

LUCIANA PINTO BRITO

**Papel da via Ikaros-FGFR4 na evolução pós-cirúrgica
dos pacientes com doença de Cushing**

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

Área de concentração: Endocrinologia

Orientadora: Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Brito, Luciana Pinto

Papel da via Ikaros-FGFR4 na evolução pós-cirúrgica dos pacientes com doença de Cushing / Luciana Pinto Brito. -- São Paulo, 2010.

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

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Maria Candida Barisson Villares Fragoso.

Descritores: 1.Recidiva/prevenção & controle 2.Adenoma hipofisário secretor de ACTH/etiologia 3.Expressão gênica/genética 4.Polimorfismo genético/genética 5.Receptores de fator de crescimento de fibroblastos/genética 6.Fatores de transcrição/fisiologia

USP/FM/SBD-031/10

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

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo nº 2006/52492-0).

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, Maria Helena e Irealvo, pelo amor e incentivo constante aos estudos. Ao meu esposo, Stevan, por todo o carinho, paciência e apoio nesta trajetória.

Agradecimientos

Agradeço inicialmente a Deus, por me proporcionar a realização de todos os meus sonhos, como a conclusão desta tese, que representa a superação de várias dificuldades encontradas pelo caminho e, que acredito, serviram para meu amadurecimento pessoal e profissional.

À minha orientadora, Dra Maria Candida Barrison Villares Fragoso, que me aceitou como aluna e confiou a mim este projeto. Nesses quatro anos, tivemos que abandonar o estudo inicial por microdissecção a laser após quase dois anos de trabalho, reformular a estratégia de pesquisa, procurar novos rumos, enfim reinventar. Agradeço não ter me deixado desistir do estudo dos tumores corticotróficos!

À nossa chefe, Profa. Berenice Bilharino de Mendonça por ter me proporcionado a valiosa oportunidade de fazer parte do grupo do Desenvolvimento. O seu exemplo como profissional médica e pesquisadora incentiva o crescimento de todos ao seu redor.

Ao amigo Antonio Marcondes Lerário que me ajudou em todas as etapas desta tese, por ouvir meus choramingos quando os ensaios não funcionavam, discutir novas alternativas a seguir, pelo convívio toda manhã de quarta-feira no atendimento aos pacientes do ambulatório, enfim um grande exemplo de amigo e profissional.

Aos neurocirurgiões Dr. Valter Cescato e Dr. Gilberto pelas várias tentativas de separar um “pedacinho” do tumor para o estudo da expressão.

Ao Grupo da Neuroendocrinologia: Dr. Marcello Bronstein por contribuir com a inclusão de pacientes do seu grupo neste estudo e sugestões na qualificação, Dr. Márcio Machado pela ajuda com o levantamento de dados

dos pacientes, e a Dra. Daniela Romanholi que ajudou na coleta dos tumores corticotróficos e também sofreu com escassez e raridade das amostras.

À Ericka Trarbach pela relevante contribuição na revisão do trabalho e ajuda na bancada.

Aos Prof. Dr. Alexander Jorge e Prof. Dr. Ivo Arnhold pelas preciosas discussões estatísticas que foram importantes para a posterior análise dos dados obtidos.

À Profa. Dra. Ana Claudia Latronico pelas sugestões sempre oportunas durante o desenvolvimento do projeto e na banca de qualificação, assim como Dr. Carlos Longui que contribuiu na qualificação com seus conhecimentos e sugestões.

Aos amigos Madson e Carolina Cani, pelas discussões sobre o PCR em tempo real, genes endógenos, acho que “fosforilamos” bastante sobre o assunto, mas nos divertimos bastante também.

Às amigas Everlayne e Letícia pelo convívio e pela ajuda com o inglês.

Aos recém-chegados à sala do ambulatório: Lorena Lima e Guilherme Alencar que em pouco tempo tornaram-se bons amigos.

Às funcionárias do LIM-42 Miriam, Cidinha, Cris e Fran pela organização do laboratório, compra dos materiais, separação das alíquotas de DNA, ajuda na utilização dos aparelhos. Sem vocês nosso trabalho seria dobrado.

Às secretárias Nilda, Cris e Ana pela ajuda com as papeladas.

Aos professores Dr. Teiichi Oikawa e Dr. Felício Soares que durante o curso de Medicina em Belém me apresentaram à Endocrinologia e me despertaram a vontade de seguir a carreira acadêmica.

Aos meus pais, pelo constante incentivo aos estudos e pelo apoio às escolhas que faço, proporcionando sempre a segurança que preciso para seguir em frente.

À minha irmã Verena e meu cunhado Reinaldo pelo apoio na transição para São Paulo.

Ao meu esposo Stevan, que nesses quatro anos foi um companheiro maravilhoso. Agradeço os gestos de carinho quando percebia o meu cansaço, não me deixando desanimar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todos os pacientes que aceitaram participar desta pesquisa e que contribuem para o nosso aprendizado.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de anexos

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1 Formação e Desenvolvimento Hipofisário.....	2
1.2 Tumores hipofisários.....	3
1.3 Síndrome de Cushing	5
1.3.1 Diagnóstico etiológico da síndrome de Cushing	6
1.3.2 Definição e tratamento da doença de Cushing	7
1.4 Tumorigênese hipofisária	10
1.4.1 Clonalidade dos tumores hipofisários produtores de ACTH....	10
1.4.2 Alterações genéticas nos corticotropinomas	11
1.5 Os Fatores de Crescimento de Fibroblastos e seus receptores 15	
1.5.1 O papel dos FGFs e FGFRs na hipófise	18
1.5.2 Polimorfismo G388R no gene <i>FGFR4</i> e tumorigênese.....	23
1.6 Expressão do <i>FGFR4</i> e os fatores de transcrição Ikaros.....	25
1.7 Ikaros 6 e o fator anti-apoptótico BCL-X_L	28
2. Objetivos.....	30
3. Métodos	32
3.1 Casuística	33
3.2 PCR em tempo real	35
3.2.1 Amostras tumorais	35
3.2.2 Extração de RNA	35

3.2.3	Avaliação da qualidade/quantificação do RNA e síntese do cDNA.....	36
3.2.4	PCR para os fatores de transcrição <i>T-pit</i> e <i>Pit-1</i> : avaliação de contaminação dos fragmentos tumorais com tecido normal	39
3.2.5	Sistema Taqman	41
3.2.6	Quantificação Relativa	43
3.2.7	Avaliação da estabilidade dos genes endógenos	44
3.3	Avaliação do polimorfismo G388R do <i>FGFR4</i>.....	46
3.3.1	Extração de DNA	47
3.3.2	PCR e digestão enzimática.....	48
3.4	Resumo da estratégia de estudo.....	50
3.5	Análise estatística.....	51
4.	Resultados.....	53
4.1	Caracterização dos pacientes.....	54
4.2	Expressão gênica por PCR em tempo real:.....	55
4.2.1	Curvas de eficiência dos genes alvo e endógeno.....	55
4.2.2	Genes endógenos mais estáveis nos corticotropinomas:	56
4.2.3	Expressão do <i>Bcl-X_L</i> nos corticotropinomas	58
4.2.4	Expressão dos fatores de transcrição <i>Ikaros</i> nos corticotropinomas.....	59
4.2.5	Expressão do gene <i>FGFR4</i> nos corticotropinomas.....	60
4.3	Associação do polimorfismo G388R e de variáveis clínico-patológicas com a evolução pós-operatória dos pacientes com doença de Cushing.....	63
5.	Discussão.....	69
6.	Conclusões.....	81
7.	Anexos.....	83
8.	Referências.....	88

Lista de abreviaturas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AKT	Serina/tirosina quinase
B2M	Beta-2-microglobulina
B-actina	Beta-actina
BMP	Proteína morfogênica óssea
CRH	Hormônio liberador da corticotrofina
CSPIs	Cateterismo dos seios petrosos inferiores
Ct	Número do “ciclo treshold”
CYC	ciclofilina
e cols.	e colaboradores
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGFR	Receptor dos fatores de crescimento de fibroblastos
FSH	Hormônio folículo estimulante
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfatase-desidrogenase
GH	Hormônio do crescimento
HPRT	Hipoxantina-ribosil-transferase
IH	Imunohistoquímica
Ik	Ikaros
LH	Hormônio luteinizante
MAPK	Proteína quinase ras/mitogen ativada
MG	Média geométrica
Mín-màx	Valor mínimo – Valor máximo
NCAM	Moléculas de adesão celular neural
NEM1	NEM1 – Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pdt- FGFR4	Isoforma do FGFR4-derivada de tumor hipofisário
PGK1	Fosfoglicerato quinase 1
PI3K	Quinase 3 fosfatidilinositol quinase
Pit1	Fator de transcrição positivo pituitário específico 1

POMC	Pró-ópio-melanocortina
PPAR γ	Receptor gama de proliferação ativada do peroxissomo
PRL	Prolactina
RIN	Número de integridade do RNA
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RM	Ressonância magnética
RT-PCR	Transcriptase reversa PCR
SF1	Fator esteroideogênico 1
shh	Sonic Hedgehog
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> enzima polimerase
TBP	TATA-box binding protein
Tpit	Fator T Box relacionado à Brachyury (T)
TSH	Hormônio tirotrófico
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family

Lista de figuras

Figura 1.	Modelo de desenvolvimento e diferenciação das células adenohipofisárias humanas	3
Figura 2.	Vias de sinalização ativadas pelos receptores dos fatores de crescimento de fibroblastos.....	17
Figura 3.	Gene <i>FGFR4</i> e estrutura protéica.....	19
Figura 4.	Modelo de interação do FGFR4/N-caderina.....	22
Figura 5.	Ilustração das isoformas do <i>Ikaros</i>	26
Figura 6.	Avaliação da integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1% com visualização das bandas 28S e 18S.....	37
Figura 7.	Exemplos da avaliação da integridade do RNA dos tumores corticotróficos gerados pelo Agilent Bioanalyzer 2100.....	38
Figura 8.	Eletroforese em gel de agarose 1% para visualização dos produtos de PCR do <i>T-pit</i> , <i>Pit-1</i> e <i>β-actina</i>	41
Figura 9.	Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos da digestão enzimática de PCR do exon 9 do gene <i>FGFR4</i> ..	50
Figura 10.	Fluxograma esquematizando a estratégia de estudo utilizada.....	51
Figura 11.	Exemplo de curva padrão obtida a partir de reações em <i>singleplex</i>	56
Figura 12.	Exemplo de curva de eficiência entre os genes alvo e endógeno.....	56
Figura 13.	Análise da estabilidade dos genes endógenos pelo geNorm em corticotropinomas.....	57
Figura 14.	Determinação do número ótimo de genes endógenos para normalização dos corticotropinomas.....	57
Figura 15.	Valores de expressão do <i>Bcl-X_L</i> com diferentes estratégias de normalização.....	59

Figura 16.	Expressão do <i>FGFR4</i> no tecido tumoral hipofisário dos pacientes com ou sem remissão pós-operatória da doença de Cushing.....	62
Figura 17.	Expressão do <i>FGFR4</i> nos grupos de pacientes com doença de Cushing homozigotos ou não-homozigotos para o alelo glicina.....	62
Figura 18.	Curva de sobrevida de Kaplan-Meier em pacientes em remissão da doença de Cushing homozigotos ou não-homozigotos para o alelo glicina.....	67

Lista de tabelas

Tabela 1.	Tipo tumoral, síndrome clínica e incidência dos tumores adenohipofisários.....	4
Tabela 2.	Seqüência dos nucleotídeos utilizados na detecção da expressão do <i>T-pit</i> , <i>Pit-1</i> e <i>β-actina</i>	39
Tabela 3.	Características dos genes alvo e endógeno estudados por PCR em tempo real.....	42
Tabela 4.	Comparação entre os grupos com e sem elevação da expressão do <i>FGFR4</i>	61
Tabela 5.	Frequência dos genótipos do polimorfismo G388R em controles, pacientes e o descrito na literatura.....	63
Tabela 6.	Características dos pacientes com doença de Cushing homozigotos (Gly/Gly) ou não-homozigotos para o alelo glicina (Gly/Arg e Arg/Arg).....	64
Tabela 7.	Comparação das diferentes variáveis entre pacientes com doença de Cushing com e sem remissão pós-operatória.....	65
Tabela 8.	Comparação das diferentes variáveis entre pacientes que permaneceram em remissão e aqueles que recidivaram da doença de Cushing.....	66
Tabela 9.	Avaliação do risco de recidiva da doença de Cushing.....	68

Lista de anexos

Anexo A. Polimorfismo G388R e evolução dos diversos tipos de câncer, relação com níveis de expressão do <i>FGFR4</i> e achados de cultura celular.....	84
Anexo B. Características clínicas, hormonais e histopatológicas dos 20 pacientes com tumores produtores de ACTH selecionados para o estudo de expressão por PCR em tempo real.....	86

Resumo

Brito LP. *Papel da via Ikaros-FGFR4 na evolução pós-cirúrgica dos pacientes com doença de Cushing*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 102p.

Introdução: Os mecanismos envolvidos na patogênese molecular dos tumores hipofisários corticotróficos são complexos, heterogêneos e permanecem na maioria dos casos desconhecidos. Alterações da expressão de componentes da via Ikaros (Ik), tais como do receptor 4 dos fatores de crescimento de fibroblastos (*FGFR4*) têm sido detectadas em tumores hipofisários, inclusive nos corticotropinomas. O desbalanço entre as isoformas longas e curtas do *Ikaros* resulta em um início de transcrição alternativa do *FGFR4*, codificando uma isoforma truncada do gene (*pdt-FGFR4*) que foi associada a tumores hipofisários maiores e mais invasivos. A isoforma curta *Ik6* promove a expressão do fator anti-apoptótico *Bcl-X_L* *in vitro*, um efeito independente da interação com as isoformas longas. Além disso, um polimorfismo do *FGFR4*, com substituição da glicina por arginina no códon 388 (G388R), tem sido associado à evolução desfavorável em vários tipos tumorais humanos. **Objetivos:** Analisar a expressão do *Bcl-X_L*, das isoformas do *Ikaros* (Ik1+Ik2/Ik total) e do *FGFR4* em corticotropinomas humanos. Avaliar a frequência dos genótipos do códon 388 do *FGFR4* nos pacientes com doença de Cushing e sua associação com a evolução pós-operatória após a primeira cirurgia transesfenoidal. **Métodos:** Noventa e sete pacientes com diagnóstico de doença de Cushing foram estudados. Os dados clínicos, hormonais e histopatológicos foram avaliados retrospectivamente. O estudo da expressão do *Bcl-X_L*, do *Ikaros*, e do *FGFR4* foi realizado por PCR em tempo real em 20 amostras de corticotropinomas, sendo dois tumores correspondentes à síndrome de Nelson. A determinação dos genótipos no códon 388 do *FGFR4* foi realizada nos 97 pacientes e em 103 indivíduos controles, por PCR de fragmento do exon 9 do gene *FGFR4* seguida de digestão com a enzima de restrição *BstNI*. A evolução pós-operatória (remissão/recidiva) da doença de Cushing foi avaliada em 76 pacientes. Foram considerados em remissão aqueles pacientes com níveis normais de cortisol urinário durante todo o primeiro ano após a cirurgia, na ausência de reposição hormonal, bem como os que necessitaram de reposição com glicocorticoide no mesmo período. **Resultados:** Dos 76 pacientes submetidos à primeira cirurgia transesfenoidal, a remissão pós-operatória ocorreu em 68,4% dos pacientes. Treze pacientes (25%) evoluíram com recidiva da doença de Cushing após remissão inicial. A expressão do *Bcl-X_L* foi semelhante à hipófise normal na maioria das amostras tumorais [mediana (mín-máx): 1,36 (0,6 – 2,70)]. Aumento da expressão das isoformas longas do *Ikaros* foi detectado em 40% dos tumores, enquanto as isoformas curtas corresponderam a mais de 50% da expressão do *Ikaros* em apenas 3 casos, não havendo associação da expressão do *Ikaros* com qualquer das variáveis analisadas. O aumento da expressão do *FGFR4* foi detectado em 8/18 (44,4%) dos corticotropinomas com doença de Cushing, havendo associação entre a hiperexpressão do *FGFR4* e a menor frequência de remissão pós-operatória da doença de Cushing ($p = 0,009$). A distribuição genotípica do polimorfismo G388R foi semelhante entre pacientes

e controles. O genótipo glicina em homozigose (Gly/Gly) não foi associado à menor frequência de remissão pós-operatória da doença, no entanto, uma frequência maior de recidiva pós-operatória foi encontrada no grupo de pacientes Gly/Gly ($p = 0,019$). O genótipo Gly/Gly foi ainda associado à redução da sobrevida livre de doença (hazard ratio [HR], 6,91; Intervalo de Confiança (IC) de 95%, 1,14 a 11,26; $p = 0,028$). Outras variáveis que se associaram significativamente com maior frequência de recidiva foram: tamanho e grau de invasão tumoral de acordo com a classificação de Hardy modificada ($p = 0,017$), o sexo masculino ($p = 0,033$), a não confirmação Imuno-histológica do tumor produtor de ACTH ($p = 0,026$) e os valores de cortisol $> 2 \mu\text{g/dL}$ no pós-operatório precoce ($p = 0,01$). **Conclusões:** A expressão normal detectada do *Bcl-X_L* e das isoformas curtas do *Ikaros*, na maioria das amostras tumorais, sugere a não participação destes fatores na patogênese dos tumores corticotróficos. O aumento da expressão do *FGFR4* e o genótipo glicina em homozigose foram associados, respectivamente, à menor frequência de remissão e maior recidiva pós-operatória da doença de Cushing. Estes resultados sugerem que o *FGFR4* pode ter um papel na progressão dos tumores corticotróficos favorecendo a persistência e/ou recidiva da doença de Cushing.

Descritores: 1.Recidiva/prevenção & controle 2.Adenoma hipofisário secretor de ACTH/etiologia 3.Expressão gênica/genética 4.Polimorfismo genético/genética 5.Receptores de fator de crescimento de fibroblastos/genética 6.Fatores de transcrição/fisiologia

Summary

Brito LP. *Ikaros-FGFR4 pathway: role in the postoperative outcome of Cushing's disease* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 102p.

Introduction: The mechanisms involved in the molecular pathogenesis of corticotroph pituitary tumors are complex, heterogeneous and in most cases remain unknown. Changes in the expression of components of Ikaros (Ik) pathway, such as receptor 4 of fibroblast growth factor (*FGFR4*), have been detected in pituitary tumors including corticotropinomas. Imbalance between long and short *Ik* isoforms results in alternative transcription initiation of *FGFR4* and encodes a truncated isoform of the gene (pdt-*FGFR4*) which was associated with larger and more invasive pituitary tumors. The *Ik6* short isoform promotes *Bcl-X_L* expression *in vitro*, an effect independent of the interaction with the long isoforms. In addition, a polymorphism of *FGFR4* gene, the substitution of glycine by arginine at codon 388 (G388R), has been associated with adverse outcome in several human tumor types. **Objectives:** To analyze the expression of *Bcl-X_L*, *Ikaros* isoforms (*Ik1* + *Ik2*/*Ikaros* total), and *FGFR4* in human corticotropinomas. To determine the frequency of each genotype at codon 388 of *FGFR4* in patients with Cushing's disease and its association with the postoperative outcome after the first transsphenoidal surgery. **Methods:** Ninety-seven patients with Cushing's disease were evaluated. Clinical, hormonal and histopathological findings were assessed retrospectively. The expression of *Bcl-X_L*, *Ikaros* and *FGFR4* were evaluated by real-time PCR in 20 samples of corticotropinomas, including two samples of Nelson's syndrome. The *FGFR4* genotype was determined in the 97 patients and 103 control subjects by PCR fragment of exon 9 of the *FGFR4* gene, followed by digestion with the *BstNI* restriction enzyme. The postoperative outcome (remission/relapse) of Cushing's disease was assessed in 76 patients. The patients with normal urinary cortisol levels during the first year after surgery, in the absence of hormone replacement therapy, and those who required glucocorticoid replacement within the same period were considered in remission. **Results:** Of the 76 patients who underwent the first transsphenoidal surgery, remission was achieved in 68.4% of patients. Thirteen patients (25%) developed recurrence of Cushing's disease after initial remission. The expression of *Bcl-X_L* in the majority of tumor samples was similar to normal pituitary [median (min-max): 1.36 (0.6 - 2.70)]. Overexpression of long isoforms of *Ik* was detected in 40% of tumors, while the short isoforms represented more than 50% of the expression in only 3 samples. *Ik* expression was not associated with any of the variables analysed. *FGFR4* transcripts were overexpressed in 8/18 (44.4%) of corticotropinomas with Cushing's disease. There was an association between the overexpression of *FGFR4* and lower postoperative remission rate ($p = 0.009$). The *FGFR4* genotype distribution at codon 388 was similar between control individuals and patients. The glycine homozygous genotype (Gly/Gly) was not associated with lower remission rate. However, a higher frequency of postoperative recurrence was found in the Gly/Gly group ($p = 0.019$). The Gly/Gly genotype was also associated with reduced disease-free survival (hazard ratio [HR] 6.91, confidence

interval (CI) 95%, 1.14 to 11.26; $p = 0.028$). Other variables that were significantly associated with higher frequency of recurrence were: size and tumor invasion according to modified Hardy classification ($p = 0.017$), male gender ($p = 0.033$), non-immuno-histological confirmation of ACTH secreting tumor ($p = 0.026$) and cortisol levels $> 2 \mu\text{g/dL}$ in the early postoperative period ($p = 0.01$). **Conclusions:** The normal expression of *Bcl-X_L* and short isoforms of *I κ* in most samples suggest that these factors are not involved in the pathogenesis of corticotroph tumors. Overexpression of *FGFR4* and the glycine homozygous genotype were associated with lower frequency of remission and higher postoperative recurrence of Cushing's disease, respectively. These results suggest that *FGFR4* may play a role in progression of corticotroph tumors favoring the persistence and/or recurrence of Cushing's disease.

Descriptors: 1. Recurrence/prevention & control 2. ACTH- secreting pituitary adenoma/etiology 3. Gene expression/genetics 4. Polymorphism/genetics 5. Receptors, fibroblast Growth factor/genetics 6. Transcription factors/physiology

1. Introdução

1.1 Formação e Desenvolvimento Hipofisário

O desenvolvimento da glândula hipofisária anterior (adenohipófise) é determinado pela expressão de uma cascata de fatores de transcrição, controlada temporalmente, resultando no desenvolvimento de tipos celulares distintos a partir de um primórdio comum (1, 2).

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que a proliferação e a determinação celular hipofisária são controladas pela sinalização combinada e sequencial de sinais exógenos e endógenos (3). A sinalização extrínseca inclui sinais provenientes do diencéfalo central, dentre eles destacamos o BMP4, membro da família da proteína morfogênica óssea (BMP), o FGF8 membro da família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), de membros da família do gene *Wnt* (Wingless-type MMTV integration site family), por fim outro sinal surge, o Sonic Hedgehog (Shh) proveniente do ectoderma oral. A expressão desses fatores coincide com o desenvolvimento inicial da bolsa de Rathke (2, 3).

Subsequentemente, sinais intrínsecos incluindo a BMP2 e Wnt4 irão determinar a identidade posicional e estimular a proliferação dos diferentes tipos celulares hipofisários. Para a determinação e diferenciação das células adenohipofisárias é necessária a expressão de fatores de transcrição adicionais específicos, tais como: o Pit-1 (Fator de transcrição positivo pituitário específico 1) em somatotrofos, lactotrofos e tirotrofos; o SF1 (fator

esteroidogênico 1) em gonadotrofos e o T-pit (Fator T Box relacionado a Brachyury (T)) em corticotrofos (2, 3) (Figura 1).

As células hipofisárias diferenciadas sintetizam e secretam hormônios tróficos específicos, em resposta aos sinais de retroalimentação provenientes do sistema nervoso central e de órgãos periféricos (1, 2).

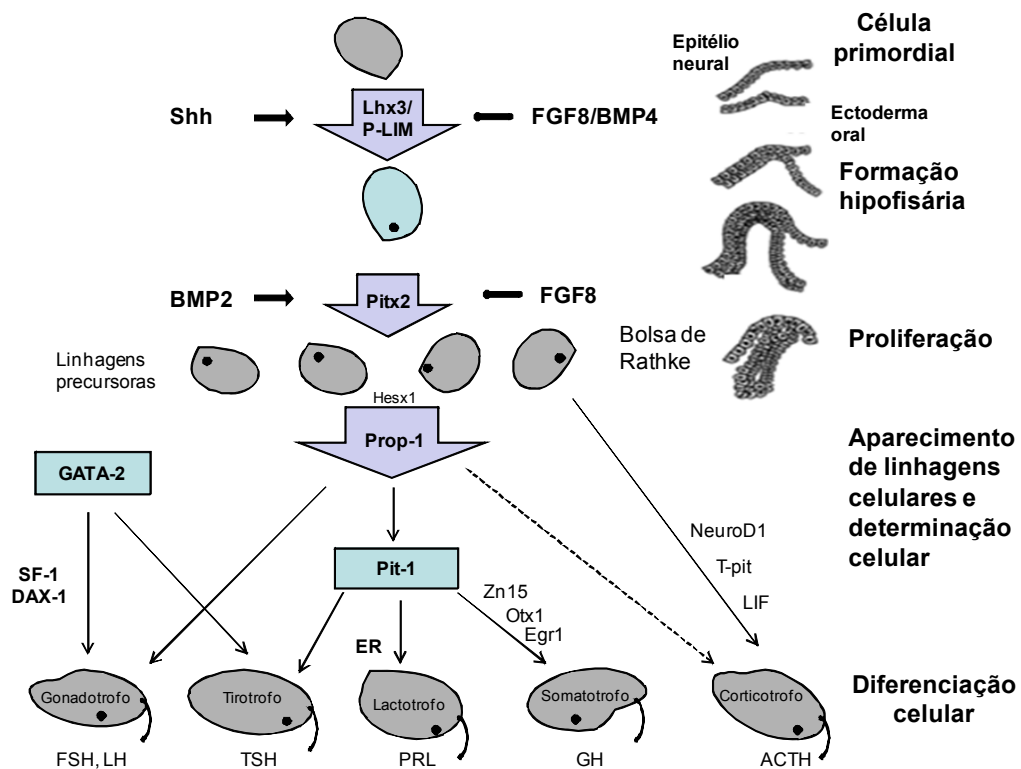


Figura 1. Modelo de desenvolvimento e diferenciação das células adenohipofisárias humanas. Adaptado a partir de Melmed S e cols. (1).

1.2 Tumores hipofisários

Os tumores da glândula hipofisária são freqüentes. Eles representam cerca de 10% das neoplasias intracranianas diagnosticadas e 25% das ressecadas cirurgicamente (4). Estudos sistemáticos de autópsia e

radiológicos identificam os adenomas hipofisários em 14 a 22% da população geral (5, 6).

Os tumores hipofisários mostram uma grande variabilidade em sua produção hormonal e capacidade proliferativa. Quando produzem hormônios em excesso podem dar origem a síndromes clínicas de hipersecreção, como a doença de Cushing, acromegalia, galactorréia/infertilidade (Tabela 1) (5).

Tabela 1. Tipo tumoral, síndrome clínica e incidência dos tumores adenohipofisários

Tipo Tumoral	Hormônio produzido	Síndrome associada	Incidência do tumor
Corticotropinoma	ACTH e outros derivados da POMC	Doença de Cushing e síndrome de Nelson	10 -15%
Somatotropinoma	GH	Acromegalia, gigantismo	10 -15%
Lactotropinoma	PRL	Amenorréia, galactorréia, disfunção sexual, infertilidade	35%
Mamosomatotropinoma	GH, PRL	Acromegalia, gigantismo com hiperprolactinemia	5%
Tirotropinoma	TSH	Hipertiroidismo	2%
Adenoma não-funcionante/ Gonadotropinoma	FSH, LH, null cell	Hipogonadismo, Hipopituitarismo	35%

ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; FSH, hormônio folículo estimulante; GH, hormônio do crescimento; IGF1, fator de crescimento semelhante à insulina 1; LH, hormônio luteinizante; POMC, pró-opiomelanocortina; PRL, prolactina; TSH, hormônio estimulador da tireóide. Adaptado a partir de Asa S e cols. (5).

1.3 Síndrome de Cushing

Desde a sua descrição em 1932 por Harvey Cushing, o diagnóstico da síndrome de Cushing, bem como sua etiologia, permanece um desafio aos endocrinologistas, patologistas e radiologistas.

A síndrome de Cushing resulta da prolongada e inapropriada exposição a concentrações excessivas de glicocorticóides circulantes (7), sendo classificada em dependente ou independente de ACTH. A síndrome de Cushing dependente de ACTH responde por cerca de 80-85% dos casos. Destes, 80% são devido a adenomas hipofisários (doença de Cushing) (7, 8). Os 20% restantes são causados pela secreção ectópica de ACTH ou, mais raramente, de CRH (9, 10). A síndrome de Cushing independente de ACTH pode ser originada por tumores do córtex adrenal (adenomas e carcinomas) ou por hiperplasia adrenal (macro ou micronodular (11).

A suspeita clínica da síndrome de Cushing ocorre na presença de algumas características clínicas, tais como: obesidade truncal, hipertensão, alterações de glicemia, hirsutismo, estrias violáceas, fraqueza muscular proximal, fragilidade capilar, alterações menstruais, distúrbios psiquiátricos (7, 12, 13). No entanto, além da inespecificidade dos sintomas/sinais, o quadro clínico nem sempre é florido.

O diagnóstico da síndrome de Cushing é baseado na confirmação bioquímica do hipercortisolismo, na perda da ritmicidade do ciclo circadiano e na perda parcial da supressibilidade do cortisol à dexametasona. Os

exames de rastreamento considerado de primeira linha para este diagnóstico são: cortisol livre urinário ou salivar à meia-noite e o teste de supressão com baixa dose de dexametasona (1mg) (11, 14, 15). Outros testes também utilizados e considerados de segunda linha são: supressão com altas doses de dexametasona (8 mg) à meia-noite ou prolongado (2mg em 6/6 horas por 2 dias) e a medida do cortisol sérico à meia-noite (11, 14, 15). Entretanto, nenhum destes testes apresenta sensibilidade e especificidade de 100%, sendo geralmente recomendado avaliar uma combinação deles para melhor acurácia diagnóstica (14, 15).

1.3.1 Diagnóstico etiológico da síndrome de Cushing

Uma vez confirmado o diagnóstico da síndrome de Cushing, é necessário estabelecer sua etiologia. A dosagem do ACTH plasmático, utilizando métodos ultra-sensíveis, quando normal ou aumentada é indicativa da síndrome de Cushing ACTH-dependente (11, 14). A diferenciação entre a doença de Cushing e a síndrome de ACTH ectópico requer a realização de diversos testes laboratoriais e exames de imagem, associados a uma análise criteriosa, já que a maioria dos testes podem apresentar resultados falsos negativos ou positivos (11, 14). A presença de lesões maiores ou iguais a 6 mm à RM, de preferência associado a uma resposta positiva a um teste de estímulo com CRH (ou combinação de CRH e desmopressina) e supressão com altas doses de dexametasona, favorece o diagnóstico de doença de Cushing (11, 14).

Devemos ressaltar que os incidentalomas hipofisários estão presentes em até 10-15% da população normal (6, 16), e em até 40% dos pacientes com doença de Cushing a lesão hipofisária pode não ser visualizada na RM (8, 17). Além disso, alguns tumores ectópicos também podem ser responsivos ao CRH e à desmopressina (14). Quando a imagem e/ou os testes dinâmicos são duvidosos, o cateterismo de seios petrosos inferiores (CSPIs) para dosagem do ACTH central e periférico, pré e após estímulo com CRH ou DDAVP, é considerado padrão-ouro no diagnóstico diferencial da síndrome de Cushing ACTH dependente (11, 14). A presença de um gradiente centro-periferia maior que 2 no basal e maior que 3 após estímulo com CRH ou DDAVP confirma o diagnóstico de doença de Cushing, com sensibilidade e especificidade de cerca de 94% (18, 19).

1.3.2 Definição e tratamento da doença de Cushing

A doença de Cushing é então definida por um estado de hipercortisolismo resultante de um adenoma hipofisário produtor de ACTH (corticotropinoma). Os corticotropinomas acarretam uma hipersecreção crônica de cortisol pelo córtex adrenal em decorrência de uma produção semi-autônoma de ACTH, com perda do ritmo circadiano normal da secreção de cortisol e ACTH. (20).

A doença de Cushing é rara com uma incidência, dependendo da população estudada, variando de 0,7 a 2,4 casos por milhão por ano (21-23), apresentando elevada morbi-mortalidade (21, 24). A incidência da doença

de Cushing em mulheres é 3 a 4 vezes maior do que em homens (25). Os tumores corticotróficos são, em geral, microadenomas (< 1cm), com diâmetro médio de 6 mm, apresentando-se com mais de 1 cm em apenas 4-10% dos casos (26-28).

O tratamento de primeira escolha para a doença de Cushing, até o momento, é a ressecção transesfenoidal seletiva do adenoma hipofisário com taxas de remissão pós-operatória variando de 60-80% (11, 29), entretanto os tumores maiores (macroadenomas) e mais invasivos têm em geral menor possibilidade de cura (24, 26, 29). As taxas de recorrência pós-operatória apresentam grande variabilidade entre diferentes centros, podendo chegar a 20% ou mais em seguimentos prolongados (29-32). Estas variações provavelmente decorrem de diferenças no tempo de acompanhamento e nos critérios de remissão adotados (33). Enquanto alguns autores consideram valores baixos (até 5-7 $\mu\text{g/dL}$) (24, 34, 35) ou indetectáveis (< 2 $\mu\text{g/dL}$) de cortisol (29, 36, 37) nos primeiros dias pós-cirurgia como indicativo de remissão pós-operatória, outros utilizam critérios como níveis normais de cortisol urinário (17, 24, 32), valores baixos de cortisol pós depressão com dexametasona 1 ou 2 mg (34, 38), níveis baixos de ACTH (17), ausência de resposta do cortisol e ACTH ao estímulo com desmopressina/CRH (39, 40), recuperação do ritmo circadiano normal (41), bem como uma combinação de vários testes (42).

Os pacientes com doença persistente ou recorrente, sem controle do hipercortisolismo, têm um aumento do risco de mortalidade e necessitam de intervenção terapêutica precoce e agressiva (24).

Algumas opções estão disponíveis como uma nova intervenção cirúrgica, a radioterapia convencional ou a radiocirurgia estereotáxica e a adrenalectomia bilateral (29, 43). Em todos os tratamentos complicações podem ocorrer, como o desenvolvimento do panhipopituitarismo, a síndrome de Nelson (SN), lesões de quiasma óptico (29, 43, 44).

O tratamento medicamentoso na doença de Cushing ainda é utilizado principalmente como coadjuvante, para o controle do hipercortisolismo até a realização de um tratamento definitivo (45). Há diferentes classes medicamentosas, os agentes que inibem diretamente a síntese e secreção de cortisol pela glândula adrenal (metirapona, cetoconazol e mitotane) são os mais utilizados na prática clínica (29, 45). Os agentes moduladores da produção de ACTH (ciproheptadina, valproato de sódio, bromocriptina e octreotide) em geral não resultaram em uma eficácia clínica consistente (46). No entanto, nos últimos anos, o desenvolvimento de agentes dopaminérgicos mais potentes (cabergolina), resultando em normalização do cortisol urinário em cerca de 40% dos pacientes com doença de Cushing faz ressurgir a possibilidade de um tratamento medicamentoso voltado para o tumor corticotrófico (47, 48). Outra opção medicamentosa potencial, atualmente em estudos de fase III, são os análogos da somatostatina com maior ação no subtipo 5 do receptor da somatostatina (SOM), subtipo este mais expresso na maioria dos corticotropinomas (45, 49).

1.4 Tumorigênese hipofisária

Apesar das novas descobertas em relação à patogênese molecular dos tumores hipofisários, a etiologia primária ainda não está totalmente elucidada. Os estudos são muito restritos principalmente no que se refere aos tumores hipofisários produtores de ACTH, por serem tumores raros e na grande maioria tratar-se de microadenomas, o que dificulta a obtenção de material suficiente para a análise molecular.

Os mecanismos da patogênese molecular envolvidos na tumorigênese corticotrófica são complexos, heterogêneos e tem sido alvo de extensa investigação pelos pesquisadores nas últimas décadas (50).

1.4.1 Clonalidade dos tumores hipofisários produtores de ACTH

A teoria de que os tumores hipofisários, inclusive os produtores de ACTH, poderiam decorrer de uma disfunção hipotalâmica primária foi baseada em princípios fisiopatológicos e alguns modelos animais (51, 52). No entanto várias evidências são contrárias a essa teoria. Os pacientes com síndrome de Cushing ACTH-dependente devido à hipersecreção de CRH ectópico, não desenvolvem adenoma corticotrófico apenas hiperplasia corticotrófica (53, 54). Além disso, estudos histológicos dos adenomas hipofisários não demonstram tecidos hiperplásicos adjacentes ao tumor (55).

Posteriormente, a origem monoclonal deste tipo tumoral hipofisário foi demonstrada pela análise de inativação do cromossomo X, tanto em micro (56)

como em macroadenomas (57). Este dado sugere que os tumores hipofisários corticotróficos sejam derivados de um defeito celular hipofisário intrínseco levando à expansão monoclonal de uma única célula transformada e não por uma excessiva proliferação policlonal em decorrência de uma estimulação hipotalâmica exacerbada.

Entretanto os hormônios hipotalâmicos e outros fatores de crescimento locais podem ter um importante papel no crescimento da célula já transformada. O rápido crescimento do adenoma produtor de ACTH após adrenalectomia bilateral é uma demonstração clínica da importância dos hormônios periféricos e hipotalâmicos no controle da progressão tumoral hipofisária (44, 58).

1.4.2 Alterações genéticas nos corticotropinomas

Mutações em protooncogenes, genes supressores tumorais clássicos e receptores regulatórios específicos dos corticotrofos são raramente envolvidos na gênese de tumores hipofisários produtores de ACTH (50, 59). Alguns fatores de crescimento vêm sendo implicados na formação/progressão tumoral.

Protooncogenes

Alguns dos protooncogenes avaliados em tumores hipofisários como o *ras* (60), *c-MYC* (61), *PKC* (62) associaram-se com tumores mais

agressivos, não sendo um achado específico da linhagem corticotrófica. Diferente dos somatotropinomas onde cerca de 40% dos tumores apresentam mutações ativadoras do gene *GNAS1*, mutações *gsp* foram encontradas em apenas 6% dos corticotropinomas (63). O estudo de outro protooncogene, o *PTTG* (Pituitary tumour-transforming gene), demonstrou aumento de sua expressão nos tumores hipofisários, incluindo também os secretores de ACTH (64).

Genes supressores tumorais

Dentre os genes supressores tumorais, o *TP53* é o gene mais comumente mutado no câncer humano. Embora alguns estudos em corticotropinomas tenham encontrado anormalidades de expressão protéica (65), mutações somáticas foram raramente descritas.

O estudo do gene *Rb1* (retinoblastoma) suscita um interesse especial nos tumores corticotróficos em decorrência das alterações encontradas em modelos animais (52). Nestes, o silenciamento de um alelo do *Rb1* resulta no desenvolvimento de tumores do lobo intermediário. Um fenótipo semelhante foi observado com o silenciamento do gene *kip1/p27* em camundongos (66). No entanto, alterações estruturais destes genes não foram identificadas em tumores secretores de ACTH (67), mas alguns estudos sugerem que alterações de expressão do *p27* possam ter algum papel na fisiopatogênese destes tumores (68). Reduções relativas da expressão protéica do *p27* foram encontradas em tumores corticotróficos

mais agressivos (69, 70), e baixa imunorreatividade para p27 foi observada em corticotropinomas que expressam o receptor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*) (71).

O gene *MEN1*, localiza-se no cromossomo 11q13. Perda de heterozigose desta região tem sido demonstrada em 10-30% dos tumores hipofisários esporádicos (72). No entanto, mutações ou alterações de expressão do *MEN1* não tem sido frequentemente detectadas em corticotropinomas (73).

Receptores específicos dos corticotrofos

O rastreamento de genes dos receptores regulatórios específicos dos corticotrofos, como o receptor do hormônio liberador da corticotrofina (CRH), tipo 3 da vasopressina (*V3R*) e do glicocorticóide (*GR*) revelou mutações em casos esporádicos (74, 75). Alteração da expressão do receptor 1 do CRH e do *V3R* foi demonstrada em tumores corticotróficos quando comparados a adenomas não funcionantes ou hipófises normais (74, 76). Embora os corticotropinomas apresentem uma resistência aos glicocorticóides, sugerindo que alterações estruturais ou transcricionais do receptor de glicocorticóide poderiam contribuir para esta resistência, esta característica não tem sido atribuída a mutações ou *splicing* anormal deste receptor (77, 78).

Mais recentemente foi demonstrada que a repressão do promotor da POMC pelo glicocorticóide é exercida através de trans-repressão

envolvendo interação direta proteína-proteína entre o GR e o fator de crescimento neural induzível-B (NGFI-B). Deste mecanismo de trans-repressão participam proteínas nucleares que compõe um complexo de repressão. Um componente crítico deste complexo é o gene relacionado ao Brahma-1 (*Brg1*) que recruta a histona deacetilase 2 (HDAC2). Foi demonstrado que cerca de 50% dos adenomas corticotróficos apresentam expressão nuclear reduzida de *Brg1* e/ou HDAC2 (79). Outro estudo avaliou a expressão do receptor de ACTH nos adenomas corticotróficos, e sugeriu que a redução da expressão deste receptor poderia contribuir para a resistência dos tumores corticotróficos aos glicocorticóides (80).

Outros fatores

Além dos reguladores hipofisários clássicos conhecidos, a glândula hipófise sintetiza e sofre a ação de vários fatores de crescimento e citocinas capazes de modular a produção hormonal e a proliferação celular. (5, 50). O fator de crescimento epidermal (EGF) e seu receptor (EGFR) são capazes de estimular a proliferação corticotrófica e secreção de ACTH *in vitro* (81). A ativação desta via foi descrita em alguns corticotropinomas com redução de expressão do *p27* (71). Um membro da superfamília TGF- β , o BMP4, tem um efeito inibitório sobre a tumorigênese corticotrófica *in vivo*. Sendo demonstrada expressão reduzida deste fator em corticotropinomas (82).

É possível que esses diferentes fatores possam exercer uma influência regulatória na célula hipofisária já alterada, contribuindo para potencializar

ou atenuar a expansão de uma população celular tumoral monoclonal, não sendo um fator iniciador primário da formação tumoral (83).

Mais recentemente têm se dado ênfase ao papel dos fatores de crescimento de fibroblastos e seus receptores na patogênese tumoral hipofisária (84, 85).

1.5 Os Fatores de Crescimento de Fibroblastos e seus receptores

Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) são pequenos polipeptídeos que compartilham certas características estruturais, entre elas a capacidade de se ligar avidamente a heparina, e a presença de um domínio de 120 aminoácidos conservados com 16-65% de identidade em sua sequência (86). Até o momento, os FGFs constituem uma família de pelo menos 23 membros (87, 88) que regulam uma variedade de respostas celulares tanto durante o desenvolvimento embrionário como no organismo adulto (89). A maioria dos FGFs são fatores mitogênicos que também podem exercer atividade quimiotática e angiogênica (90).

Os FGFs exercem seus efeitos biológicos através de sua ligação de alta afinidade aos receptores na superfície celular, denominados receptores dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFRs), que possuem atividade tirosina quinase, sendo identificados 4 tipos de receptores em humanos: FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4 (91). Cada receptor é composto de um

domínio extracelular formado por três alças semelhantes à imunoglobulina (Igl, IgII e IgIII), sendo duas das quais envolvidas na ligação ao ligante, uma sequência de 7 a 8 resíduos ácidos entre Igl e IgII (região “acid box”), um único domínio transmembrana com uma região justamembranosa longa, um domínio tirosina quinase citoplasmático bipartido, e uma cauda carboxiterminal. Uma característica importante da família de FGFRs é a variedade de isoformas geradas por *splicing* alternativo. As diferentes isoformas de FGFRs incluem receptores com domínio extracelular composto tanto de duas ou três Igs, formas solúveis de FGFR, bem como um *splicing* alternativo nos exons que codificam o IgIII que ocorre no *FGFR1*, 2 e 3 mas não no *FGFR4* (87).

Semelhantes a outros receptores tirosina quinase, após a ligação do ligante e consequente dimerização, os receptores tornam-se capazes de fosforilar resíduos tirosina específicos da cauda citoplasmática (92) e recrutar outras moléculas sinalizadoras, propagando o sinal através de várias vias de transdução (93, 94) (Figura 2).

O domínio justamembranoso dos FGFRs contém sequências altamente conservadas que servem como local de ligação ao domínio de dois membros da família de proteínas de atracamento do substrato do receptor de FGF (FRS2), o FRS2 α e FRS2 β . Estas proteínas fosforiladas recrutam complexos Grb2/Sos (Growth factor receptor-bound 2/Son of sevenless) resultando na ativação da via de sinalização Ras/proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). A FRS2 α fosforilada também ativa a proteína Gab1 e seus efetores (via PI3K). Além de ativação, a FRS2 α , também tem um papel no

recrutamento do regulador negativo Cbl. Fosforilação de resíduos tirosil na cauda carboxiterminal resulta ainda na ativação do complexo fosfolipase C γ (PLC γ), com hidrólise do fosfatidil-inositol (PI) gerando dois segundo mensageiros, diacilglicerol (DAG) e IP3 (Figura 2) (89).

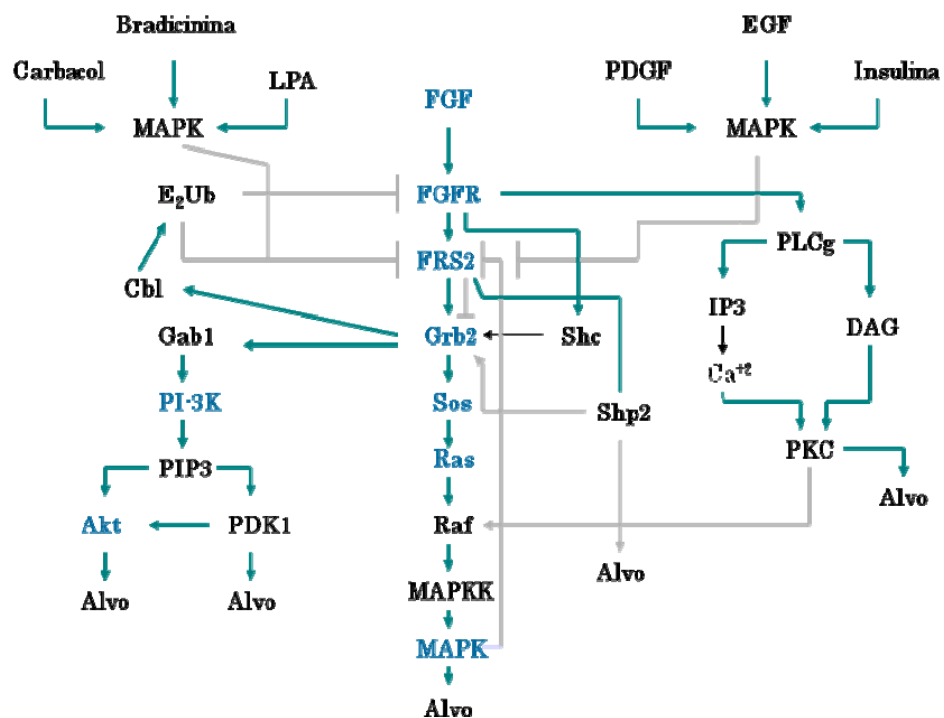


Figura 2. Vias de sinalização ativadas pelos receptores dos fatores de crescimento de fibroblastos. Modificado a partir de Eswarakumar VP e cols. (89).

Todos os componentes desta via, desde os fatores de crescimento polipeptídeos aos fatores de transcrição, são oncoproteínas potenciais. Isto significa que se ocorrer perda na regulação de qualquer passo na cascata, os componentes posteriores podem ser afetados, promovendo um crescimento celular descontrolado, que resulta em crescimento neoplásico (87).

O aumento da expressão das FGFRs tem sido demonstrado em amostras tumorais como de mama, próstata (95), tireóide (96). No entanto, as causas desta hiperexpressão são pouco caracterizadas. Mutações pontuais ativadoras em humanos têm sido encontradas no *FGFR1*, 2 e 3, principalmente associadas ao desenvolvimento de displasias esqueléticas e síndromes craniosinostóticas (97). Mutações somáticas no *FGFR2* e 3 também foram encontrada em carcinomas humanos (98). Isoformas alternativas das *FGFRs* também têm sido detectadas em linhagens de células tumorais e em alguns tumores (carcinoma de próstata, colorretal). Finalmente, rearranjos gênicos podem levar a ativação dos *FGFRs* independente do ligante como nas síndromes mieloproliferativas (99, 100).

1.5.1 O papel dos FGFs e FGFRs na hipófise

Os FGFs e seus receptores têm papel crítico no desenvolvimento hipofisário normal (2). Em modelos animais, a deleção de *FGF10* ou do seu receptor (isoforma do *FGFR2*) resulta em falência do desenvolvimento hipofisário primordial (101). A hiperexpressão de *FGF2* ou *FGF8*, em culturas, inibe a expressão de marcadores de determinação celular como a POMC (102), no entanto a hiperexpressão sustentada *in vivo* na glândula resulta em hiperproliferação e perda de marcadores celulares hipofisários específicos que não a POMC (3).

O papel dos FGFs e seus receptores na tumorigênese humana hipofisária tem sido objeto de estudos nas últimas décadas (84, 103, 104). O

FGF2 regula a produção de hormônios hipofisários e está hiperexpresso em tumores hipofisários com níveis mais elevados associados a tumores mais agressivos (105). Níveis circulantes elevados de imunorreatividade semelhante-FGF foram encontrados em pacientes com tumores hipofisários associados à neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (106) e, também, em pacientes com adenomas hipofisários esporádicos (105).

A adenohipófise humana normal expressa diferentes isoformas dos *FGFR1*, *FGFR2* e *FGFR3* (84). Pouca ou nenhuma reatividade para *FGFR4* foi identificada em hipófises normais humanas (84) e quando presente apenas a expressão da região inicial do receptor (Igl) foi identificada (84). O *FGFR4* possui 18 exons ao invés de 19 exons como as outras FGFRs (Figura 3).

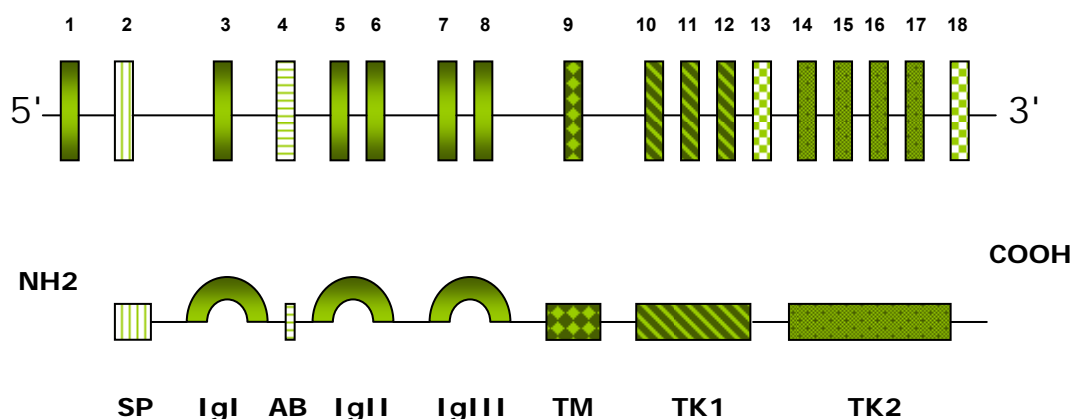


Figura 3. Gene *FGFR4* e estrutura proteica. O gene (topo) possui 18 exons. A proteína (abaixo) é um receptor tirosina quinase transmembrana com três alças semelhante à imunoglobulina (Ig). O exon 1 não é traduzido. O exon 2 codifica o peptídeo sinal. O exon 3 codifica o primeiro domínio semelhante à Ig (Igl). O exon 4 codifica a região acid-box (AB). Os exons 5 e 6 codificam o segundo domínio semelhante à Ig (IglII). Os exons 7 e 8 codificam o terceiro domínio semelhante à Ig (IglIII). O exon 9 codifica o domínio transmembrana (TM). Os exons 10-12 e 14-17 codificam a cauda quinase (K1 e K2). Adaptado a partir de Ezzat S e cols. (85).

Em 2002, Ezzat e cols. identificaram por RT-PCR, em aproximadamente 40% das amostras de tumores hipofisários humanos de vários tipos celulares, uma isoforma derivada-de-tumor-hipofisário do *FGFR4* (pdt-FGFR4) (85). Esta isoforma não foi encontrada em tecido hipofisário normal e possui apenas a terceira alça (IgIII) e os domínios transmembrana e quinase. O pdt-FGFR4 tem localização citoplasmática, provavelmente em decorrência da falta do peptídeo sinal, e encontra-se constitutivamente fosforilada podendo ter ainda um aumento de atividade quando associada ao ligante.

A expressão da isoforma pdt-FGFR4 nos tumores hipofisários decorre de uma alteração no início da transcrição do gene *FGFR4*. O silenciamento da região promotora selvagem e a utilização de uma região promotora críptica alternativa, localizada entre os exons 4 e 5 do gene, resulta na formação da isoforma truncada, na qual a região N-terminal encontra-se deletada (85, 107).

O pdt-FGFR4 tem propriedades transformadoras *in vivo* e *in vitro* e resulta em formação tumoral (85). Expressão ectópica de pdt-FGFR4 em células NIH 3T3 causa um aumento da proliferação celular, formação de colônias *in vitro* e perda de inibição por contato. Em modelos animais a injeção destas células acarreta na formação de tumores. Noventa por cento dos camundongos transgênicos com expressão hipofisária de pdt-FGFR4, sob o controle do promotor da prolactina, desenvolvem prolactinomas, sem hiperplasia hipofisária adjacente. Camundongos com expressão hipofisária do *FGFR4* intacto têm hipófise normal sem sinais de hiperplasia ou tumores

hipofisários (85). A base para a diferença entre o *FGFR4* e a *pd-FGFR4* parece estar relacionada com a habilidade de se associar com um número de moléculas de adesão celular incluindo a molécula de adesão celular neural (NCAM) e a N-caderina. A *pd-FGFR4* não se associa com o NCAM e interfere com a sinalização da N-caderina, dificultando a formação das junções aderentes. Além disso, a expressão do *pd-FGFR4* resulta em acelerada perda da afinidade celular ao colágeno tipo IV da matriz extracelular *in vitro* (104).

Camundongos com imunodeficiência combinada severa inoculados com células hipofisárias GH4 expressando *pd-FGFR4* desenvolvem tumores mais invasivos, sendo demonstrado que a utilização de um potencial alvo terapêutico, um inibidor seletivo das FGFRs (PD173074) resultou em significativa redução tumoral (108). No entanto, o tratamento de camundongos inoculados com células GH4 selvagens ou transfectadas com *FGFR4* intacto resultou em um crescimento inesperado e invasivo. Este efeito aparentemente paradoxal do inibidor da tirosina quinase baseia-se no impacto do tratamento na N-caderina. As células selvagens que expressam o *FGFR4* intacto apresentam por imunocitoquímica uma N-caderina de localização predominantemente membranosa, e a administração do PD173074, resultou na perda da N-caderina membranosa consistente com a interrupção do efeito do FGFR4 endógeno (108). Nas células expressando *pd-FGFR4* a administração do inibidor resultou em recrutamento da N-caderina de volta a membrana celular e aumento da adesão célula-célula (108) (Figura 4).

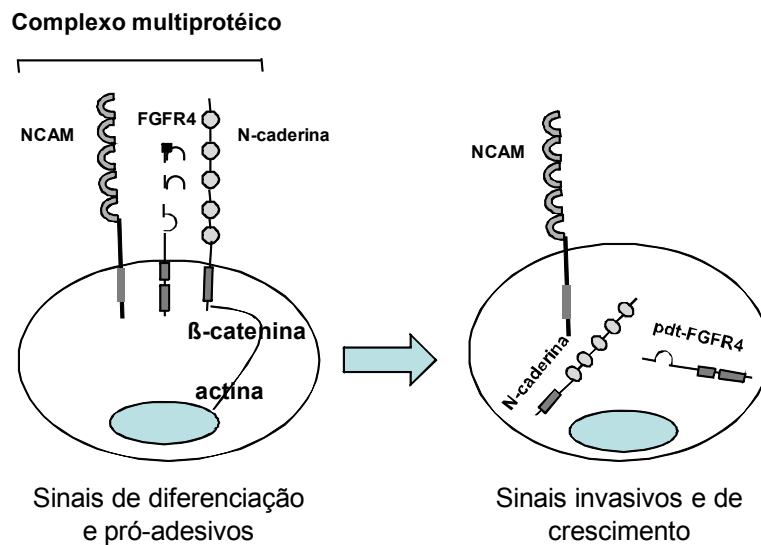


Figura 4. Modelo de interação do FGFR4/N-caderina. O FGFR4 localizado na membrana celular têm um papel crítico na interação com a NCAM para manter a estabilidade da N-caderina e β-catenina. Adaptado a partir de Ezzat S e cols. (108).

A avaliação por imunohistoquímica da expressão do FGFR4, N-caderina e β-catenina foi realizada em 73 adenomas hipofisários de vários subtipos e cinco hipófises normais. A presença da expressão do FGFR4 citoplasmático foi associada a aumento da coloração de N-caderina citoplasmática e perda focal de N-caderina membranosa (108). Entretanto, não foi encontrada evidência de acúmulo nuclear de β-catenina (108).

Outro estudo que avaliou a expressão do FGFR4 em um grupo de 137 tumores hipofisários esporádicos demonstrou expressão citoplasmática em cerca de 59% dos tumores (109). A maior reatividade foi associada a um maior tamanho tumoral e uma tendência a maior grau de invasão (109). Esse estudo incluiu 30 adenomas com reatividade para o ACTH, sendo 17 com a doença de Cushing. Desses tumores, 50% apresentavam expressão

citoplasmática positiva. Porém, expressão elevada (moderada quantidade de células densamente positivas para FGFR4) foi observada em menos de 30% dos casos (109). Morita e cols. estudaram a expressão do *FGFR4* por RT-PCT em um grupo de 45 tumores produtores de GH (110). Esse grupo demonstrou uma associação positiva entre a presença do pdt-FGFR4 e tumores mais invasivos (110).

1.5.2 Polimorfismo G388R no gene *FGFR4* e tumorigênese

A presença de um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) na região codificadora do *FGFR4* tem sido associada a tumores mais agressivos. A troca do nucleotídeo guanina por adenina resulta na mudança do aminoácido glicina por arginina (G388R) no domínio transmembrana do receptor. Este SNP é comum em diferentes populações (russa, japonesa, americanos caucasianos) ocorrendo com uma frequência de cerca de 50% (95, 111, 112).

O rastreamento do polimorfismo em controles e pacientes com carcinoma de mama e cólon caracterizou sua frequência elevada tanto em portadores destes carcinomas como em indivíduos saudáveis (111). No entanto, demonstrou-se, que os pacientes com o alelo arginina em homo ou heterozigose (Arg/Arg ou Gly/Arg) apresentam tumores mais agressivos e, portanto, representa uma alteração genética que predispõe o carreador a um prognóstico reservado (111). A correlação entre a presença do alelo arginina e agressividade tumoral foi então avaliada em vários outros tipos tumorais.

Alguns autores encontraram associação deste alelo com um pior prognóstico (95, 113-116), enquanto outros, no entanto, não encontraram qualquer associação (117-119).

Alguns autores também tentaram avaliar a correlação entre o genótipo apresentado e a expressão do *FGFR4*. Linhagens celulares de câncer de mama com o alelo arginina em heterozigose (Gly/Arg) ou homozigose (Arg/Arg), freqüentemente apresentavam expressão de *FGFR4* elevada, enquanto linhagens homozigotas para glicina exibiam fraca ou nenhuma expressão do gene *FGFR4* (111, 120). Em gliomas, o estudo por PCR em tempo-real, demonstrou o aumento da expressão do *FGFR4* nos casos com presença da arginina em relação aos casos homozigotos glicina (G388), entretanto quando avaliados por imunohistoquímica esses resultados não foram reproduzidos (120). Alguns estudos demonstraram ainda que células de diferentes tecidos transfectadas com o alelo arginina apresentam maior capacidade de migração e invasão do que aquelas com homozigose glicina (95, 111, 121). Dados dos trabalhos publicados que avaliaram o papel do polimorfismo G388R em diferentes tumores humanos são apresentados no Anexo A.

O mecanismo pelo qual a substituição de aminoácidos no códon 388 associa-se a alterações de motilidade celular e agressividade tumoral foi demonstrada pela técnica de microarranjo. A expressão da glicina em linhagens celulares suprime a expressão de genes específicos envolvidos em motilidade e invasão celular, sendo demonstrada uma redução de expressão de 6 a 10 vezes do receptor 2 (*Edg-2*) da LPA que participa das

vias de sinalização ERK (efeitos mitogênicos) e Akt (sobrevivência celular). Além disso, foi também encontrada significativa redução da expressão da matrix metaloproteinase 1 (mmp-1) nas células homocigotas glicina (121).

1.6 Expressão do *FGFR4* e os fatores de transcrição Ikaros

A região promotora do gene *FGFR4* é alvo dos fatores de transcrição Ikaros (Ik) (122). As proteínas Ikaros são caracterizadas pela presença de 2 domínios dedos de zinco e pertencem à família dos fatores de transcrição krupel (123).

Os fatores de transcrição Ikaros foram inicialmente descritos como fatores que reconhecem seqüências regulatórias de genes expressos nas células linfóides de murinos e humanos (124, 125) e são essenciais para o desenvolvimento normal dos linfócitos. Esses fatores atuam como genes supressores tumorais; observou-se que camundongos com mutações em heterocigose no *Ikaros* desenvolvem doenças linfoproliferativas que precedem leucemias e linfomas quando perdem o alelo selvagem (126).

O gene *Ikaros* contém 8 exons que sofrem *splicing* alternativo originando várias isoformas que diferem entre si quanto ao número de dedos de zinco N-terminal e a propriedade de ligar-se ou não ao DNA (127) (Figura 5).

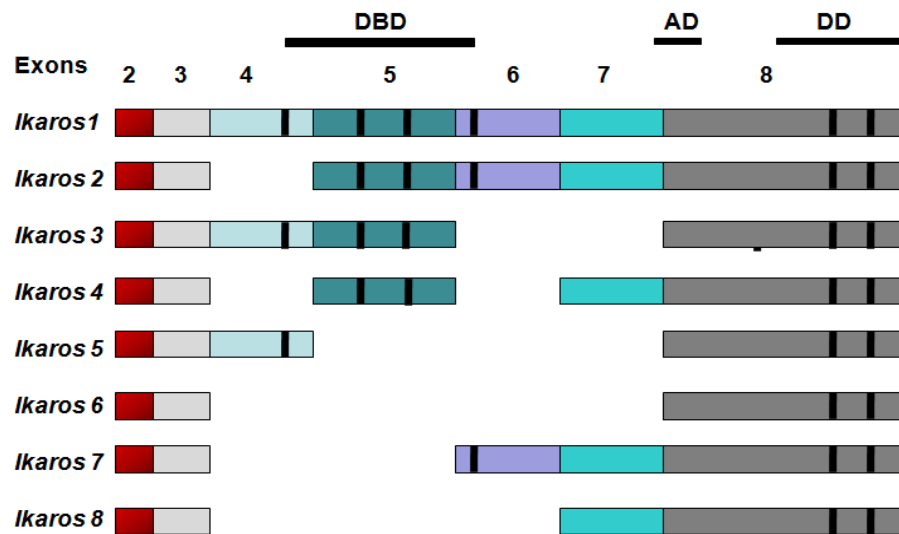


Figura 5. Ilustração das isoformas do *Ikaros*. Distribuição dos exons (em cores), domínios funcionais e dedos de zinco. Dedos de zinco são mostrados como barras em cor preta. AD, domínio de ativação; DBD, domínio de ligação ao DNA; DD, domínio de dimerização. Adaptado a partir de Chrousos GP e cols. (128).

Apenas as isoformas longas, Ik1, Ik2 e Ik3, contendo três ou mais dedos de zinco possuem a capacidade de ligação de alta afinidade aos promotores dos genes alvos (127). As isoformas curtas (Ik4; Ik5; Ik6; Ik7 e Ik8) dificultam a ligação das isoformas longas ao DNA e, portanto, são nomeadas isoformas dominante negativas. Estas isoformas curtas são normalmente expressas em níveis baixos, compatível com seu papel regulatório na atividade das isoformas longas (129) (Figura 5).

A expressão das isoformas dominante negativas do *Ikaros*, em especial Ik6, é encontrada em leucemias linfoblásticas agudas de células B, de crianças e de adultos (130, 131). Em pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC), o Ik6 foi a isoforma mais frequentemente detectada durante o desenvolvimento da crise blástica (132).

Em 2002, Ezzat e cols. (122) descreveram pela primeira vez o papel do Ikaros fora do sistema hematopoiético. O Ikaros apresenta ligação específica ao promotor do *FGFR4* e regula a transcrição deste gene na hipófise (122). A interação entre as isoformas Ik1 e Ik6 resultam em um ambiente que desfavorece a utilização do promotor proximal selvagem em favor da utilização de um promotor críptico localizado no íntron 4 (133). Esta região promotora críptica pode se ligar a fatores, como AP2 α (133) resultando na gênese da isoforma pdt-FGFR4 (107). Então, o balanço entre isoformas estimuladoras e inibidoras do Ikaros vão regular a transcrição do gene *FGFR4* (122).

O papel do *Ikaros* na hipófise foi reforçado pela demonstração de que este gene é expresso em células corticomelanotróficas tumorais de camundongos (células AtT20) e que a isoforma Ik1 liga-se ao promotor da POMC regulando sua expressão endógena, a expressão de ACTH, e a secreção de hormônio adrenocortical. Em contraste, o Ik6 reprime a atividade promotora da POMC (134). A avaliação de glândulas hipofisárias de camundongos *knockout* para o gene *Ikaros* mostra uma expressão normal de *T-pit*, enquanto a expressão da POMC foi reduzida nos animais heterozigotos e praticamente indetectável nos homozigotos. Os camundongos homozigotos eram de coloração mais clara, apresentavam os menores níveis de ACTH circulantes, redução do tamanho da glândula adrenal e insuficiência adrenal.

A avaliação da expressão do Ikaros demonstrou ser positiva em tumores hipofisários humano. Utilizando RT-PCR e Western blotting

determinou-se que cerca de 60% dos tumores hipofisários expressavam as isoformas Ik1 e Ik6. Os autores não identificaram correlação entre a reatividade para Ikaros e o tipo tumoral hipofisário (107). A expressão do gene *Ikaros* não foi identificada na hipófise normal adjacente aos adenomas.

Quanto ao papel da metilação na regulação da expressão do gene *Ikaros*, o estudo de alguns tumores hipofisários, por RT-PCR, demonstrou ausência de expressão do Ikaros nos dois tumores corticotróficos estudados e presença de metilação na região promotora do gene *Ikaros* (135).

A localização diferencial entre as isoformas do Ikaros foi demonstrada por microscopia confocal. O Ik1 exibe uma positividade nuclear focal, enquanto o Ik6 localiza-se predominantemente no citoplasma.

O achado da localização citoplasmática do Ik6 suporta ainda o potencial para uma ação independente desta isoforma em relação a sua interação com o Ik1. Foi demonstrado que o Ik6 estimula a expressão do fator anti-apoptótico *Bcl-X_L* em células AtT20 (136).

1.7 Ikaros 6 e o fator anti-apoptótico BCL-X_L

A transfecção de Ik6 em células AtT20 resultou em tumores maiores e de crescimento mais acelerado. As células transfectadas apresentaram um aumento de expressão do fator anti-apoptótico *Bcl-X_L*, mas não de outros fatores da família Bcl-2. Este efeito da isoforma Ik6 foi independente da interação ao Ik1 (136).

O fator anti-apoptótico *BCL-X_L* pertence a família de proteínas Bcl-2 que regulam vários passos da apoptose através da permeabilização da membrana mitocondrial externa. Alguns fatores desta família possuem efeitos apoptóticos (Bax/Bad), enquanto outros exercem efeitos anti-apoptóticos, como o Bcl-X_L e o Bcl-2, funcionando como oncogenes (137).

O gene *Bcl-X* pode gerar seis diferentes isoformas por *splicing* alternativo. Algumas delas têm efeitos opostos na apoptose, isto é, enquanto a isoforma Bcl-X_L protege contra a morte celular, a isoforma Bcl-Xs antagoniza a inibição da morte celular por interagir com o Bcl-X_L e o Bcl-2 (138).

O aumento da expressão do *Bcl-X_L* é encontrado em vários tumores humanos e é um importante componente na resistência dos tumores a radiação e/ou quimioterapia (139). Moléculas antagonistas de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, vem sendo desenvolvidas e testadas em estudos clínicos (140).

Apenas um estudo avaliou a expressão do gene *BCL-X* em tumores hipofisários por imunohistoquímica. Esse estudo incluiu 6 adenomas e 3 carcinomas secretores de ACTH. A expressão do *BCL-X* nos adenomas hipofisários foi semelhante à hipófise normal e houve redução da expressão nos carcinomas (141).

2. Objetivos

-
- Determinar a expressão gênica do fator anti-apoptótico *Bcl-X_L*, dos fatores de transcrição *Ikaros* (Ik1+Ik2/Ik total), e do receptor 4 dos fatores de crescimento de fibroblastos (*FGFR4*) nos corticotropinomas humanos.
 - Avaliar a associação da expressão com os aspectos clínicos, patológicos, evolutivos dos pacientes com doença de Cushing, e com os diferentes genótipos do códon 388 do gene *FGFR4*.
 - Avaliar a frequência dos genótipos do *FGFR4* (polimorfismo G388R) nos pacientes com doença de Cushing e sua associação com a evolução pós-operatória (remissão e recidiva) após a primeira cirurgia transesfenoidal.

3. Métodos

3.1 Casuística

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e todos os pacientes incluídos na pesquisa, ou seus responsáveis legais, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Um total de 97 pacientes com diagnóstico de doença de Cushing, acompanhados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) entre 1983 e 2009, foram avaliados. O diagnóstico baseou-se nos critérios clínico-laboratoriais: quadro clínico sugestivo de síndrome de Cushing associado ao hipercortisolismo dependente de ACTH, além da presença de uma imagem hipofisária sugestiva de tumor hipofisário e/ou cateterismo de seios petrosos com gradiente centro-periferia compatível com a doença central.

Foram coletados, retrospectivamente, dados relativos à idade ao diagnóstico, sexo, tamanho tumoral, presença de sinais de invasão, e evolução pós-operatória a curto (remissão ou persistência da doença no primeiro ano pós-cirúrgico) e a longo-prazo (permanência em remissão ou recidiva após o primeiro ano de evolução pós-operatória). Dos pacientes submetido à primeira cirurgia no HCFMUSP foram coletados ainda dados da idade na cirurgia, diagnóstico imuno-histológico (confirmação ou não de

adenoma hipofisário reativo para ACTH no fragmento extraído) e valores do cortisol no pós-operatório precoce - até 14 dias pós-procedimento (classificados em baixos quando $\leq 2 \mu\text{g/dL}$ ou elevados quando $> 2 \mu\text{g/dL}$). Apenas os dados da primeira cirurgia foram considerados, pois apresenta os maiores índices de remissão (142).

Os tumores foram ainda classificados de acordo com os critérios modificados de Hardy (143): grau 1 = microadenoma ($\leq 10 \text{ mm}$), grau 2 = macroadenoma ($> 10 \text{ mm}$) com ou sem extensão supra-selar, grau 3 = invasão local com destruição óssea e invasão do seio esfenoidal e/ou cavernoso e grau 4 = disseminação para SNC ou extracraniana.

Para a avaliação da evolução pós-operatória da doença de Cushing, incluímos apenas aqueles pacientes submetidos à primeira cirurgia transesfenoidal no HCFMUSP e que não haviam sido submetidos à radioterapia hipofisária prévia. O seguimento dos pacientes submetidos à cirurgia transesfenoidal foi realizado em consultas trimestrais nos dois primeiros anos e semestrais/anuais nos anos subsequentes. Foram considerados em remissão aqueles pacientes que apresentavam valores de cortisol urinário dentro dos limites normais para o método utilizado durante todo o primeiro ano pós-operatório, na ausência de reposição hormonal, e aqueles com necessidade de reposição glicocorticóide durante todo o período. O diagnóstico de recidiva baseou-se em recorrência dos sinais clínicos de hipercortisolismo associados a: níveis de cortisol urinário acima dos valores de referência do método dosado (HCFMUSP $> 300 \mu\text{g}/24\text{h}$, método fluorimétrico sem extração prévia).

3.2 PCR em tempo real

3.2.1 Amostras tumorais

Amostras teciduais obtidas a partir de 46 cirurgias transesfenoidais foram coletadas. Destas, 44 correspondiam a cirurgias para tratamento da doença de Cushing e duas cirurgias para controle da síndrome de Nelson (SN).

Das amostras coletadas, 20 foram selecionadas para o estudo de expressão por PCR em tempo real de acordo com os seguintes critérios:

- 1 - Confirmação histopatológica de adenoma hipofisário e imunohistoquímica positiva para ACTH do fragmento tecidual analisado;
- 2 - Boa qualidade do RNA extraído;
- 3 – Expressão positiva para *T-pit* e negativa de *Pit-1* por RT-PCR.

As características clínicas dos 20 pacientes e dos tumores corticotróficos incluídos para o estudo do PCR em tempo real estão descritos no Anexo B.

3.2.2 Extração de RNA

Os fragmentos obtidos durante a cirurgia transesfenoidal foram coletados em microtubos, sob condições estéreis e imediatamente

armazenados em nitrogênio líquido ou conservados em RNA later[®] (temperatura < -20°C).

A extração do RNA total foi realizada pelo método do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (Trizol[®]). Após homogenização do fragmento tumoral com Trizol[®], foram acrescentados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de TRIZOL[®], sendo a solução vigorosamente agitada e deixada em repouso em temperatura ambiente por 10 min. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4°C para formação de 3 fases da solução: um sobrenadante translúcido, uma fase intermediária leitosa e uma fase inferior rosada, contendo respectivamente RNA, DNA e proteínas.

O sobrenadante translúcido foi transferido para um novo tubo ao qual foi acrescentado 500 µL de isopropanol para precipitação do RNA total. As amostras foram deixadas 10 min em temperatura ambiente e depois centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi então desprezado e o “pellet” de RNA foi lavado uma vez com etanol 75% seguido por centrifugação a 7.500 g por 5 min. Foi realizada a remoção do etanol por inversão e secagem do “pellet”, e este foi ressuspenso em 50 µL de água livre de RNase e incubado a 65° por 10 min.

3.2.3 Avaliação da qualidade/quantificação do RNA e síntese do cDNA

A integridade de cada amostra de RNA extraído foi testada pela avaliação das bandas 28S e 18S de RNA ribossômico após eletroforese em

gel de agarose a 1% de 10 μ L do RNA total (Figura 6A e 6B). A concentração das amostras de RNA total foi determinada por leitura em espectrofotômetro com absorvância a 260 nm.

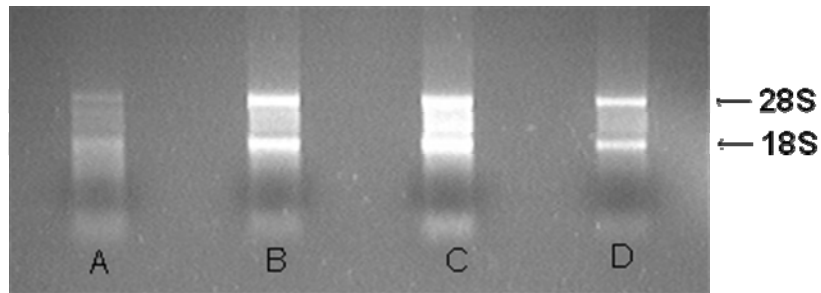


Figura 6. Avaliação da integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1% com visualização das bandas 28S e 18S. (A) Exemplo de amostra com baixa concentração de RNA o que dificulta a visualização das bandas 28S e 18S. (B, C e D) Exemplos de RNA de boa qualidade.

Como a maioria dos tumores corticotróficos são microadenomas, em algumas amostras a concentração de RNA obtido foi muito baixa dificultando a visualização da integridade na eletroforese em gel de agarose (Figura 6A). Desse modo, um equipamento com maior sensibilidade, o Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) foi utilizado para avaliação precisa da qualidade e quantidade das amostras. A faixa de avaliação do kit utilizado (RNA 6000 Nano Kit) detecta um valor de 5 ng/ μ l a 500 ng/ μ l. A tecnologia do equipamento Bioanalyzer consiste em uma eletroforese microcapilar em que pequenas quantidades de RNA são separadas nos canais de *microchips* de acordo com seu peso molecular e subsequentemente detectadas por fluorescência induzida a laser (144). Eletroferogramas e imagens semelhantes à eletroforese em gel de agarose

podem ser visualmente avaliadas, sendo ainda calculado um número de integridade do RNA (RIN). O RIN foi utilizado para avaliar a qualidade do RNA (escala 1–10, sendo 1 referente a um RNA degradado e 10 referente a um RNA sem degradação). Um valor de RIN de 5 ou mais é considerado de boa qualidade (145) (Figura 7).

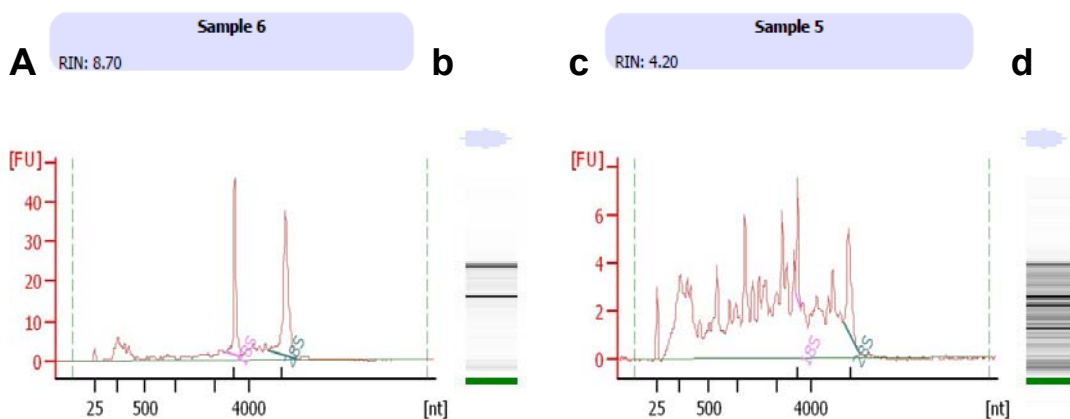


Figura 7. Exemplos da avaliação da integridade do RNA dos tumores corticotróficos gerados pelo Agilent Bioanalyzer 2100. Eletroferograma e imagem semelhante à eletroforese em gel, de RNA total intacto (a e b, respectivamente) e de RNA parcialmente degradado (c e d, respectivamente).

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por transcrição reversa a partir de 1,25 μg de RNA total de cada amostra para um volume final de 50 μl , utilizando-se o produto comercial *High-capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) segundo as instruções do fabricante.

3.2.4 PCR para os fatores de transcrição *T-pit* e *Pit-1*: avaliação de contaminação dos fragmentos tumorais com tecido normal

O fator de transcrição *T-pit* é expresso unicamente em células corticotróficas e por isso é um excelente marcador da presença dessas células no fragmento de RNA extraído do tumor (146). O *Pit-1*, por não ser expresso em corticotrofos e estar presente na maioria das outras células hipofisárias (lactotrofos, somatotrofos e tirotrofos) é utilizado para afastar contaminação dos tumores de células corticotróficas por outros tipos celulares (80). A amplificação do cDNA do gene da β -actina foi realizada como controle .

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, a temperatura de anelamento e o tamanho dos fragmentos dos genes *TPIT*, *PIT1* e β -actina amplificados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Seqüência dos pares de oligonucleotídeos utilizados na detecção da expressão do *T-pit*, *Pit-1* e β -actina no cDNA de tumores corticotróficos

Gene	Primer	Seqüência 5' → 3'	Fragmentos (pb)	Temp Anelamento
<i>TPIT</i>	S	ACA CCA ACG GAC CAA TCA AT	158	59°C
	AS	AGA AGG GGG TGA AGT CAC AG		
<i>PIT1</i>	S	GTG GGA GCA AAT GAA AGG AA	173	59°C
	AS	CGG TTG CAA AA CCAA ACT CT		
β -actina	S	GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC	541	59°C
	AS	AGC CGC GCT CGG TGA GGA TCT		

S, sense; AS, anti-sense

As reações de PCR foram realizadas a partir de 25 ng de cDNA, 200 μ M de cada desoxiribonucleotídeo (dNTP), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,5U de enzima *Taq* Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 5 μ l de tampão para reação de PCR, e H₂O para completar um volume final de 25 μ l. O protocolo de amplificação consistiu de uma pré-denaturação a 95 °C por 5 min, seguida de 28 ciclos a 95 °C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72 °C por 30 seg; seguidos de uma extensão final a 72 °C por 5 min. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1%.

A confirmação da especificidade dos oligonucleotídeos foi feita pelo seqüenciamento dos produtos de PCR. Para tal, 5 μ l de PCR foram purificados utilizando o tratamento enzimático com 2 μ l de ExoSap-IT (*Amersham Pharmacia Biotech, Cleveland, Ohio, USA*) por 15 min a 37°C, seguido de 15 min a 80°C. Após a purificação, estes produtos foram submetidos a uma reação de seqüenciamento utilizando o produto comercial *ABI Prism™ Big Dye terminator* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os produtos obtidos foram novamente purificados em colunas e as amostras submetidas ao seqüenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer 3100* (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as recomendações do fabricante.

As amostras que apresentaram amplificação do *T-pit* e não do *Pit-1* foram mantidas na casuística para o estudo de expressão por PCR em tempo real, e as amostras em que houve amplificação do *Pit-1* foram excluídas (Figura 8).

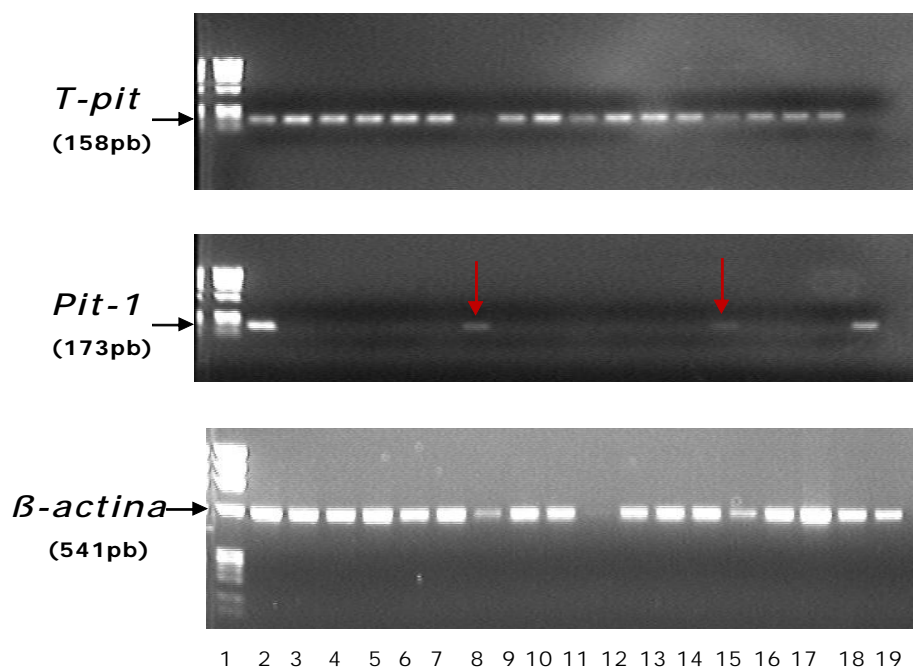


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 1% para visualização dos produtos de PCR do *Tpit*, *Pit-1* e β -actina. Coluna 1: marcador ϕ X 174 DNA/Hinf-1 digest. Coluna 2: pool de hipófise normal com expressão positiva para *T-pit* e *Pit-1*. As colunas 3 a 18 são amostras de tumores corticotróficos. Colunas 8 e 15 mostram tumores corticotróficos positivos para *Pit-1* e portanto excluídos de próximas análises. Coluna 19 mostra um exemplo de um tumor produtor de GH (*Pit-1* positivo e *T-pit* negativo). A expressão da β -actina é demonstrada como controle da amplificação.

3.2.5 Sistema Taqman

O estudo de expressão por PCR em tempo real foi realizado utilizando o sistema Taqman com um par de nucleotídeos iniciadores e uma sonda marcada com fluorescência FAM (genes alvo) ou VIC (genes endógenos) que permite detectar um produto específico da PCR conforme este se acumula durante os ciclos da reação. Em resumo, a sonda contém uma molécula fluorescente na extremidade 5' (repórter) e uma molécula quencher (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do quencher reduz bastante a fluorescência emitida pelo

corante repórter através da transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) através do espaço. Após a clivagem da sonda pela atividade 5' nuclease da DNA polimerase do sistema Taqman, ocorre a separação do corante repórter e do corante quencher, aumentando o sinal do primeiro. A clivagem das sondas em cada ciclo resulta em um aumento na intensidade de fluorescência que é proporcional à quantidade de produto produzido. Os ensaios utilizados neste estudo estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Características dos genes alvos e endógenos estudados por PCR em tempo real

Gene	Nome	Função	Ensaio
<i>FGFR4</i>	Receptor 4 dos FGFs	Receptor tirosina-quinase	Hs00242558_m1
<i>Bcl-X</i>	Bcl-X _L	Fator antiapoptótico	Hs00236329_m1
<i>IKZF-1</i>	Ikaros	Fatores de transcrição	Hs00958477_m1* Hs00958474_m1**
<i>ACTB</i>	Beta-actina	Proteína estrutural citoesquelética	4326315E
<i>B2M</i>	Beta-2-microglobulina	Molécula do complexo principal de histocompatibilidade I	4326319E
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3- fosfatase-desidrogenase	Oxidoredutase na glicólise e gliconeogênese	4326317E
<i>HPRT</i>	Hipoxantina-ribosil- transferase	Síntese de purinas	4326321E
<i>PGK1</i>	Fosfoglicerato quinase 1	Enzima glicolítica	4326318E
<i>CYC</i>	Ciclofilina A	Catalisa a isomerização cis-trans de ligações peptídicas	4326316E
<i>TBP</i>	Proteína ligadora TATA- box	Fator de transcrição geral da RNA polimerase II	4326322E

* Ensaio específico para as isoformas Ikaros 1 + Ikaros 2; ensaio que detecta todas as isoformas de Ikaros (Ikaros 1 a Ikaros 8)

3.2.6 Quantificação Relativa

O método de quantificação utilizado foi a quantificação relativa (comparação da expressão em número de vezes), que mede a quantidade do produto alvo em determinada amostra relativa à outra amostra de referência, chamada calibrador (ex. amostra não tumoral, amostra não tratada). Para o cálculo da quantificação relativa foi utilizado o método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) descrito por Livak (147). ΔCT é a diferença entre a expressão do gene alvo e endógeno de uma determinada amostra, e o $\Delta\Delta CT$ corresponde à diferença entre o ΔCT da amostra de cada paciente e o ΔCT do calibrador. Um *pool* comercial de hipófises normais de 20 adultos foi utilizado como calibrador (Pituitary Human Gland Poly A + RNA). A utilização deste método requer um experimento de validação, com padronização das curvas de diluição dos genes alvo e endógenos, para demonstrar se as eficiências de amplificação destes genes são próximas a 100%. Diluições progressivas 1:2 de amostras de c-DNA (obtidas a partir de 200 a 6,25 ng de RNA total) foram estabelecidas com o intuito de demonstrar uma diferença entre as diluições de um ciclo (CT). A curva padrão foi realizada com os genes alvos e os genes endógenos amplificados em poços separados (*singleplex*). Cada ponto da reta foi estabelecido pela relação do log da quantidade do RNA total da amostra no eixo das abscissas e o CT da amostra no eixo das ordenadas. O experimento é validado por uma equação da reta em que a inclinação da mesma seja mais próximo de -3,3 com uma relação $r \geq 0,99$. Posteriormente

a curva de eficiência em cada ponto da reta foi estabelecida pela relação do log da quantidade de RNA total da amostra no eixo das abscissas e o Δ CT da amostra em cada ponto de diluição. Um resultado satisfatório foi confirmado pela presença de uma inclinação da reta entre -0,1 a 0,1, demonstrando uma eficiência de amplificação equivalente entre o gene alvo e endógeno.

As reações foram preparadas em triplicata, em um volume final de 25 μ l, contendo 12,5 μ l de *Taqman Universal mastermix 2x*, 1,25 μ l de cada *Assay (primers e sonda)* 20 x - (Applied Biosystems Foster City, CA,), 1,0 μ l de cDNA (obtido a partir de 12,5 ng de RNA total) e 10,25 μ l de H₂O. Como controle de qualidade das reações, o coeficiente de variação máximo permitido nas triplicatas foi de 2%, caso contrário os experimentos foram repetidos.

As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 min, seguida pela ativação da *Taq Gold* a 95 °C por 10 min e 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg intercalados com anelamento e extensão a 60°C por min. O equipamento utilizado foi um ABI 7000 *Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.2.7 Avaliação da estabilidade dos genes endógenos

A estratégia utilizada na PCR em tempo real para controlar as variações na quantidade inicial de cada amostra avaliada, as diferenças transcricionais entre tecidos ou células, e na eficiência da RT foi a

utilização de genes de referência não regulados, os chamados genes endógenos. Os genes endógenos estudados nos corticotropinomas foram: ACTB, GAPDH, PGK1, CYC, B2M, HPRT e TBP (Tabela 3). Para determinar quais genes eram mais apropriados para o estudo de expressão neste tecido foi calculada a estabilidade de expressão dos genes utilizando o programa geNorm (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). Os valores de Ct absolutos foram transformados para quantidades usando o método do delta Ct comparativo onde a maior quantidade relativa de cada gene é definida como 1. O programa identifica a estabilidade de expressão dos genes endógenos e baseia-se no princípio que a razão de expressão de dois genes endógenos ideais é idêntica em todas as amostras, independente da condição experimental ou do tipo celular. Para cada controle endógeno é determinada a variação pareada (V) em relação a cada outro gene avaliado, como o desvio padrão das razões de expressão transformada logaritmicamente, e definida a medida de estabilidade do gene endógeno (M) como a variação pareada de um gene particular em relação aos demais genes. As razões são independentes de diferenças na abundância dos genes e são igualmente afetadas por amostras discrepantes. Assumindo que os genes endógenos não são co-regulados, a exclusão passo-a-passo do gene com pior score (maior valor de M) resulta na combinação de dois genes que tem a expressão mais estável (menor valor de M) nas amostras testadas (148).

O número de genes utilizados para a normalização deve ser baseado no equilíbrio entre as considerações práticas (custo, quantidade de amostra disponível para o estudo) e acurácia. O uso, no mínimo, dos três genes

endógenos mais estáveis é sugerido. A avaliação da variação pareada entre os genes também pode ser utilizada. Um valor de V baixo corresponde a um alto coeficiente de correlação entre os genes e quando menor que 0,15 indica que a inclusão de um gene adicional não é necessária. A média geométrica dos genes endógenos escolhidos é então utilizada para a normalização da expressão dos genes alvo.

3.3 Avaliação do polimorfismo G388R do *FGFR4*

Foram avaliados 97 pacientes com doença de Cushing com DNA ou cDNA disponível para a determinação do genótipo do polimorfismo G388R do *FGFR4*. Em 88 pacientes com doença de Cushing, a determinação do genótipo foi realizada a partir do DNA genômico: em 53 o DNA foi extraído de sangue periférico e em 35 a partir de raspado de mucosa oral. Em 09 pacientes que não possuíamos DNA disponível para a análise, o material utilizado para a avaliação do polimorfismo foi o cDNA, obtido como descrito anteriormente.

Para determinar a distribuição dos genótipos do polimorfismo G388R do *FGFR4* na população brasileira e comparação com aquela encontrada entre os pacientes com doença de Cushing foram incluídos 103 controles sem histórico de patologia hipofisária. O DNA de todos os controles foi extraído a partir de sangue periférico.

3.3.1 Extração de DNA

O método utilizado de extração de DNA a partir de leucócitos periféricos foi o “Salting out” a partir de cerca de 15 mL de sangue venoso colhidos em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM). Esta técnica consiste em duas etapas de lise de hemácias onde foi utilizado um volume de solução de lise (NH_4Cl a 114 mM, NH_4HCO_3 a 1 mM) duas vezes maior que o volume de sangue. As amostras foram incubadas a 4°C por 30 min, seguido de centrifugação a 4°C durante 15 min a 4000 g (Sorvall, RT7, Germany), sendo desprezado o sobrenadante. Posteriormente foi feita a lise de leucócitos, acrescentando-se 9 ml de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM 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, USA), 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 vigorosa durante 15 seg. O material foi centrifugado por 15 min a 4000 g, o sobrenadante transferido para tubo novo e realizada a precipitação do DNA com etanol absoluto gelado. Em seguida o DNA precipitado foi lavado em etanol a 70% durante 5 min por 4 vezes. Finalmente, o DNA foi lavado em etanol absoluto, secado por centrifugação a vácuo (Eppendorf, Concentrator 5301, Germany) e ressuspenso em tampão TE a 10:0,1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

A extração de DNA a partir de células de raspado de mucosa oral foi realizada utilizando-se o mesmo método descrito acima com algumas

modificações. Para a extração das células do raspado, uma etapa de lise celular foi feita com 200 μ l de TES (Tris HCl 10 mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) e 5 μ l de proteinase K (100 μ g/ml). Após essa primeira fase foi adicionado 42 μ l de NaCl saturado para purificação, e etanol absoluto para precipitação. O pellet foi ressuspenso em 60 μ l de TE 10:0,1 (10 mM TrisHCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

3.3.2 PCR e digestão enzimática

O polimorfismo no códon 388 do gene *FGFR4* cria um sítio de clivagem para a enzima *BstNI* (pela troca da guanina pela adenina) . Assim a genotipagem foi realizada através da PCR com amplificação de um fragmento de 168 pb do exon 9 do gene *FGFR4*, que contém a região do polimorfismo G388R, seguida de reação de digestão enzimática.

Para a PCR foram combinados DNA ou cDNA, 200 μ M de desoxiribonucleotídeo (dNTP), 10 pmol do oligonucleotídeo, 0,5U de enzima *Taq Gold* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 5 μ l de tampão para reação de PCR e H₂O para completar um volume final de 50 μ l. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados foram: 5'-GACCGCAGCAGCGCCGAGGCCAG-3' (sense) e 5'-AGAGGGAAGAGGGAGAGCTTCTG-3' (anti-sense). O protocolo de amplificação consistiu de uma pré-denaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto (denaturação); 68°C por 1 minuto (temperatura de anelamento) e 72 °C por 35 segundos (extensão); seguidos de extensão final de 72 °C por 7 minutos.

O fragmento de 168pb amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O marcador de peso molecular utilizado foi o Φ X 174/*Hae* III (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, USA).

Os produtos de PCR foram submetidos à digestão enzimática com a enzima *Bst*NI (New England *Biolabs*). Para a digestão foram utilizados 17,6 µl do produto da reação de PCR, 2 µl de tampão para a reação de digestão (10X NE Buffer), 0,2 µl BSA (100X BSA) e 0,2 µl de enzima *Bst*NI. A reação foi mantida overnight a temperatura de 65°C e posteriormente todo o volume foi submetido à eletroforese em gel de agarose à 3% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). O marcador de peso molecular utilizado foi o Φ X 174/*Hae* III (Figura 9).

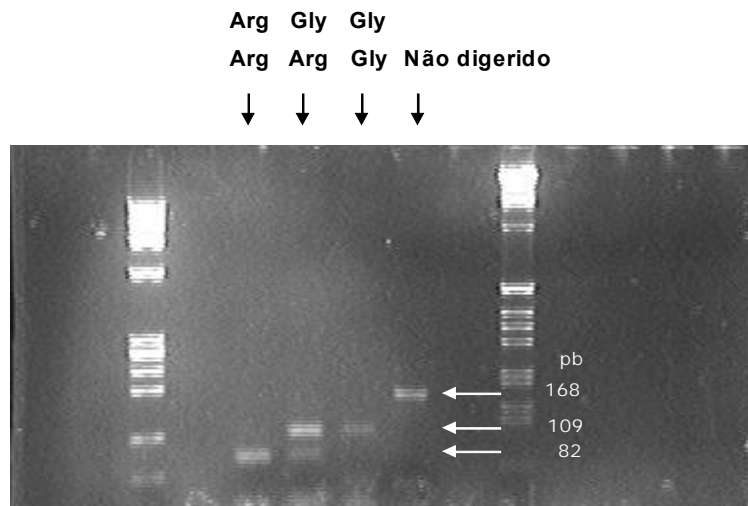


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos da digestão enzimática de PCR do exon 9 do gene *FGFR4*. A visualização de um único fragmento de 82pb indica a homozigose para o alelo arginina (Arg/Arg), enquanto um único fragmento de 109pb homozigose para glicina (Gly/Gly). Nos pacientes Gly/Arg observamos dois fragmento (109 e 82pb). O fragmento não digerido possui 168pb.

3.4 Resumo da estratégia de estudo

Dos 97 pacientes com diagnóstico de doença de Cushing inicialmente analisados, 46 tinham fragmentos tumorais congelados para a avaliação de expressão gênica: 44 correspondiam à pacientes com doença de Cushing e dois pacientes com síndrome de Nelson. Em 12 casos, a imunohistoquímica do fragmento analisado foi compatível com hipófise normal e, portanto, foram excluídas das etapas posteriores do estudo de expressão. As demais 34 amostras foram submetida à extração do RNA, 14 foram excluídas do estudo por apresentarem sinais de degradação do RNA (4 amostras) e o restante (10 amostras) por apresentar expressão positiva para *Pit-1*, sugerindo contaminação por tecido hipofisário normal.

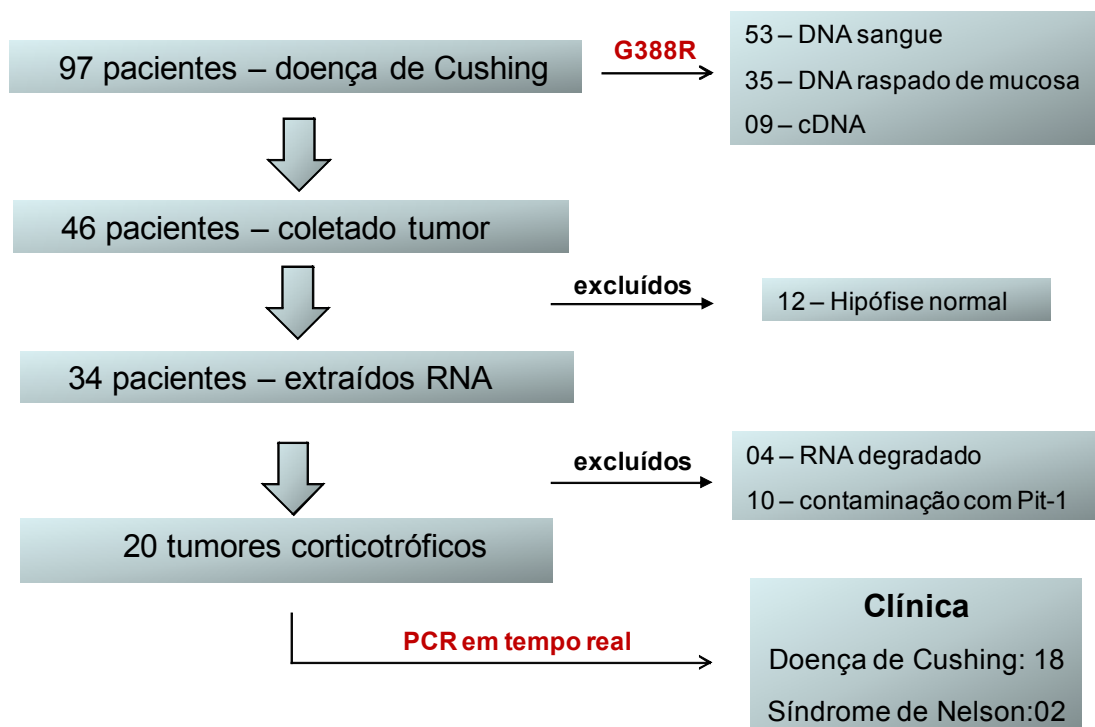


Figura 10. Fluxograma esquematizando a estratégia de estudo utilizada

3.5 Análise estatística

Para determinar a estabilidade dos genes endógenos foi utilizada a versão 3.4 do programa geNorm em formato Excel. Para o cálculo de quantificação relativa foi utilizado a fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Onde $\Delta\Delta Ct$ é igual a $(Ct \text{ alvo} - Ct \text{ endógeno da amostra}) - (Ct \text{ alvo} - Ct \text{ endógeno do calibrador})$, sendo os valores de Ct do gene endógeno obtido a partir da média geométrica dos três endógenos mais estáveis determinados pelo geNorm. O limiar utilizado para determinar elevação ou redução da expressão foi uma diferença de duas vezes para mais ou para menos, respectivamente, em relação ao calibrador.

A razão da expressão das principais isoformas longas do Ikaros (Ik 1 + IK 2) sobre a expressão de todas as isoformas de Ikaros (Ik1 a Ik8), que nomeamos Ik total, isto é, soma das isoformas longas e curtas foi avaliada como uma estimativa indireta da expressão do Ikaros 6. Um resultado próximo a 1 indica a expressão predominante das isoformas longas (Ik1 + Ik2), enquanto valores baixos indicam um aumento de outras isoformas, que não o Ik1 + Ik2.

A análise estatística foi realizada com os programas estatísticos SPSS (versão 13.0, SPSS Incorporation) e MedCalc (MedCalc statistic software, versão 9.4.2.0). As variáveis contínuas foram expressas como mediana (valor mínimo – valor máximo). O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar variáveis numéricas. A comparação de variáveis categóricas foi realizada pelos testes exato de Fisher ou qui-quadrado,

quando apropriados. O método de Kaplan-Meier, com aplicação do teste de log-rank, foi utilizado para avaliar o efeito das variáveis na sobrevida livre de doença e cálculo do risco de recidiva, hazard ratio (HR), entre os grupos. Um $P < 0.05$ foi considerado significativo.

4. Resultados

4.1 Caracterização dos pacientes

Foram avaliados 97 pacientes com diagnóstico de doença de Cushing, em acompanhamento no HCFMUSP. A mediana de idade dos pacientes à época do diagnóstico foi de 30 anos (12 a 60 anos) e em 12 pacientes a idade era inferior a 18 anos. Setenta e oito casos (80,4%) eram do sexo feminino. No grupo infantil 7/12 eram do sexo masculino. Em 90 casos foi possível a obtenção dos dados de imagem hipofisária: 23 (25,6 %) tumores não foram visualizados à RM, 51 (56,7 %) tumores eram microadenomas, 16 (17,7 %) macroadenomas; 70 (77,8 %) tumores foram classificados como grau I de Hardy modificado, 11 (12,2 %) grau II e 09 (10 %) grau III. A mediana do tamanho dos tumores em que havia a descrição das medidas tumorais foi de 0,70 cm (0,2 a 1,7). Dentre os 97 pacientes, 79 haviam sido submetidos à primeira cirurgia no HCFMUSP. Três destes pacientes não haviam completado um ano de evolução pós-operatória. Entre os 76 pacientes restantes, 52 (68,4%) evoluíram com remissão da doença de Cushing enquanto 24 (31,6%) não apresentaram remissão pós-operatória. Treze pacientes (25%) apresentaram recidiva após mediana de 60 meses de acompanhamento (18 a 180 meses), enquanto 39 (75%) mantiveram-se em remissão.

As características dos pacientes incluídos para o estudo de PCR em tempo real não diferiu do grupo inicial. A mediana de idade dos 18 pacientes com doença de Cushing na época da cirurgia foi de 26 anos (variação de 13 a 54 anos), em 3 destes casos a idade era inferior a 18 anos. Quinze casos (83,3%) eram do sexo feminino. Quatro (22,2%) tumores não foram visualizados à RNM, em 10 casos (55,6%) foi visualizado um microadenoma e em 4 (22,2%) um macroadenoma. A mediana do tamanho desses tumores foi de 0,9 cm (0,3 a 1,7cm). Treze pacientes (72,2%) foram classificados como grau I de Hardy, 3 (16,7%) como grau II e 2 (11,1%) como grau III. Para a avaliação de remissão foi excluído 1 paciente que perdeu acompanhamento antes de um ano após a cirurgia. Dos 17 pacientes restantes, 12 (70,5%) evoluíram com remissão da doença de Cushing enquanto 5 (29,5%) não apresentaram remissão pós-operatória. Os demais dados destes pacientes e os dados referentes aos dois pacientes portadores de síndrome de Nelson encontram-se no anexo B.

4.2 Expressão gênica por PCR em tempo real

4.2.1 Curvas de eficiência dos genes alvo e endógeno

Obtivemos resultados satisfatórios nas reações em *singleplex* para curva padrão dos genes alvos e endógenos. O valor da inclinação da reta desses genes foi próximo de -3,3 e uma relação de equação da reta (r) > 0,99. As curvas de eficiência foram adequadas, uma vez que a inclinação da reta

estava entre -0,1 e 0,1, demonstrando que os genes alvos e endógenos têm uma eficiência equivalente de amplificação e validando a utilização do método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) para a análise dos dados (Figuras 10 e 11).

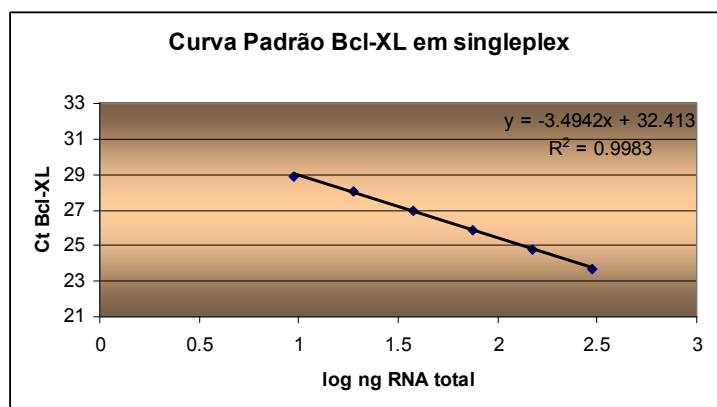


Figura 11. Exemplo de curva padrão obtida a partir de reações *singleplex*

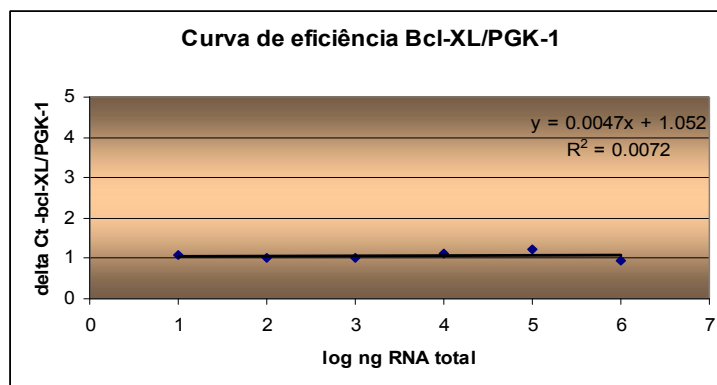


Figura 12. Exemplo de curva de eficiência entre o gene alvo e endógeno

4.2.2 Genes endógenos mais estáveis nos corticotropinomas:

Para a seleção dos genes endógenos mais estáveis para os corticotropinomas foi avaliada a expressão de sete genes endógenos

comumente utilizados em 15 amostras que apresentavam material em quantidade suficiente.

Os três genes que apresentaram menor valor de M e, portanto, maior estabilidade foram: o *PGK-1*, *CYC* e *HPRT* (Figura 12). O valor $V2/3$ foi de 0,13, o que possibilita a utilização dos dois ou dos três genes endógenos mais estáveis na avaliação da expressão gênica nesta casuística (Figura 13). Optamos pela utilização dos três genes endógenos mais estáveis.

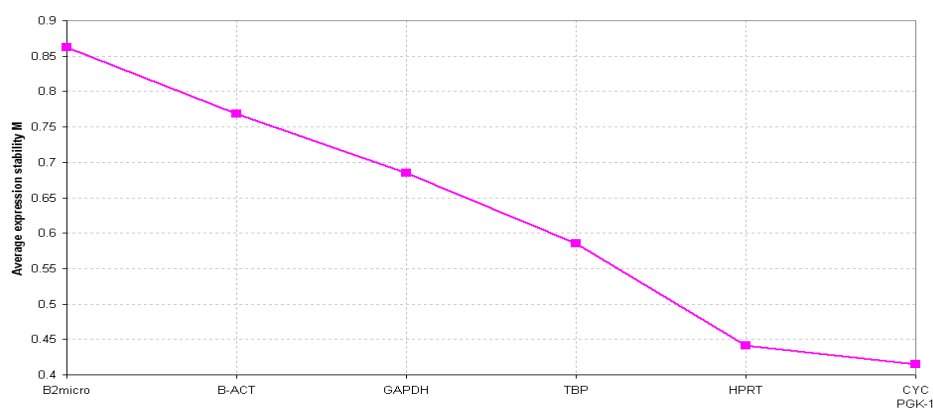


Figura 13. Análise da estabilidade dos genes endógenos pelo geNorm em corticotropinomas, plotados do menos estável (esquerda) para o mais estável (direita).

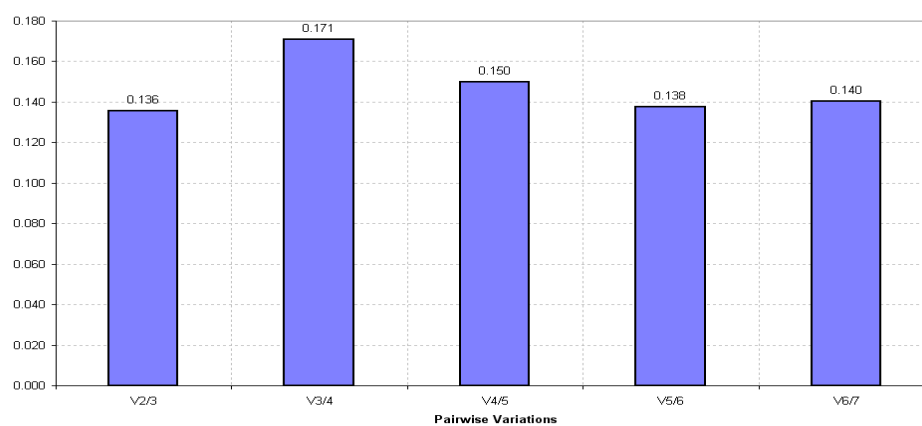


Figure 14. Determinação do número ótimo de genes endógenos para normalização dos corticotropinomas.

4.2.3 Expressão do *Bcl-X_L* nos corticotropinomas

Os valores de RNAm do gene *Bcl-X_L* foram elevados em dois tumores. Um deles correspondia a um paciente com doença de Cushing (2,7 vezes em relação ao calibrador) e o outro a um paciente com síndrome de Nelson (2,6 vezes), pacientes 2 e 19 do anexo 2, respectivamente. A mediana de expressão do *BCL-X_L* nos demais casos foi de 1,12 (0,6 – 1,70) e redução de expressão não foi observada em nenhum dos casos avaliados nessa casuística.

Demonstração da significância da escolha de genes endógenos confiáveis para o estudo de PCR em tempo real

Comparamos a expressão do *Bcl-X_L* quando normalizado com a média geométrica dos três genes endógenos mais estáveis, o PGK-1, CYC, HPRT (MG3), e com cada um dos demais endógenos avaliados (TBP, GAPDH, B2M e B-actina). Valores diferentes foram obtidos quando se optou pelos genes endógenos menos estáveis. B2M (aumento de expressão em 62,2% dos casos) e a B-actina (redução da expressão em 83,3% dos casos) (Figura 14).

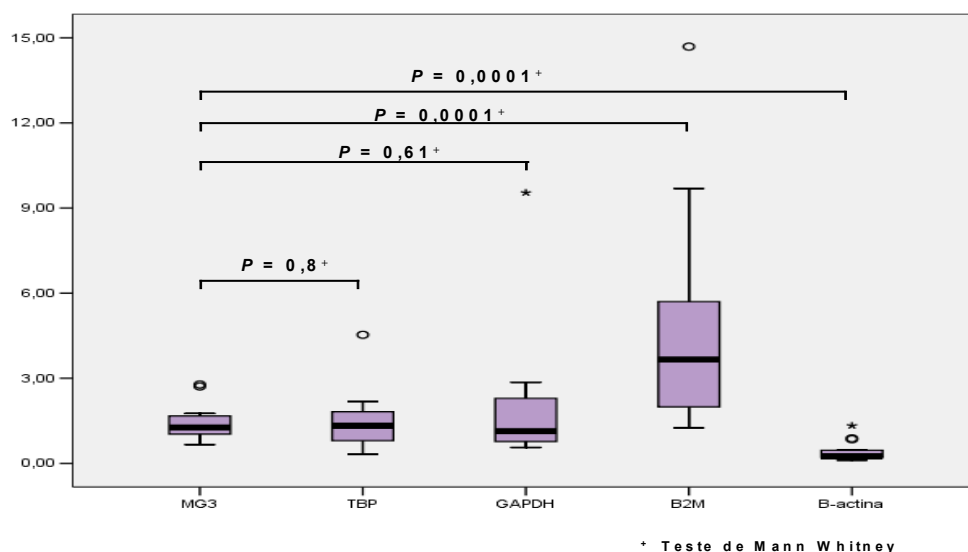


Figura 15. Valores de expressão do *Bcl-X_L* com diferentes estratégias de normalização.

4.2.4 Expressão dos fatores de transcrição *Ikaros* nos corticotropinomas

A expressão da soma de todas as isoformas *Ikaros* (*Ik* total) foi semelhante à da hipófise normal na maior parte dos pacientes avaliados (mediana: 1,21; mín-máx: 0,58 – 1,92), em 01 caso a expressão foi baixa, e aumento da expressão foi detectada em 8 dos 20 pacientes com corticotropinomas (5,1; 2,58 – 40,9). A avaliação da razão *Ik1+Ik2/Ik* total nestes pacientes com aumento da expressão do *Ikaros*, demonstrou ser esta elevação predominantemente em decorrência das isoformas *Ik1 + Ik2*, com uma mediana da razão de expressão de 0,87 (0,47 – 1,0). Um resultado próximo a 1 indica a expressão predominante das isoformas *Ik1 + Ik2*, enquanto valores baixos indicam um aumento de outras isoformas que não o *Ik1 + Ik2*. A razão *Ik1+Ik2/Ik* total manteve-se próxima a 1 também nos casos

sem elevação da expressão do *Ikaros* (0,96; 0,47 – 1). Em apenas três casos a razão foi menor que 0,5 indicando que outras isoformas do *Ikaros*, em especial o *Ikaros 6*, poderiam estar presentes. Em dois destes casos foi detectada também aumento da expressão do RNAm do *FGFR4*, mas não do *Bcl-X_L*. Não houve associação significativa do aumento da expressão do *Ikaros* com qualquer das variáveis avaliadas.

4.2.5 Expressão do gene *FGFR4* nos corticotropinomas

Aumento de expressão do *FGFR4* foi detectado em 8 dos 18 (44,4%) tumores com doença de Cushing (4,0; 2,5 – 8,25). Os dois casos de síndrome de Nelson apresentaram expressão normal desse gene. Dentre os demais casos, nove apresentaram expressão normal e um apresentou expressão reduzida (0,27 vezes em relação ao calibrador).

Não foram observadas diferenças significativas quanto às variáveis: idade (na cirurgia), sexo, tamanho tumoral, grau de Hardy, valores de cortisol pós-operatório e frequência do polimorfismo G388R entre os grupos com e sem aumento de expressão do *FGFR4*. No entanto, houve uma diferença significativa quanto à taxa de remissão pós-operatória entre os dois grupos. Enquanto 75% dos pacientes em remissão pós-operatória apresentaram expressão normal ou baixa do *FGFR4*, todos os pacientes com persistência da doença tinham aumento da expressão do *FGFR4* (Tabela 4). A mediana de expressão do *FGFR4* nos pacientes com e sem remissão foi significativamente diferente (Figura 16).

Tabela 4. Comparação entre os grupos com e sem elevação da expressão do *FGFR4*

Variável	Expressão do <i>FGFR4</i> baixa ou normal	Aumento da expressão do <i>FGFR4</i>	<i>p</i>
Idade, anos			
- Mediana	33	25	0,20 [†]
- Mín-Máx	15 – 54	13 – 34	
Sexo			
- F	09 (60%)	06 (40%)	0,55 [‡]
- M	01 (33,3%)	02 (66,7%)	
Tamanho tumoral			
- microadenomas	08 (57,1%)	06 (42,9%)	1,0 [‡]
- macroadenomas	02 (50%)	02 (50%)	
Hardy			
- grau 1	08 (61,5%)	05 (38,5%)	0,24 [‡]
- grau 2	02 (66,7%)	01 (33,3%)	
- grau 3	00 (0%)	02 (100%)	
Polimorfismo			
- GlyGly	06 (60%)	04 (40%)	1,0 [‡]
- GlyArg/ArgArg	04 (50%)	04 (50%)	
Cortisol pós-operatório			
- ≤ 2mcg/dl	06 (100%)	00 (0%)	0,10 [‡]
- > 2 mcg/dl	06 (54,5%)	05 (45,5%)	
Evolução			
- Remissão	09 (75%)	03 (25%)	0,009 [‡]
- Sem remissão	00	05 (100%)	

F: feminino; M: masculino; Gly: glicina; Arg: arginina; [†] Teste de Mann-Whitney; [‡] Teste exato de Fisher; [‡] Teste do qui-quadrado

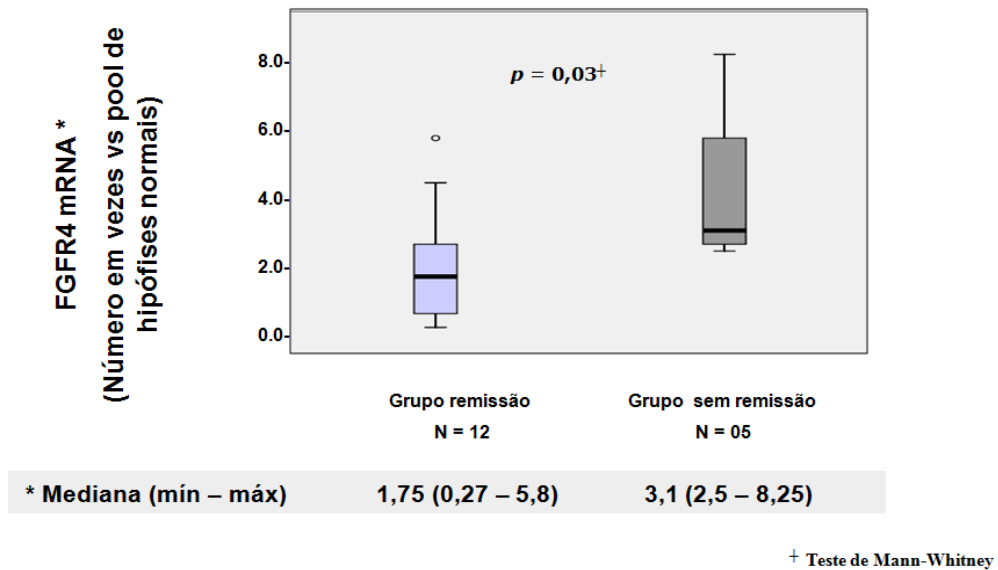


Figura 16. Expressão do *FGFR4* no tecido tumoral hipofisário dos pacientes com ou sem remissão pós-operatória da doença de Cushing. * Mediana (valor mínimo – valor máximo)

Não houve diferença significativa na expressão do *FGFR4* entre os pacientes homocigotos (GlyGly) ou não homocigotos para o alelo glicina (GlyArg ou ArgArg) (Figura 17).

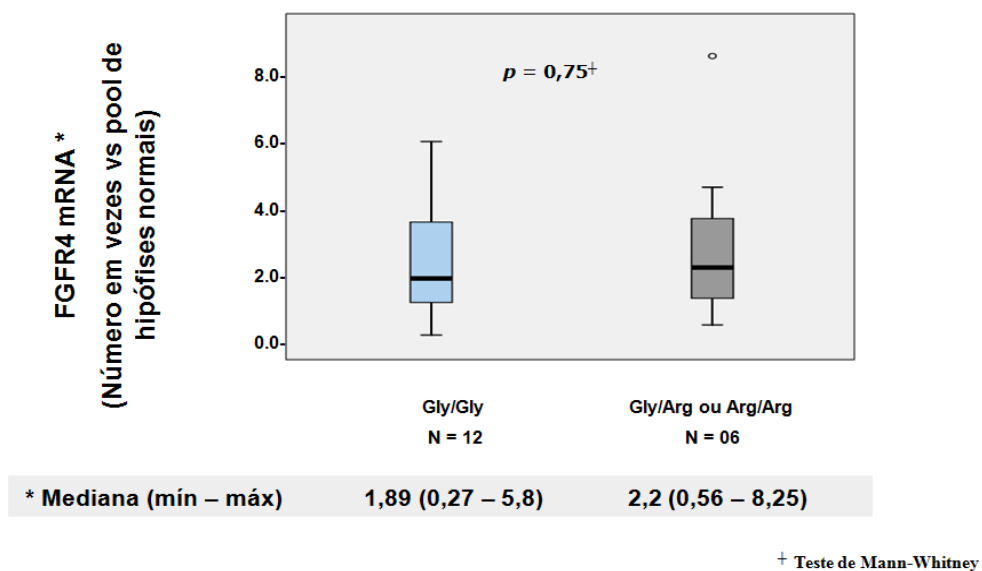


Figura 17. Expressão do *FGFR4* nos grupos de pacientes com doença de Cushing homocigotos ou não-homocigotos para o alelo glicina. * Mediana (valor mínimo – valor máximo)

4.3 Associação do polimorfismo G388R e de variáveis clínico-patológicas com a evolução pós-operatória dos pacientes com doença de Cushing

A frequência dos diferentes genótipos do polimorfismo G388R nos pacientes e controles é apresentada na Tabela 5. A proporção genotípica esteve de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos, e não houve diferença significativa da frequência dos genótipos entre pacientes e controles ($p = 0,13$) indicando não haver aumento do risco de doença de Cushing entre os diferentes genótipos. A frequência encontrada foi ainda semelhante à encontrada em outras nacionalidades (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência dos genótipos do polimorfismo G388R entre controles, pacientes e o descrito na literatura

Alelos	Pacientes N = 97	Controles N = 103	Literatura^(111, 113, 116)
Gly/Gly	55,7%	56,3%	38-55%
Gly/Arg	41,2%	34,0%	41-49%
Arg/Arg	3,1%	9,7%	4-12%

Gly: glicina; Arg: arginina

A frequência alélica calculada nos pacientes foi Gly, 76%; Arg, 24% e nos controles: Gly, 73%; Arg 27%. Devido à baixa frequência de homozigotos para o genótipo arginina, eles foram combinados com os pacientes heterozigotos para a análise estatística. Não houve diferença significativa entre os homozigotos (Gly/Gly) ou não-homozigotos para o alelo

glicina (Gly/Arg e Arg/Arg) quanto à idade ao diagnóstico da doença de Cushing, sexo, tamanho tumoral ou grau de Hardy.

Tabela 6. Características dos pacientes com doença de Cushing homozigotos (Gly/Gly) ou não-homozigotos para o alelo glicina (Gly/Arg e Arg/Arg)

Variável	N	Gly/Gly (%)	Gly/Arg ou Arg/Arg (%)	p
Idade, anos	93			
- Mediana		33	28,5	0,31 [†]
- Variação		12 – 59	12 – 60	
Sexo	97			
- F		44 (56,4%)	34 (43,6%)	0,80 [‡]
- M		10 (52,6%)	09 (47,4%)	
Tamanho tumoral	90			
- micro		40 (54,1%)	34 (45,9%)	0,45 [‡]
- macro		11 (68,8%)	05 (31,2%)	
Hardy	90			
- grau 1		38 (54,3%)	32 (45,7%)	0,17 [‡]
- grau 2		09 (81,8%)	02 (18,2%)	
- grau 3		04 (44,4%)	05 (55,6%)	

F: feminino; M: masculino; Gly: glicina; Arg: arginina; [†] Teste de Mann-Whitney; [‡] Teste exato de Fisher; [§] Teste do qui-quadrado

A avaliação da evolução precoce (remissão) e tardia (recidiva) da doença de Cushing foi avaliada, entre homozigotos e não-homozigotos para o alelo glicina, assim como parâmetros pré- e pós-operatórios descritos na literatura como fatores prognósticos. Comparamos os pacientes que, após um ano da primeira cirurgia transesfenoidal, encontravam-se em remissão da doença de Cushing, em relação àqueles com persistência da doença. Não encontramos diferenças em relação à idade, sexo, tamanho tumoral e frequência de homozigose para o alelo glicina entre os grupos. Uma frequência significativamente maior de persistência da doença foi observada entre os pacientes classificados como Hardy grau 3 (75%), em relação aos pacientes Hardy grau 1 (29,5%) e grau 2 (0%) ($p = 0,006$) (Tabela 7). Na

avaliação das variáveis pós-operatórias, encontramos que tanto a confirmação imuno-histológica de adenoma produtor de ACTH, quanto os valores baixos de cortisol nas duas primeiras semanas do pós-operatório, foram associados significativamente à remissão (Tabela 7). Enquanto 76% dos pacientes com confirmação histológica e imunohistoquímica de tumor produtor de ACTH evoluíram com remissão da doença, apenas 53,8% dos pacientes sem confirmação do tumor evoluíram em remissão. Ainda, 94,4% dos pacientes com valores baixos de cortisol ($\leq 2 \mu\text{g/dL}$) no pós-operatório precoce alcançaram remissão vs. 42,1% daqueles com cortisol $> 2 \mu\text{g/dL}$.

Tabela 7. Comparação das diferentes variáveis entre pacientes com doença de Cushing com e sem remissão pós-operatória

Variável	N	Remissão	Persistência da doença	p
Idade, anos	76			
- Mediana		31	28,5	0,19 [†]
- Mín - Máx		12 – 60	13 – 52	
Sexo	76			
- F		43 (71,7%)	17 (28,3%)	0,24 [‡]
- M		09 (56,3%)	07 (43,7%)	
Tamanho tumoral	76			
- micro		44 (67,7%)	21 (32,3%)	1,0 [‡]
- macro		08 (72,7%)	03 (27,3%)	
Polimorfismo	76			
- GlyGly		33 (71,7%)	13 (28,3%)	0,44 [‡]
- GlyArg/ArgArg		19 (63,3%)	11 (36,7%)	
Hardy	76			
- grau 1		43 (70,5%)	18 (29,5%)	0,006 [‡]
- grau 2		07 (100%)	00	
- grau 3		02 (25%)	06 (75%)	
Confirmação histopatológica-IH	76			
- (+)		38 (76%)	12 (24%)	0,049 [‡]
- (-)		14 (53,8%)	12 (46,2%)	
Cortisol pós-operatório	72			
- $\leq 2 \text{ mcg/dl}$		32 (94,1%)	02 (5,9%)	0,0001 [‡]
- $> 2 \text{ mcg/dl}$		16 (42,1%)	22 (57,9%)	

F: feminino; M: masculino; Gly: glicina; Arg: arginina; [†] Teste de Mann-Whitney; [‡] Teste exato de Fisher; [‡] Teste do qui-quadrado

Comparamos também aqueles pacientes que persistiram em remissão pós-operatória com os que apresentaram recidiva da doença de Cushing. Nesta avaliação, a homozigose para o alelo glicina associou-se significativamente com a recidiva, dos 13 pacientes que recidivaram, 12 eram homozigotos para o alelo glicina ($p = 0,019$) (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação das diferentes variáveis entre pacientes que permaneceram em remissão e aqueles que recidivaram da doença de Cushing

Variáveis	N	Permanência em remissão	Recidiva	p
Idade, anos	52			
- Mediana		33,0	30,0	0,31 [†]
- Mín - Máx		15 – 60	12 – 48	
Sexo	52			
- F		35 (81,4%)	08 (18,6%)	0,033 [‡]
- M		04 (44,4%)	05 (55,6%)	
Tamanho tumoral	52			
- micro		35 (79,5%)	09 (20,5%)	0,096 [‡]
- macro		04 (50%)	04 (50%)	
Hardy	52			
- grau 1		35 (81,4%)	08 (18,6%)	0,017 [‡]
- grau 2		04 (57,1%)	03 (42,9%)	
- grau 3		00 (0%)	02 (100%)	
Polimorfismo	52			
- GlyGly		21 (63,6%)	12 (36,4%)	0,018 [‡]
- GlyArg/ArgArg		18 (94,7%)	01 (5,3%)	
Confirmação histopatológica	52			
- (+)		32 (84,2%)	06 (15,8%)	0,026 [‡]
- (-)		07 (50%)	07 (50%)	
Cortisol pós-operatório	48			
- ≤ 2mcg/dl		28 (87,5%)	04 (12,5%)	0,01 [‡]
- > 2 mcg/dl		08 (50%)	08 (50%)	

F: feminino; M: masculino; Gly: glicina; Arg: arginina; [†] Teste de Mann-Whitney; [‡] Teste exato de Fisher; [§] Teste do qui-quadrado

Observamos ainda uma frequência maior de recidiva entre os pacientes do sexo masculino (recidiva em 55,6% dos homens vs. 18,6% das mulheres inicialmente em remissão), naqueles classificados com maior grau

de Hardy (100% no Hardy grau 3 vs. 42,9% no grau 2 e 18,6% no grau 1), nos sem confirmação imuno-histológica do tumor (50% vs. 15,8%), e nos que apresentaram valores elevados de cortisol no pós-operatório (50% vs. 12,5%) (Tabela 8).

Avaliamos a curva de sobrevida livre de doença, para estimar a probabilidade de recidiva ao longo do tempo de evolução pós-operatória. A comparação entre os grupos Gly/Gly e Gly/Arg ou Arg/Arg, demonstrou que a presença do alelo glicina em homozigose foi um fator associado à redução da sobrevida livre de doença (HR, 6,91; IC95%, 1,14 a 11,26; $p = 0,028$) (Figura 18 e Tabela 10).

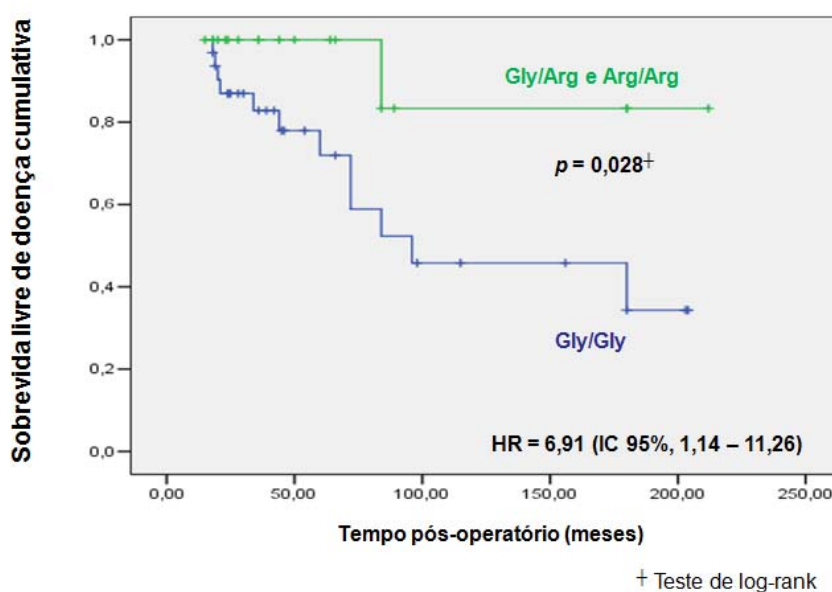


Figura 18. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier em pacientes em remissão da doença de Cushing homozigotos ou não-homozigotos para o alelo glicina. As curvas dos homozigotos glicina (Gly/Gly) e não homozigotos glicina (Gly/Arg e Arg/Arg) são mostrados em azul e verde, respectivamente. As pequenas cruzes mostram as observações censuradas. Análise de log-rank indica diferença significativa entre as curvas ($p = 0,029$).

O outro fator pré-operatório que foi preditivo de menor sobrevida livre de doença foi o sexo masculino ($p = 0,09$), assim como os dois fatores pós-operatórios, a não confirmação imuno-histológica do tumor ($p = 0,036$) e os valores de cortisol $> 2 \mu\text{g/dL}$ ($p < 0,0001$) (Tabela 10).

Tabela 9. Avaliação do risco de recidiva da doença de Cushing

	N	Hazard Ratio (IC 95%)	p[†]
Idade, anos	52		
- ≤ 25 anos		1	
- >25 anos		0,86 (0,28 – 2,63)	0,86
Sexo	52		
- F		1	
- M		3,85 (1,68 – 41,42)	0,009
Tamanho tumoral	52		
- micro		1	
- macro		2,20 (0,64 – 12,80)	0,16
Hardy	52		
- grau 1		1	
- grau 2		2,33 (0,56 – 18,02)	0,19
- grau 3		4,04 (0,97 – 210,6)	0,051
Polimorfismo	52		
- GlyGly		1	
- GlyArg/ArgArg		0,14 (0,08 – 0,87)	0,028
Confirmação histopatológica	52		
- (+)		1	
- (-)		2,98 (1,09 – 12,72)	0,03
Cortisol pós-operatório	48		
- $\leq 2\text{mcg/dl}$		1	
- $> 2 \text{ mcg/dl}$		8,82 (8,32 – 190,21)	$< 0,0001$

F: feminino; M: masculino; Gly: glicina; Arg: arginina; [†] Teste de Mann-Whitney; [‡] Teste exato de Fisher; [§] Teste do qui-quadrado; IC, intervalo de confiança; ⁺ teste de log-rank

5. Discussão

A doença de Cushing é uma doença rara, mas com um grande impacto na qualidade de vida e na mortalidade dos pacientes afetados (22, 24). Algumas características clínicas da doença de Cushing como idade, sexo e predomínio de microadenomas são concordantes entre diversas séries relatadas na literatura (11, 24, 149-151). No estudo de Hammer e cols. (24) que avaliaram 289 pacientes adultos submetidos à cirurgia transesfenoidal, a mediana de idade dos pacientes na época da cirurgia foi de 37 anos, predomínio do sexo feminino (83%) e a mediana do tamanho tumoral em 233 pacientes foi de 6 mm. Cerca de 25% dos tumores eram maiores que 1 cm, e em cerca de 20% dos casos havia descrição de perfuração do assoalho selar ou invasão para o seio cavernoso. Outro estudo, que avaliou pacientes brasileiros, relatou uma média de idade dos pacientes ao diagnóstico de 36,9 anos, 74% dos pacientes eram do sexo feminino e em 19,5% dos casos foi diagnosticado um macroadenoma (151).

O nosso estudo também apresentou predominância de adultos do sexo feminino e maior ocorrência de microadenomas. No entanto, foi observada uma frequência bem maior de macroadenomas do que os 4 a 10% comumente relatados na literatura (26, 28). As frequências encontradas poderiam estar superestimadas em relação à porcentagem real de macroadenomas na doença de Cushing por refletir a prática em grandes serviços terciários de saúde para onde os casos “mais difíceis” seriam encaminhados. Outro fator que pode contribuir para esta

divergência é a falta de padronização na classificação exata do tamanho do tumor, enquanto alguns autores consideram os adenomas de 10 mm como microadenomas (28), outros classificam como macro (80), e outros não especificam (24, 152).

A cirurgia transesfenoidal para exérese do tumor corticotrófico ainda é o tratamento de escolha para a doença de Cushing, mas os índices de falência ao tratamento podem variar cerca de 14% até 60% em alguns centros (24, 32, 38, 42). No nosso estudo o índice de remissão pós-cirúrgica foi de 68,4% (52 em 76 pacientes operados). Para esta avaliação de remissão incluímos apenas os casos operados no HCFMUSP para tentar reduzir a variabilidade nas taxas de remissão entre diferentes serviços. Além disso, devido à redução nas taxas de remissão em uma segunda ou eventualmente terceira cirurgia (29, 142), incluímos apenas os dados da primeira cirurgia realizada. A taxa de recorrência nos 52 pacientes que apresentaram remissão foi de 25% (13/52) após mediana de tempo de acompanhamento de 60 meses. Este índice é semelhante ao descrito em outros trabalhos (30, 32, 38).

Algumas características clínicas, hormonais e histopatológicas são descritas na literatura como associadas a um pior desfecho cirúrgico da doença de Cushing, a curto e longo prazo, entre elas, a presença de macroadenomas, sinais de invasão, idade jovem (< 25 anos), sexo masculino (24, 26, 32, 152). No entanto, outras características, são consideradas fatores prognósticos favoráveis: a detecção de um microadenoma na RM e ausência de sinais de invasão, confirmação

histológica de um tumor produtor de ACTH, baixos níveis de cortisol pós-operatório (24, 29, 30).

O conhecimento sobre os fatores que desempenham um papel no desenvolvimento dos corticotropinomas ou, que possam influenciar seu comportamento, ainda são restritos.

O estudo de expressão por PCR em tempo real vêm sendo utilizado para identificar características moleculares que possam apontar vias ou genes específicos com potencial prognóstico e terapêutico à determinada neoplasia. Além disso, os polimorfismos germinativos vêm sendo associados ao desenvolvimento e/ou progressão de uma variedade de tumores em humanos, bem como à resposta a tratamentos farmacológicos e radioterápicos. Deste modo, representam um alvo potencial no estudo da tumorigênese, com implicação prognóstica e/ou terapêutica.

O estudo de expressão por PCR em tempo real permite a avaliação da expressão mesmo quando pequenas quantidades de amostra estão disponíveis, como é o caso dos tumores corticotróficos. No entanto, para a obtenção de resultados confiáveis com o estudo por PCR em tempo real, uma normalização acurada é necessária (153, 154). Um dos primeiros e mais importantes passos é a determinação dos genes endógenos que serão utilizados para a normalização dos resultados dos genes alvo. Os genes endógenos estão presentes em todos os tipos celulares nucleados sendo, portanto, necessários para a sobrevivência celular. A síntese de RNAm desses genes é considerada estável em vários tecidos, mesmo sob condições experimentais. Contudo, numerosos estudos vêm demonstrando que genes

endógenos comumente utilizados podem ser regulados e variar consideravelmente em diferentes tecidos (148, 155). Vários grupos desenvolveram modelos estatísticos e programas para computadores para a avaliação da estabilidade dos genes endógenos (148, 156). O programa desenvolvido por Vandesompele e cols., nomeado geNorm, identifica a estabilidade de expressão dos genes endógenos baseado nos níveis de expressão não normalizados (148). No nosso estudo utilizamos a expressão de um gene alvo, o fator anti-apoptótico *Bcl-X_L*, para exemplificar como a escolha inapropriada do gene endógeno pode resultar em resultados contraditórios, em especial quando são avaliadas mudanças sutis nos níveis de expressão de um gene (154). O interesse no estudo deste fator nos corticotropinomas decorreu da demonstração que, em camundongos imunodeficientes, a inoculação de células AtT20 com indução da expressão do *Bcl-X_L* está associado ao desenvolvimento de tumores maiores e com crescimento mais acelerado (136). O gene *Bcl-X*, que codifica o transcrito *Bcl-X_L*, é conhecido por ter um importante papel na apoptose dependente de hormônios. O *Bcl-X* possui pelo menos cinco regiões promotoras (P1-P5) sendo que o promotor distal P4 do *Bcl-X* possui duas regiões com elementos responsivos aos hormônios, em particular glicocorticóides e progesterona (157). Em camundongos foi demonstrado que os glicocorticóides têm um efeito tecido específico na transcrição do *Bcl-X* : em células mamárias, os glicocorticóides aumentam a expressão do *Bcl-X_L* exercendo um efeito anti-apoptótico nas células (157), em contraste, em timócitos de murinos, os glicocorticóides induzem a apoptose por reduzir os níveis de *Bcl-X_L*(158). O

excesso de glicocorticóide presente nos pacientes com doença de Cushing pode, então, ter também um efeito na transcrição do *Bcl-X* reduzindo ou aumentando seus níveis neste tipo de tumor hipofisário.

No nosso estudo, a expressão do alvo *Bcl-X_L* normalizada para a média geométrica dos genes mais estáveis, *PGK-1*, *CYC* e *HPRT*, mostrou uma expressão normal na maioria dos tumores corticotróficos avaliados. Este resultado pode decorrer de um balanço entre vários reguladores agindo na região promotora do gene *Bcl-X*, entre eles o excesso de glicocorticóide e ação das isoformas da via Ikaros. Por outro lado resultados contraditórios foram obtidos quando genes endógenos menos estáveis foram utilizados para a normalização (Figura 14).

O aumento da expressão da soma de todas as isoformas do *Ikaros* (*Ik* total) foi detectado em uma parcela dos tumores estudados, no entanto, detectamos uma predominância desta elevação às custas das isoformas longas (*Ik1* + *Ik2*), e não das isoformas curtas que poderiam refletir, indiretamente, uma elevação da isoforma curta *Ik6*. Todos os estudos que avaliaram a expressão do *Ikaros* nos adenomas hipofisários incluíram poucos casos de corticotropinomas. No estudo de Zhu e cols. (135), que incluiu dois corticotropinomas, a expressão por RT-PCR do RNAm do *Ikaros* foi negativa nos dois casos. A avaliação por Western blotting da proteína *Ikaros* em 12 tumores hipofisários, realizada apenas em tumores *Pit-1* positivos e, portanto, não correspondendo a corticotropinomas, revelou uma relação densitométrica entre *Ik6* e *Ik1* variando de 0,26 a 0,72 compatível com menor expressão do *Ik6* em relação a *Ik1*. O estudo, por

imunohistoquímica, que encontrou expressão do Ikaros em 28 dos 50 tumores hipofisários avaliados não descreve se corticotropinomas foram incluídos na avaliação (107).

O outro gene que teve a expressão avaliada neste estudo foi o *FGFR4*. O papel na tumorigênese hipofisária dos FGFs/FGFRs têm sido extensivamente estudado nos últimos anos, principalmente após a descrição da expressão de uma isoforma N-terminal deletada do *FGFR4*, o pdt-*FGFR4*, nos tumores hipofisários (85). O potencial oncogênico desta isoforma foi demonstrada em modelos de camundongos transgênicos em que a expressão hipofisária do pdt-*FGFR4*, mas não do *FGFR4* intacto, resulta em formação tumoral. Esta isoforma tem localização citoplasmática e encontra-se constitutivamente fosforilada (85), e a inibição da atividade tirosina-quinase deste receptor resulta em redução do crescimento tumoral tornando-se um alvo terapêutico em potencial (108).

A expressão do *FGFR4* parece ter um papel importante no desenvolvimento e/ou progressão dos tumores humanos de localização hipofisária. A expressão da isoforma pdt-*FGFR4* não foi identificada na hipófise normal, mas foi demonstrada em estudo por RT-PCR em 40% dos tumores hipofisários de vários subtipos (85). Estudos por IH detectaram expressão citoplasmática do *FGFR4* em mais de 80% dos tumores gonadotróficos e não funcionantes *null cell* e em menos de 10% dos prolactinomas. Os tumores produtores de GH e ACTH com doença de Cushing apresentaram expressão positiva em cerca de 50% dos

casos (109). Demonstrou-se ainda a associação da expressão do pdt-*FGFR4* com tumores maiores (109) e mais invasivos (108, 110).

A presença da isoforma deletada do *FGFR4* nos tumores hipofisários já foi demonstrada por RT-PCR, IH e Western blotting. Este é o primeiro estudo em que é feita a quantificação do RNAm do *FGFR4* por PCR em tempo real.

Não encontramos associação entre a hiperexpressão do *FGFR4* e características clínicas como idade, sexo, tamanho tumoral e sinais de invasão (grau de Hardy modificado). Estes resultados são compatíveis com alguns trabalhos publicados (84, 85). Por outro lado, o trabalho de Qian e cols. (109) demonstrou uma correlação positiva entre o aumento de expressão do *FGFR4*, por um escore semi-quantitativo, e o tamanho tumoral. Os autores incluíram uma casuística maior e com vários subtipos de tumores hipofisários. Outro estudo, apenas com tumores produtores de GH, não encontrou associação entre a presença da isoforma pdt-*FGFR4* e o tamanho tumoral, mas houve uma associação com invasão do seio cavernoso (110). Não foi possível estabelecer uma associação entre a expressão do *FGFR4* e a presença de invasão nos tumores produtores de ACTH com doença de Cushing devido ao número pequeno de casos classificados como Hardy grau 3, na nossa casuística. No entanto, os dois tumores com sinais de invasão apresentavam expressão do *FGFR4* elevada.

Não há trabalhos publicados que estudaram a associação entre a expressão do *FGFR4* nos tumores hipofisários e a evolução pós-cirúrgica. A avaliação da evolução da doença de Cushing após a cirurgia

transesfenoidal, revelou uma associação do aumento da expressão do *FGFR4* com menores taxas de remissão pós-operatória do hipercortisolismo.

A associação entre a elevação da expressão do *FGFR4* e prognóstico tem sido avaliada também em outros tipos tumorais. Em melanomas a hiperexpressão do *FGFR4* associou-se significativamente com a redução da sobrevida global e da sobrevida livre de doença (115). Em pacientes com astrocitoma grau III a positividade para o *FGFR4* associou-se a uma sobrevida mais curta (159). Em carcinomas de mama, níveis mais elevados de *FGFR4* associaram-se a maior falência ao tratamento com tamoxifeno em pacientes com recorrência tumoral (160).

Sabe-se que o receptor FGFR4 ativado estimula várias vias de sinalização intracelular que controlam a proliferação, diferenciação, migração e sobrevida celular. Entre essas vias destacam-se a cascata de sinalização da MAPK e PI3K (89). A isoforma pdt- FGFR4 é constitutivamente fosforilada e demonstrou-se *in vitro* e *in vivo* que as células transfectadas com esta isoforma tinham maior capacidade de invasão que células controles (108).

Estas observações nos levam a especular que o aumento do *FGFR4* poderia se associar a microinvasões teciduais, que dificultariam a exérese completa dos tumores corticotróficos, sendo assim um fator permissivo para a persistência da doença.

No nosso estudo foi avaliada ainda a associação entre expressão do *FGFR4* e o genótipo do códon 388 deste gene, não sendo encontrada qualquer associação. A presença do genótipo arginina é associada ao aumento do RNAm do *FGFR4* em linhagens de células malignas mamárias e

gliomas (111, 120). No entanto, o mesmo achado não foi confirmado por outros autores. Em um estudo em tecidos pulmonares normais a expressão do *FGFR4* por PCR em tempo real não diferiu entre os diferentes genótipos do polimorfismo G388R (113).

O genótipo do polimorfismo G388R vem sendo frequentemente avaliado como fator prognóstico em diferentes tumores humanos. Bange e cols. (111), em 2002, descreveram este polimorfismo germinativo, e associaram a heterozigose ou homozigose do alelo arginina à doença mais avançada em carcinomas de mama e cólon. Foi observada uma associação da presença da arginina com pior prognóstico em tumores de próstata (95), pulmonar (113), carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (115), sarcoma de tecido mole de alto grau (116). Outros autores, no entanto, não encontraram resultados semelhantes, mesmo estudando os mesmos tipos tumorais (117, 118). Posteriormente, foi demonstrado o efeito positivo do alelo arginina na progressão da doença parece resultar da perda da atividade supressora exercida pelo alelo glicina (121).

Não há estudos de associação deste polimorfismo com o risco ou prognóstico nos tumores hipofisários corticotróficos. Para tanto, a genotipagem deste polimorfismo foi realizada, bem como a coleta de dados pré e pós-operatórios previamente associados ao desfecho cirúrgico da doença de Cushing. Entre os fatores pré-operatórios, encontramos associação apenas da presença de sinais de invasão (Hardy grau 3) com a persistência da doença de Cushing. As duas variáveis pós-operatórias avaliadas (confirmação imuno-histológica do tumor e os valores baixos de

cortisol no pós-operatório precoce) também foram associadas à remissão. No estudo de Hammer e cols. (24), a avaliação por regressão logística encontrou que não apenas um estágio maior (mais invasivo), mas também o sexo masculino e o maior tamanho tumoral associaram-se a um desfecho pior (24). A frequência que encontramos de persistência da doença no sexo masculino foi maior (43,7% vs. 28,3%, em homens vs. mulheres), mas sem alcançar significância estatística.

Surpreendentemente, encontramos uma associação significativa do alelo glicina em homozigose com maior frequência de recidiva pós-operatória, sendo um fator prognóstico associado à menor sobrevida livre de doença. Este achado difere dos resultados encontrados em estudos prévios em outros tipos de tumores, em geral malignos, em que a presença do alelo arginina em hetero- ou homozigose foi associada com pior prognóstico (111, 113, 116). Atualmente, apenas um estudo encontrou associação semelhante ao nosso estudo, entre a homozigose para o alelo glicina e maior risco de recorrência do câncer de bexiga (161). A possibilidade de um efeito tecido específico do polimorfismo foi questionada, baseada em achados de alterações genéticas específicas a determinados tecidos (162), outra possibilidade é um resultado falso positivo devido ao pequeno número de casos de recorrência no grupo estudado (161). No nosso estudo o número de pacientes do grupo recidiva também foi pequeno (N = 13). Outro estudo que avaliou biópsias de carcinoma de cabeça e pescoço encontrou maior risco de carcinoma da cavidade oral entre os homozigotos para o alelo glicina (163). No nosso

estudo não foi observado maior risco de doença de Cushing entre os homozigotos glicina.

Outras variáveis que, no nosso estudo, se associaram à recidiva da doença de Cushing foram: o maior grau de Hardy modificado, o sexo masculino, a não confirmação histopatológica do tumor e o cortisol > 2 µg/dL nas duas primeiras semanas do pós-operatório. As três últimas variáveis foram ainda significativamente associadas à menor sobrevida livre de doença.

Em resumo, este estudo avaliou a expressão de genes potencialmente envolvidos no desenvolvimento e/ou progressão dos tumores produtores de ACTH. Avaliou ainda, em um grupo de 97 pacientes com doença de Cushing, o papel do genótipo do códon 388 do gene *FGFR4* no prognóstico pós-operatório da doença de Cushing (remissão e recidiva). Nossos resultados indicam que a expressão elevada do *FGFR4* nos tumores corticotróficos pode estar associada a um menor índice de remissão pós-operatória da doença de Cushing. Além disso, observamos que o alelo glicina em homozigose associou-se, a longo prazo, a um pior desfecho pós-cirúrgico.

Critérios clínicos, hormonais ou moleculares que possam indicar quais pacientes estão em maior risco de recorrência podem ser de grande importância prognóstica na doença de Cushing, direcionando para uma maior ou menor agressividade da terapêutica a ser utilizada, ou mesmo, determinando ou não a necessidade de acompanhamento intensivo. Além disso, o maior conhecimento das vias envolvidas no desenvolvimento e/ou progressão dos corticotropinomas, podem revelar alvos terapêuticos potenciais, alternativos ao tratamento cirúrgico.

6. Conclusões

1. Não identificamos, por PCR em tempo real, alterações frequentes de expressão do fator antiapoptótico Bcl-X_L ou das isoformas curtas dos fatores de transcrição Ikaros nos tumores hipofisários produtores de ACTH.
2. Expressão elevada do RNAm do *FGFR4* foi detectada em aproximadamente 50% dos tumores corticotróficos associados à doença de Cushing, e este aumento de expressão foi associado com menor frequência de remissão da doença de Cushing após a cirurgia transesfenoidal.
3. Não encontramos diferenças na expressão do *FGFR4* nos tumores homozigotos ou não homozigotos para o alelo glicina do polimorfismo G388R.
4. A distribuição genotípica do polimorfismo G388R foi semelhante entre pacientes e controles. Não houve associação do alelo glicina em homozigose com a remissão pós-operatória da doença, no entanto, o genótipo Gly/Gly associou-se significativamente com maior chance de recidiva da doença.

7. Anexos

Anexo A. Polimorfismo G388R e evolução dos diversos tipos de câncer, relação com níveis de expressão do FGFR4 e achados de cultura celular

Tipos de Câncer	N	Polimorfismo G388R X Evolução	Expressão do <i>FGFR4</i> Achados em cultura de células
Mama e Colorretal (111)	84	Redução da sobrevida livre de doença em pacientes que apresentavam presença de linfonodos ao diagnóstico	Genótipo Arg – aumento de expressão <i>FGFR4</i> em cultura de células
Sarcoma tecidos moles e ósseos (116)	143	Metástase linfonodal precoce e TNM mais avançado Redução da sobrevida livre de doença e sobrevida global no Sarcoma de tecido mole Não encontrada associação em sarcomas ósseos	Redução na migração das céls Gly/Gly - NR
Próstata (95)	244	Aumento de 4x na incidência em pacientes Arg/Arg Correlação com presença de linfonodo na época da prostatectomia e recorrência do PSA	IHC/RT-PCR: aumento da expressão do <i>FGFR4</i> em carcinomas Células Gly/Gly formaram colônias circulares
HNSCC (114)	104	Em pacientes com expressão elevada de <i>FGFR4</i> , o alelo Arg associou-se a sobrevida mais curta e TNM avançado	Não encontrou associação entre o tipo alélico e expressão do <i>FGFR4</i> (IHC)
ADCA pulmonar (113)	274	Associação com idade mais precoce início do câncer, proporção de doença avançada, envolvimento linfonodal, sobrevida mais curta	Em tecidos normais não encontrou associação entre expressão (real-time) e genótipo
Melanoma (115)	137	Associou-se a espessamento tumoral (representa nível de invasão) e subtipo tumoral nodular	IHC positiva associou-se a: estágio TNM, presença de microulceração, vascularização, metástases, número de tumores primários e sobrevida

Continua...

Anexo A. Polimorfismo G388R e evolução dos diversos tipos de câncer, relação com níveis de expressão do *FGFR4* e achados de cultura celular (conclusão)

Tipos de Câncer	N	Polimorfismo G388R X Evolução	Expressão do <i>FGFR4</i> Achados em cultura de células
Gliomas malignos (120)	64	Sem associação com sobrevida, mas na análise de regressão de Cox quando ajustado para idade os pacientes Gly/Arg tiveram uma tendência à maior sobrevida que os Gly/Gly ($p = 0,053$)	Maiores níveis de expressão nos pacientes Gly/Arg por PCR real-time, mas não por IHC Não encontrou maior invasão em cultura celular
Mama e Cólon (117)	142 179	Sem associação com pior prognóstico	NR
Próstata (119)	1458	Sem associação com pior prognóstico	NR
Bexiga (161)	125	Pacientes Gly/Gly com mutação do <i>p53</i> têm redução de sobrevida	NR
HNSCC (163)	110	Associação entre Gly/Gly e maior risco de desenvolver a doença	NR

N, número de pacientes estudados; Arg, arginina; Gly, glicina; HNSCC, Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço; ADCA pulmonar, Adenocarcinoma pulmonar; IHC, imunohistoquímica; TNM, estadiamento tumor/linfonodos/metástases; NR, não realizado; PSA, antígeno prostático; Cél, células.

Anexo B. Características clínicas, hormonais e histopatológicas dos 20 pacientes com tumores produtores de ACTH selecionados para o estudo de expressão por PCR em tempo real (continuação)

	Idade (anos)	Sexo	Tamanho Tumoral	Hardy	ACTH pré-op (< 80 pg/mL)	CUT pré-op (30-300 µg/24h)	Descrição cirúrgica	IH ACTH	Evolução pós-op
1	34	F	m	1	84,5	969,3	ND ¹	>50%	Remissão
2	18	F	m	1	68,6	446,0	VR ¹	>50%	Remissão
3	46	F	m	1	177,5*	1679,5	VR ¹	>50%	Remissão
4	15	M	m	1	168	729,5	VR ¹	>50%	Remissão
5	25	F	m	1	100,5*	974,6	VR ¹	>50%	Remissão
6	33	F	m	1	102*	471,6	VR ¹	>50%	Remissão
7	54	F	m	1	116*	446,0	VR	>50%	Remissão
8	34	F	m	1	89,5	780,5	VR ¹	>50%	Remissão
9	48	F	m	1	43 [#]	818,0	VR ¹	>50%	Remissão
10	18	M	M	2	142,5	1065,0	VR ¹	>50%	Remissão
11	24	F	M	2	68,4	442,5	VR ¹	>50%	Remissão
12	39	F	M	2	84	531,5	VR	>50%	Remissão
13	17	F	m	1	34*	676,0	VR ¹	>50%	Doença persistente
14	46	F	m	1	68,5*	698,3	VR ¹	>50%	Doença persistente
15	13	M	m	1	102,5*	1538,0	VR	10-50%	Doença persistente
16	24	F	m	3	207	2320,0	VR ¹	>50%	Doença persistente
17	26	F	M	3	100 [#]	541,0	I ¹	>50%	Doença persistente

Continua...

Anexo B. Características clínicas, hormonais e histopatológicas dos 20 pacientes com tumores produtores de ACTH selecionados para o estudo de expressão por PCR em tempo real (conclusão).

Idade (anos)	Sexo	Tamanho Tumoral (cm)	Hardy	ACTH pré-op (<80pg/mL)	CUT pré-op (30- 300µg/24h)	Descrição cirúrgica	IH ACTH	Evolução pós-op	
18	26	F	m	1	50	680	VR	>50%	ND
19	35	F	SN	NA	NA	NA	NA	>50%	NA
20	47	M	SN	NA	NA	NA	NA	>50%	NA

SN, Síndrome de Nelson; IH, Imunohistoquímica; ND, Não disponível; NA, Não aplicável; m, Microadenoma (< 1 cm); M, Macroadenoma (≥ 1 cm); ACTH, hormônio adrenocorticotófico (Imunoradiométrico CIS < 80pg/ml, * Imunoradiométrico < 60pg/ml, # Quimioluminométrico < 46pg/ml); CUT, Cortisol urinário total (Fluorimétrico sem extração prévia); VR, tumor visualizado e ressecado; I, sinais de infiltração; ¹ realizadas pelo mesmo cirurgião

8. Referências

1. Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(11):1603-18.
2. Scully KM, Rosenfeld MG. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science*. 2002 Mar 22;295(5563):2231-5.
3. 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.
4. Kovacs K, Horvath E. Pathology of pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1987 Sep;16(3):529-51.
5. Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat Rev Cancer*. 2002 Nov;2(11):836-49.
6. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*. 2004 Aug 1;101(3):613-9.
7. Orth DN. Cushing's syndrome. *N Engl J Med*. 1995 Mar 23;332(12):791-803.
8. Boscaro M, Barzon L, Fallo F, Sonino N. Cushing's syndrome. *Lancet*. 2001 Mar 10;357(9258):783-91.
9. Ilias I, Torpy DJ, Pacak K, Mullen N, Wesley RA, Nieman LK. Cushing's syndrome due to ectopic corticotropin secretion: twenty years' experience at the National Institutes of Health. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Aug;90(8):4955-62.
10. Isidori AM, Kaltsas GA, Pozza C, Frajese V, Newell-Price J, Reznick RH, et al. The ectopic adrenocorticotropin syndrome: clinical features, diagnosis, management, and long-term follow-up. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Feb;91(2):371-7.
11. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet*. 2006 May 13;367(9522):1605-17.
12. Ross EJ, Linch DC. Cushing's syndrome--killing disease: discriminatory value of signs and symptoms aiding early diagnosis. *Lancet*. 1982 Sep 18;2(8299):646-9.
13. Magiakou MA, Mastorakos G, Oldfield EH, Gomez MT, Doppman JL, Cutler GB, Jr., et al. Cushing's syndrome in children and adolescents. Presentation, diagnosis, and therapy. *N Engl J Med*. 1994 Sep 8;331(10):629-36.

14. Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, et al. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Dec;88(12):5593-602.
15. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 May;93(5):1526-40.
16. Hall WA, Luciano MG, Doppman JL, Patronas NJ, Oldfield EH. Pituitary magnetic resonance imaging in normal human volunteers: occult adenomas in the general population. *Ann Intern Med.* 1994 May 15;120(10):817-20.
17. Invitti C, Pecori Giraldi F, de Martin M, Cavagnini F. Diagnosis and management of Cushing's syndrome: results of an Italian multicentre study. Study Group of the Italian Society of Endocrinology on the Pathophysiology of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Feb;84(2):440-8.
18. Lindsay JR, Nieman LK. Differential diagnosis and imaging in Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005 Jun;34(2):403-21, x.
19. Oldfield EH, Doppman JL, Nieman LK, Chrousos GP, Miller DL, Katz DA, et al. Petrosal sinus sampling with and without corticotropin-releasing hormone for the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *N Engl J Med.* 1991 Sep 26;325(13):897-905.
20. Trainer PJ, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1991 Apr;34(4):317-30.
21. 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.
22. Etxabe J, Vazquez JA. Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994 Apr;40(4):479-84.
23. Ambrosi B, Bochicchio D, Ferrario R, Colombo P, Faglia G. Screening tests for Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1990 Dec;33(6):809-11.
24. Hammer GD, Tyrrell JB, Lamborn KR, Applebury CB, Hannegan ET, Bell S, et al. Transsphenoidal microsurgery for Cushing's disease: initial outcome and long-term results. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Dec;89(12):6348-57.
25. Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev.* 1998 Oct;19(5):647-72.

26. Woo YS, Isidori AM, Wat WZ, Kaltsas GA, Afshar F, Sabin I, et al. Clinical and biochemical characteristics of adrenocorticotropin-secreting macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Aug;90(8):4963-9.
27. Cannavo S, Almoto B, Dall'Asta C, Corsello S, Lovicu RM, De Menis E, et al. Long-term results of treatment in patients with ACTH-secreting pituitary macroadenomas. *Eur J Endocrinol.* 2003 Sep;149(3):195-200.
28. Katznelson L, Bogan JS, Trob JR, Schoenfeld DA, Hedley-Whyte ET, Hsu DW, et al. Biochemical assessment of Cushing's disease in patients with corticotroph macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 May;83(5):1619-23.
29. Biller BM, Grossman AB, Stewart PM, Melmed S, Bertagna X, Bertherat J, et al. Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jul;93(7):2454-62.
30. Patil CG, Prevedello DM, Lad SP, Vance ML, Thorner MO, Katznelson L, et al. Late recurrences of Cushing's disease after initial successful transsphenoidal surgery. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Feb;93(2):358-62.
31. Benbassat CA, Tsvetov G, Shefet D, Weinstein R, Rappaport ZH. [Cushing disease: long-term follow-up after transsphenoidal surgery]. *Harefuah.* 2004 Sep;143(9):636-8, 96, 95.
32. Sonino N, Zielesny M, Fava GA, Fallo F, Boscaro M. Risk factors and long-term outcome in pituitary-dependent Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Jul;81(7):2647-52.
33. Czepielewski MA, Rollin GA, Casagrande A, Ferreira NP. Criteria of cure and remission in Cushing's disease: an update. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Nov;51(8):1362-72.
34. Rollin GA, Ferreira NP, Junges M, Gross JL, Czepielewski MA. Dynamics of serum cortisol levels after transsphenoidal surgery in a cohort of patients with Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Mar;89(3):1131-9.
35. Esposito F, Dusick JR, Cohan P, Moftakhar P, McArthur D, Wang C, et al. Clinical review: Early morning cortisol levels as a predictor of remission after transsphenoidal surgery for Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jan;91(1):7-13.
36. Trainer PJ, Lawrie HS, Verhelst J, Howlett TA, Lowe DG, Grossman AB, et al. Transsphenoidal resection in Cushing's disease: undetectable serum cortisol as the definition of successful treatment. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1993 Jan;38(1):73-8.

37. Rees DA, Hanna FW, Davies JS, Mills RG, Vafidis J, Scanlon MF. Long-term follow-up results of transsphenoidal surgery for Cushing's disease in a single centre using strict criteria for remission. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002 Apr;56(4):541-51.
38. Atkinson AB, Kennedy A, Wiggam MI, McCance DR, Sheridan B. Long-term remission rates after pituitary surgery for Cushing's disease: the need for long-term surveillance. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 Nov;63(5):549-59.
39. Valero R, Vallette-Kasic S, Conte-Devolx B, Jaquet P, Brue T. The desmopressin test as a predictive factor of outcome after pituitary surgery for Cushing's disease. *Eur J Endocrinol*. 2004 Dec;151(6):727-33.
40. Vignati F, Berselli ME, Loi P. Early postoperative evaluation in patients with Cushing's disease: usefulness of ovine corticotropin-releasing hormone test in the prediction of recurrence of disease. *Eur J Endocrinol*. 1994 Mar;130(3):235-41.
41. Estrada J, Garcia-Uria J, Lamas C, Alfaro J, Lucas T, Diez S, et al. The complete normalization of the adrenocortical function as the criterion of cure after transsphenoidal surgery for Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Dec;86(12):5695-9.
42. Bochicchio D, Losa M, Buchfelder M. Factors influencing the immediate and late outcome of Cushing's disease treated by transsphenoidal surgery: a retrospective study by the European Cushing's Disease Survey Group. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Nov;80(11):3114-20.
43. Minniti G, Brada M. Radiotherapy and radiosurgery for Cushing's disease. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Nov;51(8):1373-80.
44. Assie G, Baharel H, Bertherat J, Kujas M, Legmann P, Bertagna X. The Nelson's syndrome... revisited. *Pituitary*. 2004;7(4):209-15.
45. Dang CN, Trainer P. Pharmacological management of Cushing's syndrome: an update. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Nov;51(8):1339-48.
46. Nieman LK. Medical therapy of Cushing's disease. *Pituitary*. 2002;5(2):77-82.
47. Pivonello R, De Martino MC, Cappabianca P, De Leo M, Faggiano A, Lombardi G, et al. The medical treatment of Cushing's disease: effectiveness of chronic treatment with the dopamine agonist cabergoline in patients unsuccessfully treated by surgery. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jan;94(1):223-30.
48. Labeur M, Theodoropoulou M, Sievers C, Paez-Pereda M, Castillo V, Arzt E, et al. New aspects in the diagnosis and treatment of Cushing disease. *Front Horm Res*. 2006;35:169-78.

49. van der Hoek J, Lamberts SW, Hofland LJ. The role of somatostatin analogs in Cushing's disease. *Pituitary*. 2004;7(4):257-64.
50. Dahia PL, Grossman AB. The molecular pathogenesis of corticotroph tumors. *Endocr Rev*. 1999 Apr;20(2):136-55.
51. Asa SL, Kovacs K, Stefaneanu L, Horvath E, Billestrup N, Gonzalez-Manchon C, et al. Pituitary adenomas in mice transgenic for growth hormone-releasing hormone. *Endocrinology*. 1992 Nov;131(5):2083-9.
52. Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*. 1992 Sep 24;359(6393):295-300.
53. 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.
54. 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.
55. Molitch ME. Pathogenesis of pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1987 Sep;16(3):503-27.
56. Biller BM, Alexander JM, Zervas NT, Hedley-Whyte ET, Arnold A, Klibanski A. Clonal origins of adrenocorticotropin-secreting pituitary tissue in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 Nov;75(5):1303-9.
57. Gicquel C, Le Bouc Y, Luton JP, Girard F, Bertagna X. Monoclonality of corticotroph macroadenomas in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 Aug;75(2):472-5.
58. Nelson DH, Meakin JW, Thorn GW. ACTH-producing pituitary tumors following adrenalectomy for Cushing's syndrome. *Ann Intern Med*. 1960 Mar;52:560-9.
59. Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev*. 1998 Dec;19(6):798-827.
60. Pei L, Melmed S, Scheithauer B, Kovacs K, Prager D. H-ras mutations in human pituitary carcinoma metastases. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Apr;78(4):842-6.
61. Ikeda H, Yoshimoto T. The relationship between c-myc protein expression, the bromodeoxyuridine labeling index and the biological behavior of pituitary adenomas. *Acta Neuropathol*. 1992;83(4):361-4.

62. Alvaro V, Levy L, Dubray C, Roche A, Peillon F, Querat B, et al. Invasive human pituitary tumors express a point-mutated alpha-protein kinase-C. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Nov;77(5):1125-9.
63. 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.
64. Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, et al. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Feb;84(2):761-7.
65. Buckley N, Bates AS, Broome JC, Strange RC, Perrett CW, Burke CW, et al. p53 Protein accumulates in Cushing's adenomas and invasive non-functional adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Nov;79(5):1513-6.
66. Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, et al. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell.* 1996 May 31;85(5):721-32.
67. Dahia PL, Aguiar RC, Honegger J, Fahlbush R, Jordan S, Lowe DG, et al. Mutation and expression analysis of the p27/kip1 gene in corticotrophin-secreting tumours. *Oncogene.* 1998 Jan 8;16(1):69-76.
68. Lidhar K, Korbonits M, Jordan S, Khalimova Z, Kaltsas G, Lu X, et al. Low expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;84(10):3823-30.
69. Jin L, Qian X, Kulig E, Sanno N, Scheithauer BW, Kovacs K, et al. Transforming growth factor-beta, transforming growth factor-beta receptor II, and p27Kip1 expression in nontumorous and neoplastic human pituitaries. *Am J Pathol.* 1997 Aug;151(2):509-19.
70. Lloyd RV, Jin L, Qian X, Kulig E. Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol.* 1997 Feb;150(2):401-7.
71. Theodoropoulou M, Arzberger T, Gruebler Y, Jaffrain-Rea ML, Schlegel J, Schaaf L, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in neoplastic pituitary cells: evidence for a role in corticotropinoma cells. *J Endocrinol.* 2004 Nov;183(2):385-94.
72. Boggild MD, Jenkinson S, Pistorello M, Boscaro M, Scanarini M, McTernan P, et al. Molecular genetic studies of sporadic pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Feb;78(2):387-92.

73. Prezant TR, Levine J, Melmed S. Molecular characterization of the men1 tumor suppressor gene in sporadic pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Apr;83(4):1388-91.
74. 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.
75. Karl M, Von Wichert G, Kempter E, Katz DA, Reincke M, Monig H, et al. Nelson's syndrome associated with a somatic frame shift mutation in the glucocorticoid receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Jan;81(1):124-9.
76. 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.
77. Huizenga NA, de Lange P, Koper JW, Clayton RN, Farrell WE, van der Lely AJ, et al. Human adrenocorticotropin-secreting pituitary adenomas show frequent loss of heterozygosity at the glucocorticoid receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Mar;83(3):917-21.
78. Dahia PL, Honegger J, Reincke M, Jacobs RA, Mirtella A, Fahlbusch R, et al. Expression of glucocorticoid receptor gene isoforms in corticotropin-secreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Apr;82(4):1088-93.
79. Bilodeau S, Vallette-Kasic S, Gauthier Y, Figarella-Branger D, Brue T, Berthelet F, et al. Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev.* 2006 Oct 15;20(20):2871-86.
80. 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.
81. Childs GV, Rougeau D, Unabia G. Corticotropin-releasing hormone and epidermal growth factor: mitogens for anterior pituitary corticotropes. *Endocrinology.* 1995 Apr;136(4):1595-602.
82. Giacomini D, Paez-Pereda M, Theodoropoulou M, Labeur M, Refojo D, Gerez J, et al. Bone morphogenetic protein-4 inhibits corticotroph tumor cells: involvement in the retinoic acid inhibitory action. *Endocrinology.* 2006 Jan;147(1):247-56.
83. Donangelo I, Melmed S. Implication of pituitary tropic status on tumor development. *Front Horm Res.* 2006;35:1-8.

84. Abbass SA, Asa SL, Ezzat S. Altered expression of fibroblast growth factor receptors in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Apr;82(4):1160-6.
85. Ezzat S, Zheng L, Zhu XF, Wu GE, Asa SL. Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4 recapitulates pituitary tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2002 Jan;109(1):69-78.
86. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001;2(3):REVIEWS3005.
87. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer.* 2000 Sep;7(3):165-97.
88. Ezzat S, Asa SL. FGF receptor signaling at the crossroads of endocrine homeostasis and tumorigenesis. *Horm Metab Res.* 2005 Jun;37(6):355-60.
89. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Apr;16(2):139-49.
90. Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res.* 1992;59:115-65.
91. Hughes SE. Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *J Histochem Cytochem.* 1997 Jul;45(7):1005-19.
92. Lemmon MA, Schlessinger J. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci.* 1994 Nov;19(11):459-63.
93. Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature.* 1995 Feb 16;373(6515):573-80.
94. Givol D, Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *Faseb J.* 1992 Dec;6(15):3362-9.
95. Wang J, Stockton DW, Ittmann M. The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clin Cancer Res.* 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6169-78.
96. St Bernard R, Zheng L, Liu W, Winer D, Asa SL, Ezzat S. Fibroblast growth factor receptors as molecular targets in thyroid carcinoma. *Endocrinology.* 2005 Mar;146(3):1145-53.
97. Wilkie AO. Craniosynostosis: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet.* 1997;6(10):1647-56.

98. Jang JH, Shin KH, Park JG. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res.* 2001 May 1;61(9):3541-3.
99. Popovici C, Adelaide J, Ollendorff V, Chaffanet M, Guasch G, Jacrot M, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 is fused to FIM in stem-cell myeloproliferative disorder with t(8;13). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 12;95(10):5712-7.
100. Lorenzi MV, Horii Y, Yamanaka R, Sakaguchi K, Miki T. FRAG1, a gene that potently activates fibroblast growth factor receptor by C-terminal fusion through chromosomal rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 20;93(17):8956-61.
101. De Moerlooze L, Spencer-Dene B, Revest J, Hajihosseini M, Rosewell I, Dickson C. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development.* 2000 Feb;127(3):483-92.
102. Ericson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development.* 1998 Mar;125(6):1005-15.
103. Ezzat S. The role of hormones, growth factors and their receptors in pituitary tumorigenesis. *Brain Pathol.* 2001 Jul;11(3):356-70.
104. Ezzat S, Zheng L, Asa SL. Pituitary tumor-derived fibroblast growth factor receptor 4 isoform disrupts neural cell-adhesion molecule/N-cadherin signaling to diminish cell adhesiveness: a mechanism underlying pituitary neoplasia. *Mol Endocrinol.* 2004 Oct;18(10):2543-52.
105. Ezzat S, Smyth HS, Ramyar L, Asa SL. Heterogenous in vivo and in vitro expression of basic fibroblast growth factor by human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Mar;80(3):878-84.
106. Zimering MB, Katsumata N, Sato Y, Brandi ML, Aurbach GD, Marx SJ, et al. Increased basic fibroblast growth factor in plasma from multiple endocrine neoplasia type 1: relation to pituitary tumor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 May;76(5):1182-7.
107. Ezzat S, Yu S, Asa SL. Ikaros isoforms in human pituitary tumors: distinct localization, histone acetylation, and activation of the 5' fibroblast growth factor receptor-4 promoter. *Am J Pathol.* 2003 Sep;163(3):1177-84.
108. Ezzat S, Zheng L, Winer D, Asa SL. Targeting N-cadherin through fibroblast growth factor receptor-4: distinct pathogenetic and therapeutic implications. *Mol Endocrinol.* 2006 Nov;20(11):2965-75.

109. Qian ZR, Sano T, Asa SL, Yamada S, Horiguchi H, Tashiro T, et al. Cytoplasmic expression of fibroblast growth factor receptor-4 in human pituitary adenomas: relation to tumor type, size, proliferation, and invasiveness. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Apr;89(4):1904-11.
110. Morita K, Takano K, Yasufuku-Takano J, Yamada S, Teramoto A, Takei M, et al. Expression of pituitary tumour-derived, N-terminally truncated isoform of fibroblast growth factor receptor 4 (ptd-FGFR4) correlates with tumour invasiveness but not with G-protein alpha subunit (gsp) mutation in human GH-secreting pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008 Mar;68(3):435-41.
111. Bange J, Pechtl D, Cheburkin Y, Specht K, Harbeck N, Schmitt M, et al. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res.* 2002 Feb 1;62(3):840-7.
112. Zhiyong M. Polymorphisms of fibroblast growth factor receptor 4 have association with the development of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia and the progression of prostate cancer in a Japanese population. *Int J Cancer.* 2008;123:6.
113. Spinola M, Leoni V, Pignatiello C, Conti B, Ravagnani F, Pastorino U, et al. Functional FGFR4 Gly388Arg polymorphism predicts prognosis in lung adenocarcinoma patients. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 10;23(29):7307-11.
114. Streit S, Bange J, Fichtner A, Ihrler S, Issing W, Ullrich A. Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2004 Aug 20;111(2):213-7.
115. Streit S, Mestel DS, Schmidt M, Ullrich A, Berking C. FGFR4 Arg388 allele correlates with tumour thickness and FGFR4 protein expression with survival of melanoma patients. *Br J Cancer.* 2006 Jun 19;94(12):1879-86.
116. Morimoto Y, Ozaki T, Ouchida M, Umehara N, Ohata N, Yoshida A, et al. Single nucleotide polymorphism in fibroblast growth factor receptor 4 at codon 388 is associated with prognosis in high-grade soft tissue sarcoma. *Cancer.* 2003 Nov 15;98(10):2245-50.
117. Spinola M, Leoni VP, Tanuma J, Pettinicchio A, Frattini M, Signoroni S, et al. FGFR4 Gly388Arg polymorphism and prognosis of breast and colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2005 Aug;14(2):415-9.
118. Jezequel P, Champion L, Joalland MP, Millour M, Dravet F, Classe JM, et al. G388R mutation of the FGFR4 gene is not relevant to breast cancer prognosis. *Br J Cancer.* 2004 Jan 12;90(1):189-93.
119. Fitzgerald LM, Karlins E, Karyadi DM, Kwon EM, Koopmeiners JS, Stanford JL, et al. Association of FGFR4 genetic polymorphisms with prostate cancer risk and prognosis. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2008 Sep 2.

120. Mawrin C, Kirches E, Diете S, Wiedemann FR, Schneider T, Firsching R, et al. Analysis of a single nucleotide polymorphism in codon 388 of the FGFR4 gene in malignant gliomas. *Cancer Lett.* 2006 Aug 8;239(2):239-45.
121. Stadler CR, Knyazev P, Bange J, Ullrich A. FGFR4 GLY388 isotype suppresses motility of MDA-MB-231 breast cancer cells by EDG-2 gene repression. *Cell Signal.* 2006 Jun;18(6):783-94.
122. Yu S, Asa SL, Ezzat S. Fibroblast growth factor receptor 4 is a target for the zinc-finger transcription factor Ikaros in the pituitary. *Mol Endocrinol.* 2002 May;16(5):1069-78.
123. Cortes M, Wong E, Koipally J, Georgopoulos K. Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr Opin Immunol.* 1999 Apr;11(2):167-71.
124. Molnar A, Wu P, Largespada DA, Vortkamp A, Scherer S, Copeland NG, et al. The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. *J Immunol.* 1996 Jan 15;156(2):585-92.
125. Georgopoulos K, Winandy S, Avitahl N. The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:155-76.
126. Winandy S, Wu P, Georgopoulos K. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell.* 1995 Oct 20;83(2):289-99.
127. Sun L, Liu A, Georgopoulos K. Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *Embo J.* 1996 Oct 1;15(19):5358-69.
128. Chrousos GP, Kino T. Ikaros transcription factors: flying between stress and inflammation. *J Clin Invest.* 2005 Apr;115(4):844-8.
129. Rebollo A, Schmitt C. Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunol Cell Biol.* 2003 Jun;81(3):171-5.
130. Sun L, Crotty ML, Sensel M, Sather H, Navara C, Nachman J, et al. Expression of dominant-negative Ikaros isoforms in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 1999 Aug;5(8):2112-20.
131. Nishii K, Katayama N, Miwa H, Shikami M, Usui E, Masuya M, et al. Non-DNA-binding Ikaros isoform gene expressed in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2002 Jul;16(7):1285-92.

132. Nakayama H, Ishimaru F, Avitahl N, Sezaki N, Fujii N, Nakase K, et al. Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 1999 Aug 15;59(16):3931-4.
133. Yu S, Asa SL, Weigel RJ, Ezzat S. Pituitary tumor AP-2alpha recognizes a cryptic promoter in intron 4 of fibroblast growth factor receptor 4. *J Biol Chem.* 2003 May 30;278(22):19597-602.
134. Ezzat S, Mader R, Yu S, Ning T, Poussier P, Asa SL. Ikaros integrates endocrine and immune system development. *J Clin Invest.* 2005 Apr;115(4):1021-9.
135. Zhu X, Asa SL, Ezzat S. Ikaros is regulated through multiple histone modifications and deoxyribonucleic acid methylation in the pituitary. *Mol Endocrinol.* 2007 May;21(5):1205-15.
136. Ezzat S, Zhu X, Loeper S, Fischer S, Asa SL. Tumor-derived Ikaros 6 acetylates the Bcl-XL promoter to up-regulate a survival signal in pituitary cells. *Mol Endocrinol.* 2006 Nov;20(11):2976-86.
137. Sambaziotis D, Kapranos N, Kontogeorgos G. Correlation of bcl-2 and bax with apoptosis in human pituitary adenomas. *Pituitary.* 2003;6(3):127-33.
138. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell.* 1993 Aug 27;74(4):597-608.
139. Skommer J, Wlodkowic D, Deptala A. Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family. *Leuk Res.* 2007 Mar;31(3):277-86.
140. Letai A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *J Clin Invest.* 2005 Oct;115(10):2648-55.
141. Kulig E, Jin L, Qian X, Horvath E, Kovacs K, Stefanescu L, et al. Apoptosis in nontumorous and neoplastic human pituitaries: expression of the Bcl-2 family of proteins. *Am J Pathol.* 1999 Mar;154(3):767-74.
142. Rollin G, Ferreira NP, Czepielewski MA. Prospective evaluation of transsphenoidal pituitary surgery in 108 patients with Cushing's disease. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Nov;51(8):1355-61.
143. Bates AS, Farrell WE, Bicknell EJ, McNicol AM, Talbot AJ, Broome JC, et al. Allelic deletion in pituitary adenomas reflects aggressive biological activity and has potential value as a prognostic marker. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Mar;82(3):818-24.
144. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006;7:3.

145. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):126-39.
146. 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.
147. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
148. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
149. Savage MO, Besser GM. Cushing's disease in childhood. *Trends Endocrinol Metab.* 1996 Aug;7(6):213-6.
150. Storr HL, Isidori AM, Monson JP, Besser GM, Grossman AB, Savage MO. Prepubertal Cushing's disease is more common in males, but there is no increase in severity at diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Aug;89(8):3818-20.
151. Vilar L, Naves LA, Freitas Mda C, Moura E, Canadas V, Leal E, et al. [Endogenous Cushing's syndrome: clinical and laboratorial features in 73 cases]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Jun;51(4):566-74.
152. Pecori Giralaldi F, Moro M, Cavagnini F. Gender-related differences in the presentation and course of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Apr;88(4):1554-8.
153. Biederman J, Yee J, Cortes P. Validation of internal control genes for gene expression analysis in diabetic glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2004 Dec;66(6):2308-14.
154. Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem.* 2005 Sep 1;344(1):141-3.
155. Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, et al. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med.* 2005 Dec;83(12):1014-24.

156. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5245-50.
157. Viegas LR, Vicent GP, Baranao JL, Beato M, Pecci A. Steroid hormones induce bcl-X gene expression through direct activation of distal promoter P4. *J Biol Chem.* 2004 Mar 12;279(11):9831-9.
158. Rocha-Viegas L, Vicent GP, Baranao JL, Beato M, Pecci A. Glucocorticoids repress bcl-X expression in lymphoid cells by recruiting STAT5B to the P4 promoter. *J Biol Chem.* 2006 Nov 10;281(45):33959-70.
159. Yamada SM, Yamada S, Hayashi Y, Takahashi H, Teramoto A, Matsumoto K. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 4 correlated with the malignancy of human astrocytomas. *Neurol Res.* 2002 Apr;24(3):244-8.
160. Meijer D, Sieuwerts AM, Look MP, van Agthoven T, Foekens JA, Dorssers LC. Fibroblast growth factor receptor 4 predicts failure on tamoxifen therapy in patients with recurrent breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2008 Mar;15(1):101-11.
161. Yang YC, Lu ML, Rao JY, Wallerand H, Cai L, Cao W, et al. Joint association of polymorphism of the FGFR4 gene and mutation TP53 gene with bladder cancer prognosis. *Br J Cancer.* 2006 Dec 4;95(11):1455-8.
162. Sibley K, Stern P, Knowles MA. Frequency of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in sporadic tumours. *Oncogene.* 2001 Jul 19;20(32):4416-8.
163. Ansell A, Farnebo L, Grenman R, Roberg K, Thunell LK. Polymorphism of FGFR4 in cancer development and sensitivity to cisplatin and radiation in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2009 Jan;45(1):23-9.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)