syndrome: diurnal rhythm and responses to various stimuli. *Endocrinology*1988 Apr;122(4):1250-62.

113. Peterson ME, Kemppainen RJ, Orth DN. Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing hormone on plasma concentrations of immunoreactive adrenocorticotropin, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and cortisol in dogs with naturally acquired adrenocortical insufficiency. *Am J Vet Res*1992 Mar;53(3):421-5.

114. van Wijk PA, Rijnberk A, Croughs RJ, Wolfswinkel J, Selman PJ, Mol JA. Responsiveness to corticotropin-releasing hormone and vasopressin in canine Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*1994 Apr;130(4):410-6.

115. Meij BP, Mol JA, Bevers MM, Rijnberk A. Alterations in anterior pituitary function of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Endocrinol*1997 Sep;154(3):505-12.

116. Van Wijk PA, Rijnberk A, Croughs RJ, Voorhout G, Sprang EP, Mol JA. Corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotrophic hormone concentrations in cerebrospinal fluid of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Endocrinology*1992 Dec;131(6):2659-62.

117. van Wijk PA, Rijnberk A, Croughs RJ, Meij BP, Mol JA. Effects of corticotrophin-releasing hormone, vasopressin and insulin-like growth factor-I on proliferation of and adrenocorticotrophic hormone secretion by canine corticotrophic adenoma cells in vitro. *Eur J Endocrinol*1998 Mar;138(3):309-15.

118. Shibasaki T, Nakahara M, Shizume K, Kiyosawa Y, Suda T, Demura H, et al. Pituitary adenomas that caused Cushing's disease or Nelson's syndrome are not responsive to ovine corticotropin-releasing factor in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*1983 Feb;56(2):414-6.

119. de Keyzer Y, Rene P, Beldjord C, Lenne F, Bertagna X. Overexpression of vasopressin (V3) and corticotrophin-releasing hormone receptor genes in corticotroph tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*1998 Oct;49(4):475-82.

120. Xu B, Sano T, Yamada S, Li CC, Hirokawa M. Expression of corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human pituitary corticotroph adenomas associated with proliferative potential. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Mar;85(3):1220-5.
121. Carey RM, Varma SK, Drake CR, Jr., Thorner MO, Kovacs K, Rivier J, et al. Ectopic secretion of corticotropin-releasing factor as a cause of Cushing's syndrome. A clinical, morphologic, and biochemical study. *N Engl J Med* 1984 Jul 5;311(1):13-20.
122. Asa SL, Kovacs K, Tindall GT, Barrow DL, Horvath E, Vecsei P. Cushing's disease associated with an intrasellar gangliocytoma producing corticotrophin-releasing factor. *Ann Intern Med* 1984 Dec;101(6):789-93.
123. Suda T, Tozawa F, Dobashi I, Horiba N, Ohmori N, Yamakado M, et al. Corticotropin-releasing hormone, proopiomelanocortin, and glucocorticoid receptor gene expression in adrenocorticotropin-producing tumors in vitro. *J Clin Invest* 1993 Dec;92(6):2790-5.
124. Suda T, Tozawa F, Yamada M, Ushiyama T, Tomori N, Sumitomo T, et al. Effects of corticotropin-releasing hormone and dexamethasone on proopiomelanocortin messenger RNA level in human corticotroph adenoma cells in vitro. *J Clin Invest* 1988 Jul;82(1):110-4.
125. Mason D, Hassan A, Chacko S, Thompson P. Acute and chronic regulation of pituitary receptors for vasopressin and corticotropin releasing hormone. *Arch Physiol Biochem* 2002 Apr;110(1-2):74-89.
126. Orth DN. Corticotropin-releasing hormone in humans. *Endocr Rev* 1992 May;13(2):164-91.
127. Sakai Y, Horiba N, Sakai K, Tozawa F, Kuwayama A, Demura H, et al. Corticotropin-releasing factor up-regulates its own receptor gene expression in corticotropic adenoma cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Apr;82(4):1229-34.
128. Abs R, Smets G, Vauquelin G, Verhelst J, Mahler C, Verlooy J, et al. 125I-Tyr0-hCRH labelling characteristics of corticotropin-releasing hormone receptors: differences between normal and adenomatous corticotrophs. *Neurochem Int* 1997 Mar;30(3):291-7.
129. Jericó MM, Mendonça BB, Otsuka M, Maganin Jr A, Larsson CE. Non-radiometric immunoassays [fluoroimmunoassay (FIA) and fluorometric enzyme immunoassay (FEIA)] with radioimmunoassay (RIA) for evaluation of adrenal function in normal and hypercortisolemic dogs. *Ciência Rural* 2002;32(2):259-62.
130. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988 Feb 11;16(3):1215.

131. Krieger E, Darden T, Nabuurs SB, Finkelstein A, Vriend G. Making optimal use of empirical energy functions: force-field parameterization in crystal space. *Proteins* 2004 Dec 1;57(4):678-83.
132. Teli T, Markovic D, Hewitt ME, Levine MA, Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. Structural domains determining signalling characteristics of the CRH-receptor type 1 variant R1beta and response to PKC phosphorylation. *Cell Signal* 2008 Jan;20(1):40-9.
133. Kemppainen RJ, M EP. Animal models of Cushing's disease. *Trends Endocrinol Metab* 1994 Jan-Feb;5(1):21-8.
134. Scholten-Sloof BE, Knol BW, Rijnberk A, Mol JA, Middleton DJ, Ubbink GJ. Pituitary-dependent hyperadrenocorticism in a family of Dandie Dinmont terriers. *J Endocrinol* 1992 Dec;135(3):535-42.
135. Stritzel S, Mischke R, Philipp U, Kleinschmidt S, Wohlsein P, Stock KF, et al. [Familial canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism in wirehaired Dachshunds]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2008 Sep-Oct;121(9-10):349-58.
136. Peterson ME. Medical treatment of canine pituitary-dependent hyperadrenocorticism (Cushing's disease). *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2001 Sep;31(5):1005-14, viii.
137. Feldman EC. Distinguishing dogs with functioning adrenocortical tumors from dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 1983 Jul 15;183(2):195-200.
138. De Marco V. Hiperadrenocorticismo e hipotireoidismo na espécie canina: avaliação da histopatologia cutânea e da ultrassonografia abdominal e cervical como metodologia diagnóstica. São Paulo: Universidade de São Paulo - USP; 2001.
139. Bucciarelli LG, Pecori Giralaldi F, Cavagnini F. No mutations in TPIT, a corticotroph-specific gene, in human tumoral pituitary ACTH-secreting cells. *J Endocrinol Invest* 2005 Dec;28(11):1015-8.
140. Peterson ME, Krieger DT, Drucker WD, Halmi NS. Immunocytochemical study of the hypophysis in 25 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1982 Sep;101(1):15-24.
141. Hanson JM, Kooistra HS, Mol JA, Teske E, Meij BP. Plasma profiles of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and growth hormone in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism before and after hypophysectomy. *J Endocrinol* 2006 Sep;190(3):601-9.
142. Pereira AM, van Aken MO, van Dulken H, Schutte PJ, Biermasz NR, Smit JW, et al. Long-term predictive value of postsurgical cortisol

concentrations for cure and risk of recurrence in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 Dec;88(12):5858-64.

143. Duprez L, Parma J, Costagliola S, Hermans J, Van Sande J, Dumont JE, et al. Constitutive activation of the TSH receptor by spontaneous mutations affecting the N-terminal extracellular domain. *FEBS Lett* 1997 Jun 16;409(3):469-74.

144. Gruters A, Schoneberg T, Biebermann H, Krude H, Krohn HP, Dralle H, et al. Severe congenital hyperthyroidism caused by a germ-line neo mutation in the extracellular portion of the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 May;83(5):1431-6.

145. Zhang ML, Sugawa H, Kosugi S, Mori T. Constitutive activation of the thyrotropin receptor by deletion of a portion of the extracellular domain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 Jun 6;211(1):205-10.

146. Orth DN, DeBold CR, DeCherney GS, Jackson RV, Alexander AN, Rivier J, et al. Pituitary microadenomas causing Cushing's disease respond to corticotropin-releasing factor. *J Clin Endocrinol Metab* 1982 Nov;55(5):1017-9.

147. Wu DM, Khanna H, Atmaca-Sonmez P, Sieving PA, Branham K, Othman M, et al. Long-term follow-up of a family with dominant X-linked retinitis pigmentosa. *Eye (Lond)* 2009 Nov 6.

148. Hoff AO, Hauache OM. [Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1): clinical, biochemical and molecular diagnosis and treatment of the associated disturbances]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005 Oct;49(5):735-46.