

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Graziella Alebrant Mendes

**Avanços na biologia molecular dos
adenomas hipofisários secretores de
GH.**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2017**

Graziella Alebrant Mendes

Avanços na biologia molecular dos adenomas hipofisários secretores de GH.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Miriam da Costa Oliveira
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Beatriz da Fonte Kohek

**Porto Alegre
2017**

Catálogo na Publicação

Mendes, Graziella Alebrant

Avanços na biologia molecular dos adenomas
hipofisários secretores de GH. / Graziella Alebrant
Mendes. -- 2017.

78 p. : 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em
Patologia, 2017.

Orientador(a): Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima
; coorientador(a): Miriam da Costa Oliveira, Maria
Beatriz da Fonte Kohek.

1. Acromegalia. 2. Adenomas hipofisários. 3.
E-caderina. 4. NCAM. 5. Slug. I. Título.

Agradecimentos

Ao meu marido Tiago, pelo apoio incondicional. Mais do que isso, paciência e compreensão nos momentos de angústia e companheirismo nas incontáveis idas e vindas de Porto Alegre.

À minha mãe Ivanir, pelo carinho, incentivo, apoio e pela sua dedicação à nossa família.

Às minhas irmãs Verônica e Angélica, aos meus cunhados, cunhadas e afilhadas, pelo companheirismo e incentivo.

Ao meu pai Marcos e minha avó Julieta...

À Prof.^a Dr.^a Júlia F. S. Pereira-Lima pela oportunidade de realização deste trabalho, pela orientação e aprendizado proporcionado, incentivo nos momentos difíceis, pela sua confiança e amizade.

Às minhas co-orientadoras, Prof.^a Dr.^a Maria Beatriz da Fonte Kohek e Prof.^a Dr.^a Miriam da Costa Oliveira pela valiosa e imprescindível contribuição.

Aos colegas do Grupo de Neuroendocrinologia, em especial Taiana Haag e Geraldine Trott, pela inestimável contribuição ao trabalho e discussões valiosas.

Ao Prof. Dr. Nelson Pires Ferreira pela importante contribuição.

Às competentes técnicas do Laboratório de Pesquisa em Patologia, Rosalva Meurer, Terezinha Stein e Keli Reiter, pelo grande auxílio na realização do estudo.

À Grasiela Agnes, responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular e à Magda Rosane Schardosim, pela contribuição e assistência indispensáveis.

À Dr.^a Lígia Barbosa Coutinho pela valiosa contribuição.

À secretária do PPG-Patologia, Maristela Pasin, pela disposição, simpatia e comprometimento.

À Universidade de Cruz Alta pela concessão de licença para doutoramento.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	V
RESUMO	VII
1. Introdução	9
1.1 Hipófise.....	9
1.2 Adenomas hipofisários.....	10
1.3 Acromegalia.....	12
1.4 Marcadores de tumorigênese e de patogênese dos adenomas hipofisários	16
1.5 E-caderina.....	17
1.6 SLUG	23
1.7 NCAM	24
1.8 Referências Bibliográficas	28
2. Objetivos	39
3. Artigo científico redigido em inglês	40
4. Considerações finais	63
5. Anexos	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

AMPc: monofosfato de adenosina cíclica

CDH1: gene da ECAD

CDKN1B: gene do inibidor da cinase ciclina-dependente 1B

cm: centímetro

D2: receptores D₂ de dopamina

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECAD: caderina epitelial

FSH: hormônio folículoestimulante

GH: hormônio do crescimento

GTP: proteína ligadora de trifosfato de guanosina

Ig: imunoglobulina

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina I

IH: imuno-histoquímica

KDa: quilodalton

LH: hormônio luteinizante

MEN1: gene codificador da proteína MENIN 1

mm: milímetros

NCAM: molécula de adesão celular neural

ng/mL: nanograma por mililitro

PCR: reação em cadeia da polimerase

PRL: prolactina

PSA-NCAM: molécula de adesão celular neural ligada ao ácido polisiálico

PTTG: gene transformador de tumor hipofisário

TP16: gene inibidor da cinase dependente da ciclina 2A

RB1: gene repressor transcricional 1

RNA: ácido ribonucleico

SLUG: proteína do repressor transcricional 2 da família snail

SNAI2: gene do repressor transcricional 2 da família snail

SSTR1-5: receptores da somatostatina subtipos 1-5

SMR: razão de mortalidade padronizada

TP53: gene da proteína tumoral P53

TSH: hormônio tireotrófico

RESUMO

Introdução: Os adenomas secretores de hormônio do crescimento (GH) correspondem a 13% dos adenomas hipofisários e levam à acromegalia. São considerados tumores benignos, entretanto, podem tornar-se agressivos e invadir tecidos vizinhos.

Objetivo: Avaliar os marcadores teciduais de tumorigênese E-caderina, SLUG e NCAM em adenomas hipofisários secretores de GH e sua relação com grau de invasividade tumoral.

Material e métodos: Estudo transversal prospectivo realizado com pacientes submetidos à hipofisectomia por adenoma hipofisário produtor de GH no período de abril de 2007 a dezembro de 2014. Realizou-se revisão dos prontuários para coleta dos dados clínicos. Imediatamente após a cirurgia, amostras tumorais foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em biofreezer a -80°C para avaliação da expressão gênica da E-caderina (*CDH1*), SLUG (*SNAI2*) e NCAM (*NCAM1*) por PCR em tempo real. O material foi fixado em formalina e incluído em parafina para avaliação imuno-histoquímica da ECAD e NCAM. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, conforme parecer 512/230. **Resultados:** Foram incluídos 35 pacientes acromegálicos. A idade média foi de 47,11 ± 13,43 anos e 65,7% foram considerados tumores invasivos. Observou-se expressão imuno-histoquímica da ECAD em 96,7% dos pacientes e da NCAM em 80%. Não houve significância estatística na relação do grau de invasividade tumoral com a expressão imuno-histoquímica dos marcadores. Quanto à expressão gênica, 50% dos pacientes apresentaram expressão do gene *CDH1*, nenhum

apresentou expressão do *SNAI2* e 53,3% apresentaram expressão gênica do *NCAM1*. Não houve significância estatística na relação do grau de invasividade tumoral com a expressão gênica dos marcadores *CDH1*, *SNAI2* e *NCAM1*.

Conclusões: As ausências de superexpressão do SLUG (*SNAI2*) e de supressão da ECAD (*CDH1*) e da NCAM (*NCAM1*) sugerem que a expressão dos marcadores não esteja associada com a invasividade tumoral em adenomas hipofisários secretores de GH.

Palavras-chave: acromegalia, neoplasias hipofisárias, caderinas, SLUG, moléculas de adesão de célula nervosa.

1. Introdução

1.1 Hipófise

A hipófise é constituída por dois tecidos de diferentes origens embrionárias. A adeno-hipófise, originada do ectoderma embrionário, compreende as partes distal, intermediária e tuberal, e representa cerca de 80% da glândula. O infundíbulo, a haste hipofisária e o lobo posterior constituem a sua parte neural, a neuro-hipófise. A hipófise de um adulto pesa ao redor de 600 mg, mede 13 x 10 x 6 mm e, histologicamente, possui células dispostas em cordões e colunas demarcadas por lâmina basal envolvidas por fibras reticulares e extensa rede de capilares (Lloyd, 1993).

A adeno-hipófise é formada por cinco tipos de células secretoras de hormônios que podem ser diferenciadas por imuno-histoquímica (IH) ou por microscopia eletrônica. Estas células produzem seis hormônios distintos: células corticotrópicas produtoras do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), células somatotrópicas produtoras do hormônio do crescimento (GH), células gonadotrópicas produtoras do hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), células mamotrópicas produtoras de prolactina (PRL) e células tireotrópicas produtoras do hormônio tireotrófico (TSH). Uma mesma população de células pode expressar GH e PRL, sendo estas denominadas células mamossomatotróficas (Aron e cols., 2000).

As células somatotrópicas representam 40 a 50% das células hipofisárias e se localizam nas porções laterais; as células mamotrópicas representam 10 a 30% das células, situando-se também nas porções laterais;

as células produtoras de ACTH correspondem a 10 a 20% das células e se localizam na região central; as células gonadotrópicas constituem 10% das células da hipófise e se distribuem por toda a glândula, e as células produtoras do TSH constituem 5% da glândula e se dispõem predominantemente na borda ântero medial da glândula (Pittella e cols., 2011).

1.2 Adenomas hipofisários

Os adenomas hipofisários são neoplasias originadas de células da adeno-hipófise. São tumores comuns, com prevalência estimada de 16,7%. Em autópsias, eles estão presentes em 20 a 25% das hipófises, representando 10 a 15% dos tumores intracranianos primários identificados. O pico de incidência é na 5ª e 6ª décadas de vida e acometem igualmente ambos os sexos. Os adenomas de hipófise podem ser classificados segundo os seguintes critérios (Kovacs e cols., 2001; Ezzat e cols., 2004):

1. quanto ao tamanho, podem ser classificados como microadenomas (<10 mm) e macroadenomas (≥ 10 mm);
2. clinicamente, podem ser classificados em funcionantes ou não funcionantes, sendo então considerados endocrinologicamente ativos ou inativos, respectivamente. Os ativos são aqueles que apresentam concentrações hormonais séricas que excedem o valor normal e que apresentam clínica evidente. Os adenomas inativos (ou não funcionantes) contêm componentes secretores e celulares necessários para a produção hormonal. Entretanto, não estão associados com evidências bioquímicas ou clínicas de excesso hormonal. A incidência relativa mostra que os adenomas não funcionantes

representam 25% dos tumores de hipófise, podendo ter características oncocíticas ou não oncocíticas (*null cell*), enquanto que os funcionantes representam 75% das neoplasias, sendo o prolactinoma o mais frequente, seguido dos adenomas produtores de GH, GH e PRL, ACTH, TSH, LH e FSH;

3. quanto ao aspecto radiológico, de acordo com a classificação de Jules Hardy que se baseia na dimensão e no grau de invasão (Ver Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1: Classificação radiológica dos adenomas hipofisários.

Grau	Tamanho	Localização	Alterações ósseas
I	<1 cm	Intra-hipofisária	Ausente
II	≥ 1cm	Intrasselar ou extensão supraselar	Expansão selar
III	≥ 1cm	Intrasselar ou supraselar; invasão local	Erosão selar
IV	≥ 1cm	Expansão supraselar; invasão de estruturas extrasselares	Invasão óssea

(Adaptado de DeLellis e cols., 2004).

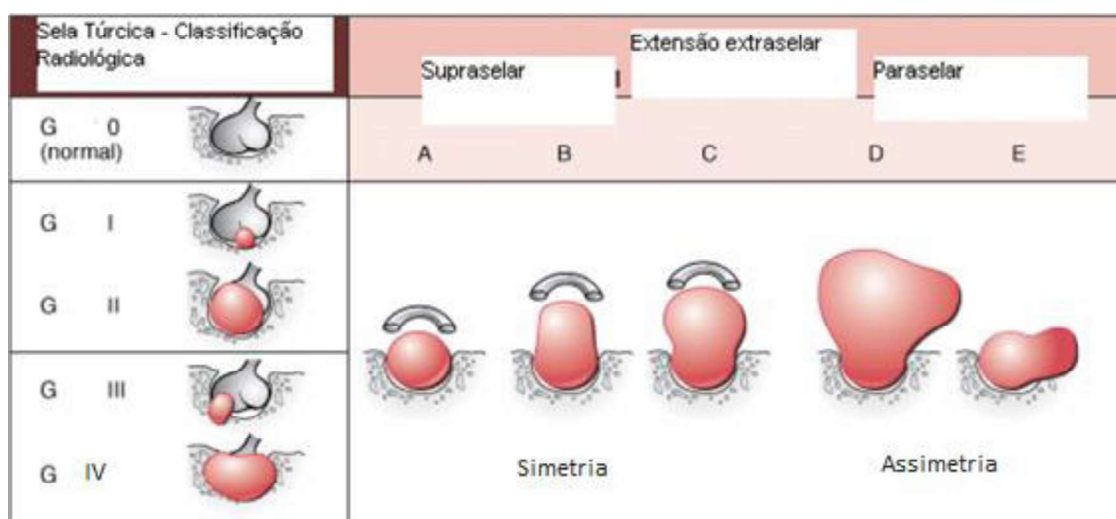


Figura 1: Representação da classificação radiológica conforme Hardy (Graus I e II, restritos à sela túrcica, e Graus III e IV, invasivos) (Adaptado de Onoz e cols., 2014).

Apesar da natureza histológica benigna, os adenomas de hipófise frequentemente comprimem e invadem estruturas vizinhas, podendo provocar sintomas locais como alterações visuais, além de cefaleia, náuseas e vômitos, por aumento da pressão intracraniana (Asa e cols., 1992).

Devido aos avanços no diagnóstico por imagem, pequenas lesões hipofisárias vêm sendo detectadas. A tomografia computadorizada e a ressonância magnética são utilizadas, sendo esta última com melhor resolução, permitindo detectar lesões com 2-3 mm, distorções da haste hipofisária e posição das artérias carótidas, quiasma óptico e seio cavernoso. Ela permite também a visualização de margens, definindo o tamanho e a invasão das estruturas adjacentes ao tumor. A técnica para ressonância magnética consiste em cortes coronais de 3 mm com administração do contraste gadolínico endovenoso (Elster, 1993).

O objetivo do tratamento dos adenomas de hipófise é normalizar a hipersecreção hormonal no caso de funcionantes e as manifestações decorrentes do efeito de massa nos não funcionantes, como a sintomatologia neurológica ou neuro-ocular. O tratamento pode ser cirúrgico, medicamentoso ou radioterápico. A função residual da hipófise deve ser preservada e/ou restaurada, atentando-se para recidivas tumorais (Vilar e cols., 2000).

1.3 Acromegalia

Os adenomas secretores de hormônio do crescimento (GH) correspondem a 13% dos adenomas hipofisários e levam ao quadro de acromegalia, uma doença crônica caracterizada pela hipersecreção de GH e

fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-1) após o fechamento das epífises ósseas. A idade média dos pacientes ao diagnóstico é 40 anos, não sendo observada diferença na frequência entre sexos. Devido ao estímulo hormonal, estes pacientes apresentam alargamento ou intumescimento tecidual cartilaginoso e ósseo acral. Entre os sintomas clínicos estão alterações faciais (lábios grossos, alargamento do nariz, proeminência frontal, prognatismo, orelhas grandes, macroglossia, afastamento dentário por hiperplasia gengival, macroqueilia, edema palpebral e hipertelorismo) e acrais (aumento das extremidades: pés e mãos), hiperhidrose, cefaleia por hipertensão intracraniana, parestesias, disfunção sexual, hipertensão, bócio, e mais raramente, disfunções visuais pela compressão do quiasma óptico (Zanini e cols., 2004; Melmed, 2009; Annamalai e cols., 2011).

A doença apresenta consequências cardiovasculares, reumatológicas, respiratórias e metabólicas (Abreu e cols., 2016). Estudos demonstram aumento da mortalidade, quando comparada à população em geral [razão de mortalidade padronizada (SMR) 1,72]. A principal causa de morte é a doença cardiovascular, representando aproximadamente 60% dos casos, enquanto que a doença respiratória e as doenças malignas representam 25% e 15%, respectivamente (Colao e cols., 2004). A presença de disfunção sistólica no momento do diagnóstico está associada à morte dentro de 15 anos em quase 100% dos casos (Rajasoorya e cols., 1994; Melmed, 2001). Em estudo recente, demonstrou-se que pacientes com acromegalia há mais de 10 anos apresentam risco relativo para hipertrofia ventricular esquerda associada à disfunção sistólica três vezes maior do que pacientes com período de doença mais curto, sendo aproximadamente dez vezes maior naqueles com longa

duração da doença. Acredita-se que este efeito se deva à exposição dos cardiomiócitos a níveis elevados de GH e IGF-1 e à pressão arterial mais elevada em pacientes com maior tempo de doença. Este estudo também demonstrou que a prevalência de hipertensão arterial, arritmias, aumento da glicose e disfunção cardíaca são significativamente maiores em pacientes acromegálicos do que em indivíduos não-acromegálicos (Colao e cols., 2011). Pacientes com acromegalia também apresentam maior risco comparado à população em geral de desenvolver neoplasias benignas e malignas, principalmente do trato digestório, cérebro, mama e tireoide (Bałdys-Waligórska e cols., 2010).

O diagnóstico é realizado através da dosagem de GH e IGF-1, sendo que um GH menor que 0,4 ng/mL e um IGF-1 normal excluem o diagnóstico de acromegalia. Também pode ser realizado o teste oral de tolerância à glicose, que se baseia na supressão fisiológica do GH com o aumento da glicose. No caso da acromegalia, a sobrecarga de glicose é incapaz de reduzir os níveis séricos do GH para um valor inferior a 1 ng/mL. Após a observação de anormalidade nos exames, faz-se necessária a realização de tomografia computadorizada ou ressonância magnética da sela túrcica para localização do tumor (Katznelson e cols., 2014).

Os objetivos do tratamento da acromegalia são controlar os efeitos de massa locais, normalizar a disfunção hormonal e preservar a função normal da hipófise. A cirurgia permanece como tratamento de primeira escolha, mas 20% dos pacientes com microadenoma e 40 a 60% daqueles com macroadenoma não são curados e possuem alto grau de recorrência (Pittella e cols., 2011; Suda e cols., 2013).

O tratamento medicamentoso é recomendado em casos de ausência de cura cirúrgica ou em situações nas quais a cirurgia não é indicada, como pacientes que sofreram infarto do miocárdio recente ou sem condições cirúrgicas. Os análogos da somatostatina representam a primeira linha de tratamento farmacológico para acromegalia, levando à redução dos níveis de GH e IGF-1 e do tamanho do tumor. A resposta a este tratamento depende dos receptores da somatostatina (SSTR1-5), sendo que os mais frequentes nos adenomas secretores de GH são os subtipos 2 e 5. Os análogos da somatostatina disponíveis são a octreotida e a lanreotida. Este tratamento normaliza os níveis de GH e IGF-1 em 40 a 60% dos casos. Outra opção medicamentosa são os agonistas dopaminérgicos, como a cabergolina e a bromocriptina, que atuam nos receptores D₂ expressos nas células tumorais. Eles podem ser utilizados preferencialmente em pacientes com adenomas cosecretores de GH e de prolactina. A terceira opção medicamentosa é o pegvisomanto, um fármaco antagonista do receptor do GH, indicado para pacientes com resistência ou intolerância aos análogos da somatostatina. A normalização dos níveis de IGF-1 é obtida em 90% dos casos, embora sem redução tumoral. O uso combinado dos diferentes fármacos é recomendado quando o paciente não responde à monoterapia (Sherlock e cols., 2011; Giustina e cols., 2014).

1.4 Marcadores de tumorigênese e de patogênese dos adenomas hipofisários

Adenomas de hipófise são considerados tumores benignos, entretanto, podem tornar-se agressivos e invadir tecidos vizinhos. Os fatores envolvidos no crescimento e invasividade destes tumores não são totalmente conhecidos (Jiang e Zhang, 2013). Estudos moleculares de tumores hipofisários esporádicos em pacientes sem história familiar e sem outras neoplasias têm verificado anormalidades na expressão de fatores de crescimento e na regulação do controle do ciclo celular (Boikos e Stratakis, 2007). Demonstrou-se que adenomas são proliferações monoclonais e que sua progressão está relacionada aos oncogenes e aos defeitos em genes supressores tumorais (Jaffrain-Rea, 2013).

Oncogenes associados aos adenomas hipofisários são o fator de transcrição nuclear responsivo ao monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) (Lania e cols., 1998), o *KRAS* (cujas mutações são detectadas em prolactinomas agressivos) (Cai, 1994) e o *PTTG* (gene transformador de tumor hipofisário) (Pei e Melmed, 1997). Os genes supressores tumorais, como o *RB1*, o *MEN1*, *CDKN1B* e o *TP16*, assim como os hormônios hipotalâmicos, os fatores de crescimento localmente produzidos e as citocinas também têm sido estudados para auxiliar na compreensão do crescimento dos adenomas. Não foram detectadas mutações no gene supressor tumoral *TP53* em adenomas ou nos carcinomas hipofisários metastáticos (Levy e cols., 1994). Identificou-se uma mutação no subgrupo de tumores produtores de GH (10 a 40%) caracterizada pela ativação constitutiva do AMPC por mutação pontual na

cadeia alfa da proteína ligadora de trifosfato de guanosina (GTP). Esta mutação leva à produção de grandes quantidades de AMPc, que resulta na hipersecreção de GH e, conseqüentemente, na proliferação celular. Estes tumores são menores e mais sensíveis às terapias, mas parece não haver diferenças fenotípicas entre os pacientes portadores e sem a mutação (Boikos e Stratakis, 2007).

Vários mecanismos biológicos parecem estar envolvidos na formação e desenvolvimento dos adenomas de hipófise e, uma vez identificados, ajudarão na identificação de marcadores de invasão tumoral e recorrência, além de maximizar potenciais alvos terapêuticos (Jiang e Zhang, 2013).

1.5 E-caderina

A caderina de origem epitelial (ECAD) é uma proteína de adesão celular codificada pelo gene *CDH1*. A sua perda na superfície celular está associada com presença de invasividade, metástases e mau prognóstico em vários tumores malignos de origem epitelial. A ECAD possui domínio extracelular, transmembrana e citoplasmático (Alberts e cols., 2009) (Ver Figura 2).

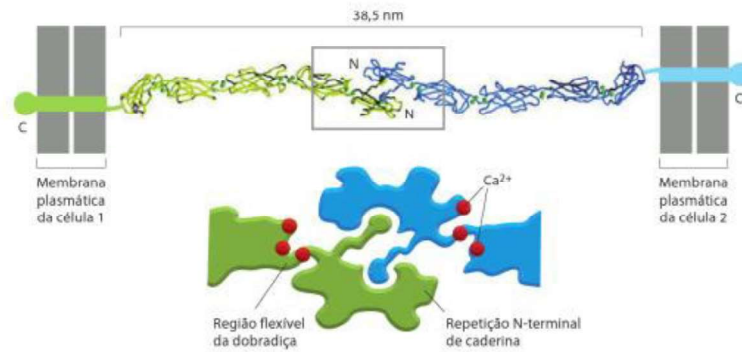


Figura 2: Estrutura e função da ECAD. A figura mostra o domínio extracelular, transmembrana e citoplasmático da proteína, assim como a ligação homofílica entre as células opostas (Adaptado de Alberts e cols., 2009).

Muitos fatores de transcrição estão envolvidos na transição epitélio-mesenquimal via repressão da E-caderina, incluindo o SLUG, o TWIST e o SNAIL (Moreno-Bueno e cols., 2006; Shah e Kakar, 2011). A transição epitélio-mesenquimal é um processo importante no desenvolvimento embrionário, no qual as células perdem suas características epiteliais e adquirem propriedades mesenquimais. Tal processo está associado à progressão do câncer e ao desenvolvimento de metástases, sendo a perda da E-caderina considerada o passo inicial para a transdiferenciação de células epiteliais para o fenótipo mesenquimal (Yamashita e cols., 2004; Ahmed e cols., 2007; Schmalhofer e cols., 2009; Vergara e cols., 2010) (Ver Figura 3).

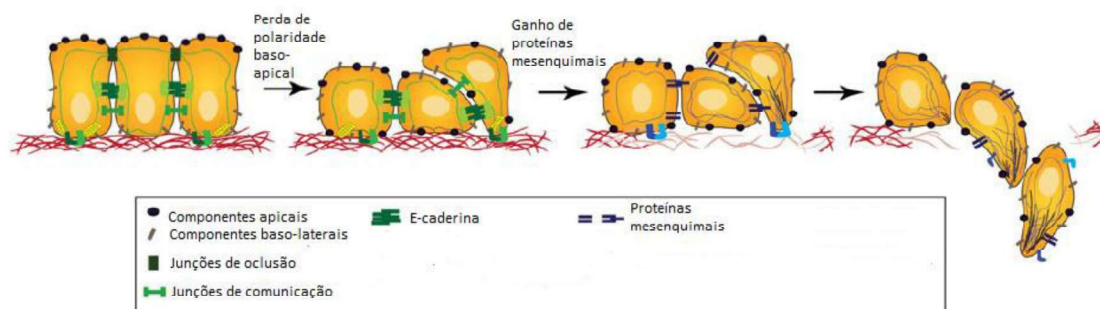


Figura 3: Transição epitélio-mesenquimal. A figura mostra que durante a transição epitélio-mesenquimal, as células epiteliais perdem a polaridade baso-apical e as junções de adesão se dissolvem. Há supressão de proteínas epiteliais, como a E-caderina e superexpressão de proteínas mesenquimais, como a vimentina e a fibronectina. Estas células se tornam fusiformes e adquirem capacidade de se mover e invadir a matriz extracelular (Adaptado de Micalizzi e cols., 2010).

Estudos descrevem positividade IH da ECAD na maioria dos adenomas hipofisários (Tabela 2). Kawamoto e colaboradores (1997) observaram expressão da proteína em todos os adenomas; Yamada e colaboradores (2007), em 39 de 40 casos estudados, e Zhou e colaboradores (2013), em 93% da amostra. Outros estudos evidenciaram positividade em 52 a 73% dos adenomas (Qian e cols., 2007; Elston e cols., 2009; Fougner e cols., 2010). No estudo realizado por Elston e colaboradores (2009), também foi identificada a expressão da ECAD no núcleo celular através de anticorpo dirigido ao domínio citoplasmático da ECAD, sugerindo que a quebra do domínio extracelular e translocação para o núcleo é um evento que pode contribuir na patogênese dos adenomas de hipófise.

Em relação aos adenomas secretores de GH, o estudo realizado por Fougner e seu grupo (2010) incluiu 80 pacientes acromegálicos, sendo que 41 (51,2%) apresentaram expressão forte da ECAD, 18 (22,5%) expressão intermediária e 21 (26,3%) casos não expressaram a mesma na membrana citoplasmática. Elston e colaboradores (2009) estudaram 10 adenomas secretores de GH, dos quais quatro apresentaram expressão IH forte a moderada para ECAD, dois fraca e quatro não apresentaram expressão. Outros autores relataram expressão reduzida da ECAD na membrana citoplasmática de adenomas secretores de GH com corpos fibrosos proeminentes, quando comparados com outros subtipos de adenomas hipofisários, sugerindo que a ECAD pode estar envolvida na formação dos corpos fibrosos (Xu e cols., 2002; Nishioka e cols., 2003; Qian e cols., 2007).

A literatura é escassa no que se refere à expressão gênica da E-caderina em adenomas hipofisários. O estudo de Elston e colaboradores (2009) demonstrou expressão em 29 de 30 adenomas analisados. Há estudos que analisaram a metilação do *CDH1*, sendo verificada hipermetilação em até 37% dos adenomas hipofisários (Xu e cols., 2002; Sano e cols., 2004; Qian e cols., 2007).

O papel da E-caderina na invasividade dos adenomas hipofisários é ainda controverso. Três estudos que avaliaram adenomas hipofisários funcionantes e não funcionantes não observaram associação entre a expressão IH da ECAD e a invasividade dos tumores (Kawamoto e cols., 1997; Yamada e cols., 2007; Elston e cols., 2009). No estudo realizado por Elston e colaboradores (2009), apenas a expressão da ECAD nuclear foi associada à invasividade tumoral. Em estudo realizado por Zhou e colaboradores (2011)

com adenomas de hipófise não funcionantes, a expressão da E-caderina foi avaliada por IH e por PCR em tempo real, sendo a expressão significativamente menor em tumores invasivos. No estudo realizado por Qian e colaboradores (2007) com adenomas funcionantes e não funcionantes, observou-se redução significativa da expressão IH da ECAD nos tumores invasivos e nos macroadenomas. No estudo realizado por Zhou e colaboradores (2013), com 91 adenomas de hipófise, demonstrou-se expressão IH significativamente reduzida da ECAD em tumores invasivos e recorrentes. Ainda, em estudo realizado por Fougner e colaboradores (2010) com pacientes acromegálicos, verificou-se correlação negativa entre a expressão IH de ECAD, a invasividade tumoral, o tamanho tumoral e a resposta aos análogos de somatostina. No estudo realizado por Chauvet e colaboradores (2016), com adenomas secretores de GH, a expressão gênica e IH da E-caderina foi significativamente reduzida em tumores invasivos (Tabela 2).

Tabela 2: Sistematização dos artigos analisados sobre a expressão da E-caderina considerando as variáveis Autor/ano, amostra, porcentagem de expressão de E-caderina em relação à técnica utilizada e sua associação com a invasividade tumoral.

Autor/ano	Amostra	% de expressão de E-caderina (técnica)	Associação da E-caderina com a invasividade
Kawamoto e cols (1997)	30 adenomas hipofisários	100% (IH)	Associação negativa
Yamada e cols (2007)	40 adenomas não funcionantes	97,5% (IH)	Associação negativa
Qian e cols (2007)	69 adenomas funcionantes e não funcionantes	38% expressão normal 32% expressão reduzida 30% expressão negativa (IH)	Associação positiva
Elston e cols (2009)	10 secretores de GH	40% expressão forte a moderada 20% expressão fraca 40% expressão negativa (IH)	Associação negativa. Foi observada associação entre a expressão da ECAD expressa no núcleo e a invasividade.
	30 adenomas funcionantes e não funcionantes	96,5% expressão (PCR)	Dado indisponível
Fougner e cols (2010)	80 acromegálicos	51,2% expressão forte 22,5% expressão intermediária 26,3% expressão negativa (IH)	Associação positiva
Zhou e cols (2011)	41 adenomas não funcionantes	Dado indisponível (IH e PCR)	Associação positiva
Zhou e cols (2013)	91 adenomas funcionantes	93,4% (IH)	Associação positiva
Chauvet e cols (2016)	52 adenomas funcionantes	Dado indisponível (IH e PCR)	Associação positiva

1.6 SLUG

O SLUG é um membro da família Snail de fatores de transcrição, codificado pelo gene *SNAI2* e atua reprimindo a expressão da E-caderina. O SLUG auxilia na estabilidade das junções de adesão, das junções comunicantes dos desmossomos e na expressão das proteases (Micalizzi e cols., 2010) (Ver Figura 4).

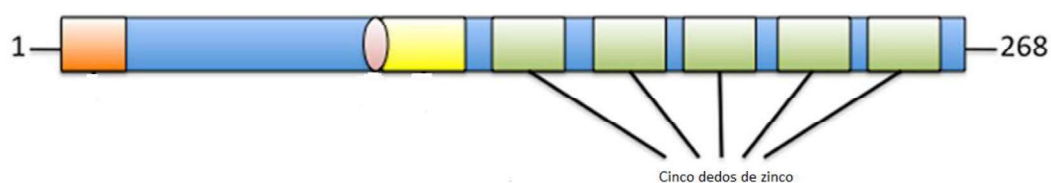


Figura 4: Estrutura do fator de transcrição SLUG, composto por 268 aminoácidos. Cinco dedos de zinco localizados na porção carboxi da proteína interagem com o DNA e regulam a transcrição gênica (Adaptado de Shirley e cols., 2010).

A superexpressão do SLUG leva à redução da expressão da E-caderina, fato importante para transição epitélio-mesenquimal (Hajra e cols., 2002). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que durante a tumorigênese, a E-caderina está inversamente correlacionada com o SLUG, influenciando o prognóstico dos pacientes (Yoshida e cols., 2009; Zhang e cols., 2010).

A análise dos padrões de expressão do SLUG e da E-caderina em linhagens celulares de câncer da mama por várias técnicas demonstrou que a

expressão do SLUG está fortemente correlacionada com a perda dos transcritos de E-caderina (Hajra e cols., 2002). Em linhagem celular de tumores epiteliais ovarianos, observou-se elevada regulação do SLUG e baixa da E-caderina (Shah e Kakar, 2011).

Há poucos estudos na literatura que avaliam a relação do SLUG com os adenomas hipofisários. Em estudo realizado com 41 casos de adenomas de hipófise não funcionantes, a expressão do SLUG foi significativamente maior em tumores invasivos comparados aos não invasivos, sendo os dados evidenciados por IH e por PCR em tempo real (Zhou e cols., 2011). Outro estudo com 95 adenomas hipofisários demonstrou que a expressão gênica do *SNAI2* se associa com o grau e o tamanho do tumor (Jia e cols., 2015).

1.7 NCAM

A molécula de adesão celular neural (NCAM) é uma glicoproteína de membrana pertencente à superfamília das imunoglobulinas (Ig), codificada pelo gene *NCAM1*, sendo expressa na superfície de neurônios, células gliais, musculares esqueléticas e *natural killers*, influenciando a proliferação, o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência destas células (Gubkina e cols., 2001) (Ver Figura 5).

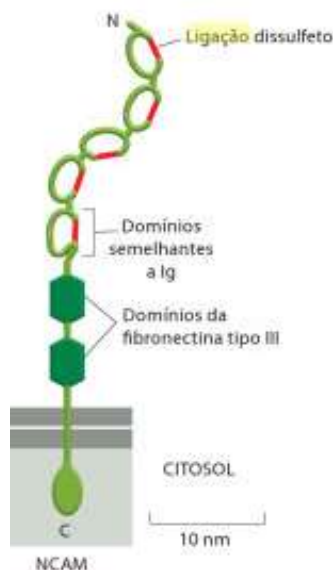


Figura 5: Estrutura da NCAM. A figura mostra o domínio extracelular, composto por dois domínios de fibronectina tipo III e cinco repetições de imunoglobulina, o domínio transmembrana e o domínio citoplasmático (Adaptado de Weledji e Assob, 2014).

Várias formas da proteína são conhecidas e produzidas através de *splicing* alternativo do RNA mensageiro codificado pelo gene *NCAM1*, localizado no cromossomo 11. No cérebro humano adulto, quatro isoformas foram identificadas: 180KDa, 170KDa, 145KDa e 120KDa. As isoformas apresentam o domínio extracelular idêntico, mas são diferenciadas pelo seu domínio transmembrana. Os anticorpos utilizados na IH são dirigidos à porção extracelular, reconhecendo todas as isoformas (Weledji e Assob, 2014).

Sabe-se que a progressão de tecido normal para neoplasia envolve a capacidade de aderência e interação com células vizinhas e matriz extracelular, sendo que a perda ou dificuldade de adesão é determinante para o desenvolvimento da neoplasia epitelial (Asa e Ezzat, 2002).

Estudos mostram a presença da NCAM na hipófise saudável e na maioria dos adenomas hipofisários. Aletsee-Ufrecht e colaboradores (1990) analisaram a expressão da NCAM por *immunoblotting*, identificando a proteína em todas as hipófises normais e adenomas secretores de GH, na maioria dos adenomas não funcionantes, mas em nenhum prolactinoma. De Jong e colaboradores (1999) analisaram adenomas hipofisários e a proteína foi detectada pela análise IH em todos os tumores. Kleinschmidt-DeMasters e colaboradores (1995) estudaram adenomas de hipófise através de IH e os prolactinomas apresentaram expressão reduzida. Em estudo realizado por Trouillas e colaboradores (2003), identificou-se expressão IH nas hipófises saudáveis e em todos os adenomas funcionantes e não funcionantes. Este estudo demonstrou que a NCAM ligada ao ácido polisiálico (PSA-NCAM) foi expressa em 46% dos adenomas hipofisários e não foi identificada nas amostras saudáveis (Trouillas e cols., 2003).

Em relação à expressão do gene *NCAM1*, um estudo avaliou adenomas secretores de GH e de prolactina, dos quais 67% dos secretores de GH e 14% dos secretores de prolactina expressaram a *NCAM1* (Rubinek e cols., 2003).

Há poucos estudos na literatura que avaliam a relação da NCAM com a invasividade dos adenomas hipofisários. Kleinschmidt-DeMasters e colaboradores (1995) e Trouillas e colaboradores (2003) não observaram a relação do marcador com a invasidade. Entretanto, há descrição que a PSA-NCAM se relacionou com a invasividade, estando expressa em 85% dos tumores invasivos (Trouillas e cols., 2003).

Dessa forma, embora ainda não haja marcadores ideais, esforços têm sido feitos no sentido de melhorar a compreensão da tumorigênese dos

adenomas hipofisários através de marcadores que possam prever a invasividade e a recorrência tumoral.

1.8 Referências Bibliográficas

- Abreu A, Tovar AP, Castellanos R, Valenzuela A, Giraldo CM, Pinedo AC *et al.* Challenges in the diagnosis and management of acromegaly: a focus on comorbidities. *Pituitary*. 2016 Aug;19(4):448-57

- Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol*. 2007 Dec;213(3):581-8.

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. 5. ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed; 2009. p.1396.

- Aletsee-Ufrecht MC, Langley K, Gratzl O, Gratzl M. Differential expression of the neural cell adhesion molecule NCAM 140 in human pituitary tumors. *FEBS Lett*. 1990 Oct;15(1-2):45-9.

- Annamalai AK, Gayton EL, Webb A, Halsall DJ, Rice C, Ibram F *et al.* Increased prevalence of gallbladder polyps in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jul;96(7):1120-5.

- Aron DC, Findling JW, Tyrrel LB. Hipotálamo e hipófise. In: Greenspan A & Strewler GJ. *Endocrinologia básica e clínica*. 5ªed. Rio de Janeiro, Brasil: Editora Guanabara Koogan; 2000. p.69-112.

-Asa SL, Cheng Z, Ramyar L, Singer W, Kovacs K, Smyth HS *et al.* Human pituitary null cell adenomas and oncocytomas in vitro: effects of adeno-hypophysiotropic hormones and gonadal steroids on hormone secretion and tumor cell morphology. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 May;74(5):1128-34.

-Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat Rev Cancer.* 2002 Nov;2(11):836-49.

-Bałdys-Waligórska A, Krzentowska A, Gołkowski F, Sokołowski G, Hubalewska-Dydejczyk A. The prevalence of benign and malignant neoplasms in acromegalic patients. *Endokrynol Pol.* 2010 Jan-Feb;61(1):29-34.

-Boikos SA, Stratakis CA. Molecular genetics of the cAMP-dependent protein kinase pathway and of sporadic pituitary tumorigenesis. *Hum Mol Genet.* 2007 Apr;16(1):80-7.

-Cai WY. Ras mutations in human prolactinomas and pituitary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Jan;78(1):89-93.

-Chauvet N, Romanò N, Meunier AC, Galibert E, Fontanaud P, Mathieu MN *et al.* Combining cadherin expression with molecular markers discriminates invasiveness in growth hormone and prolactin pituitary adenomas. *J Neuroendocrinol.* 2016 Feb;28(2):1-11.

-Colao A, Ferone D, Marzullo P, Lombardi G. Systemic complications of acromegaly: epidemiology, pathogenesis, and management. *Endocrine Reviews*. 2004 Feb;25(1):102-52.

-Colao A, Pivonello R, Grasso LF, Auriemma RS, Galdiero M, Savastano S *et al*. Determinants of cardiac disease in newly diagnosed patients with acromegaly: results of a 10 year survey study. *Eur J Endocrinol*. 2011 Nov;165(5):713-21.

-De Jong I, Aylwin SJ, Olabiran Y, Geddes JF, Monson JP, Wood DF *et al*. Expression and secretion of neural cell adhesion molecules by human pituitary adenomas. *Ann Clin Biochem*. 1999 Sep;36(5):660-5.

-DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. World Health Organization Classification of tumors, pathology and genetics of endocrine organs. Lyon, France: IARC Press; 2004. p.10.

-Elster AD. Modern imaging of the pituitary. *Radiology*. 1993 Apr;187(1):1-14.

-Elston MS, Gill AJ, Conaglen JV, Clarkson A, Cook RJ, Little NS *et al*. Nuclear Accumulation of E-Cadherin Correlates with Loss of Cytoplasmic Membrane Staining and Invasion in Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Apr;94(4):1436-42.

-Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, McCutcheon IE. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*. 2004 Aug;101(3):613-9.

-Fougner SL, Lekva T, Borota OC, Hald JK, Bollerslev J, Berg JP. The expression of E-cadherin in somatotroph pituitary adenomas is related to tumor size, invasiveness, and somatostatin analog response. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 May;95(5):2334-42.

-Giustina A, Chanson P, Kleinberg D, Bronstein MD, Clemmons DR, Klibanski A *et al*. Expert consensus document: A consensus on the medical treatment of acromegaly. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Apr;10(4):243-8.

-Gubkina O, Cremer H, Rougon G. Mutation in the neural cell adhesion molecule interferes with the differentiation of anterior pituitary secretory cells. *Neuroendocrinology*. 2001 Nov;74(5):335-46.

-Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res*. 2002 Mar;62(6):1613-8.

- Jaffrain-Rea ML, Rotondi S, Alesse E. New Insights in the Pathogenesis of Pituitary Tumours. In: Fedele, M. (Ed.). *Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases*. 2013. Disponível em <<http://www.intechopen.com/books/hot-topics-in-endocrine-and-endocrine-related-112-diseases/new-insights-in-the-pathogenesis-of-pituitary-tumours>>.

-Jia W, Zhu J, Martin TA, Jiang A, Sanders AJ, Jiang WG. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers in human pituitary adenomas indicate a clinical course. *Anticancer Res.* 2015 May;35(5):2635-43.

-Jiang X, Zhang X. The molecular pathogenesis of pituitary adenomas: an update. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2013 Dec;28(4):245-54.

-Katznelson L, Laws ER Jr, Melmed S, Molitch ME, Murad MH, Utz A *et al.* Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Nov;99(11):3933-51.

-Kawamoto H, Mizoue T, Arita K, Tominaga A, Eguchi K, Kurisu K. Expression of epithelial cadherin and cavernous sinus invasion in human pituitary adenomas. *J Neurooncol.* 1997 Sep;34(2):105-9.

-Kleinschmidt-DeMasters BK, Conway DR, Franklin WA, Lillehei KO, Kruse CA. Neural cell adhesion molecule expression in human pituitary adenomas. *J Neurooncol.* 1995 May;25(3):205-13.

-Kovacs K, Horvath E, Vidal S. Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol.* 2001 Sep;54(2):121-7.

-Lania A, Persani L, Ballare E, Mantovani S, Losa M, Spada A. Constitutively active Gs alpha is associated with an increased phosphodiesterase activity in

human growth hormone-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 May;83(5):1624-8.

-Levy A, Hall L, Yeudall WA, Lightman SL. p53 gene mutations in pituitary adenomas: rare events. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994 Dec;41(6):809-14.

-Lloyd RV. Cytology and function of the pituitary gland. In: Lloyd RV, (ed) *Surgical pathology of the pituitary gland.* Philadelphia, USA: WB Saunders, 1993. p.5-17.

-Melmed S. Acromegaly and cancer: not a problem. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jul;86(7):2929-34.

-Melmed S. Acromegaly pathogenesis and treatment. *J Clin Invest.* 2009 Nov;119(11):3189-202.

-Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010 Jun;15(2):117-34.

-Moreno-Bueno G, Cubillo E, Sarrío D, Peinado H, Rodríguez-Pinilla SM, Villa S *et al.* Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2006 Oct;66(19):9543-56.

-Nishioka H, Haraoka J, Akada K. Fibrous bodies are associated with lower GH production and decreased expression of E-cadherin in GH-producing pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003 Dec;59(6):768-72.

-Onoz M, Basaran R, Gucluer B, Isik N, Kaner T, Sav A *et al*. Correlation between SPARC (Osteonectin) expression with immunophenotypical and invasion characteristics of pituitary adenomas. *APMIS*. 2014 Mar;123(3):199-204.

-Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol*. 1997 Apr;11(4):433-41.

-Pittella JEH, Coutinho LMB, Hilbig A. Hipófise. In: Filho GB editor. *Bogliolo Patologia*. 8ª Ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan; 2011. p.1109-21.

-Qian ZR, Sano T, Yoshimoto K, Asa SL, Yamada S, Mizusawa N *et al*. Tumor-specific downregulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas. *Mod Pathol*. 2007 Dec;20(12):1269-77.

-Rajasoorya C, Holdaway IM, Wrightson P, Scott DJ, Ibbertson HK. Determinants of clinical outcome and survival in acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1994 Jul;41(1):95-102.

-Rubinek T, Yu R, Hadani M, Barkai G, Nass D, Melmed S *et al.* The cell adhesion molecules N-cadherin and neural cell adhesion molecule regulate human growth hormone: a novel mechanism for regulating pituitary hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Aug;88(8):3724-30.

-Sano T, Rong QZ, Kagawa N, Yamada S. Down-regulation of E-cadherin and catenins in human pituitary growth hormone-producing adenomas. *Front Horm Res.* 2004 May;32(3):127-32.

-Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Jun;28(1-2):151-66.

-Shah PP, Kakar SS. Pituitary tumor transforming gene induces epithelial to mesenchymal transition by regulation of Twist, Snail, Slug, and E-cadherin. *Cancer Lett.* 2011 Dec;311(1):66-76.

-Sherlock M, Woods C, Sheppard MC. Medical therapy in acromegaly. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 May;7(5):291-300.

-Shirley SH, Hudson LG, He J, Kusewitt DF. The Skinny on Slug. *Mol Carcinog.* 2010 Oct;49(10):851-61.

-Suda K, Inoshita N, Iguchi G, Fukuoka H, Takahashi M, Nishizawa H *et al.* Efficacy of combined octreotide and cabergoline treatment in patients with

acromegaly: a retrospective clinical study and review of the literature. *Endocr J*. 2013 Jan;60(4):507-15.

-Trouillas J, Daniel L, Guigard MP, Tong S, Gouvernet J, Jouanneau E *et al*. Polysialylated neural cell adhesion molecules expressed in human pituitary tumors and related to extrasellar invasion. *J Neurosurg*. 2003 May;98(5):1084-93.

-Vergara D, Merlot B, Lucot JP, Collinet P, Vinatier D, Fournier I *et al*. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett*. 2010 May;291(1):59-66.

-Vilar L, Naves L, Freitas MC, Jr, SO, Leite V, Canadas V. Tratamento Medicamentoso dos Tumores Hipofisários. Parte I: Prolactinomas e Adenomas Secretores de GH. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2000 Oct;44(5):367-81.

-Weledji EP, Assob JC. The ubiquitous neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Ann Med Surg (Lond)*. 2014 Jul;23(3):77-81.

-Xu B, Sano T, Yoshimoto K, Yamada S. Downregulation of E-cadherin and its undercoat proteins in pituitary growth hormone cell adenomas with prominent fibrous bodies. *Endocr Pathol*. 2002 Winter;13(4):341-51.

-Yamada S, Ohyama K, Taguchi M, Takeshita A, Morita K, Takano K *et al*. A study of the correlation between morphological findings and biological activities

in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurosurgery*. 2007 Sep; 61(3):580-4.

-Yamashita S, Miyagi C, Fukada T, Kagara N, Che YS, Hirano T. Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature*. 2004 May;429(6989):298-302.

-Yoshida J, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi A, Osada R, Ohira S *et al*. Changes in the expression of E-cadherin repressors, Snail, Slug, SIP1, and Twist, in the development and progression of ovarian carcinoma: the important role of Snail in ovarian tumorigenesis and progression. *Med Mol Morphol*. 2009 Jun;42(2):82-91.

-Zanini M, Oshiro RR, Paschoal LHC, Macedo Paschoal FM, Timone FR. Aspectos dermatológicos da acromegalia. *An Bras Dermatol*. 2004 Jul-Aug;79(4):491-94.

-Zhang KJ, Wang DS, Zhang SY, Jiao XL, Li CW, Wang XS *et al*. The E-cadherin repressor slug and progression of human extrahepatic hilar cholangiocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010 Jul;29(1):88-97.

-Zhou K, Jin H, Luo Y. Expression and significance of E-cadherin and β -catenins in pituitary adenoma. *Int J Surg Pathol*. 2013 Aug;21(4):363-7.

-Zhou W, Song Y, Xu H, Zhou K, Zhang W, Chen J *et al.* In nonfunctional pituitary adenomas, estrogen receptors and slug contribute to development of invasiveness. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Aug;96(8):1237-45.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral: Avaliar marcadores teciduais de tumorigênese em adenomas hipofisários secretores de GH e sua relação com a invasividade tumoral.

2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1 Avaliar a expressão gênica da E-caderina (*CDH1*), do SLUG (*SNAI2*) e da NCAM (*NCAM1*) em adenomas de hipófise secretores de GH através da técnica de PCR em tempo real;

2.2.2 Avaliar a expressão imuno-histoquímica da ECAD e da NCAM em adenomas de hipófise secretores de GH;

2.2.3 Relacionar os achados das técnicas de expressão gênica e de imuno-histoquímica aos dados de sexo, idade e grau de invasão tumoral verificada através da análise de imagem.

3. Artigo científico redigido em inglês

Expression of E-cadherin, Slug and NCAM and its relationship to tumor invasiveness in patients with acromegaly

Short title: E-cadherin, Slug and NCAM in acromegaly

Graziella Alebrant Mendes¹, Taiana Haag¹, Geraldine Trott¹, Carolina Garcia Soares Leães Rech², Nelson Pires Ferreira², Miriam da Costa Oliveira^{1,2}, Maria Beatriz Kohek¹, Júlia Fernanda Semmelman Pereira-Lima^{1,2}

¹ PostGraduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA); ² Neuroendocrinology Center, Santa Casa de Porto Alegre/UFCSPA.

Corresponding author:

Graziella Alebrant Mendes

Rua Oscar Brener, 1638

98035-230 Cruz Alta/RS – Brazil

Phone: +55 55 9198 2100

grazi_mendes@hotmail.com

Abstract

Background: Pituitary adenomas account for 10-15% of primary intracranial tumors. Growth hormone (GH)-secreting adenomas account for 13% of all pituitary adenomas and cause acromegaly. These tumors can be aggressive, invade surrounding structures and are highly recurrent. **Purpose:** To evaluate E-cadherin, Slug and neural cell adhesion molecule (NCAM) expression in GH-secreting pituitary adenomas and its relationship to tumor invasiveness. **Methods:** A cross-sectional study of patients who underwent hypophysectomy due to GH-secreting pituitary adenoma from April 2007 to December 2014. The medical records were reviewed to collect clinical data. Immediately after surgery, tumor samples were frozen in liquid nitrogen and stored in a biofreezer at -80°C for assessment of E-cadherin (*CDH1*), SLUG (*SNAI2*) and NCAM by real-time PCR. The samples were fixed in formalin and embedded in paraffin for immunohistochemical analysis of E-cadherin and NCAM. **Results:** Thirty-five patients with acromegaly were included in the study. Of these, 65.7% were invasive tumors. Immunohistochemically, E-cadherin was expressed in 96.7% of patients and NCAM in 80%. There was no statistically significant relationship between tumor grade or invasiveness and immunohistochemical expression of these markers. Regarding gene expression, 50% of cases expressed E-cadherin (*CDH1*), none expressed Slug (*SNAI2*), and 53.3% expressed NCAM. There was no statistically significant relationship between tumor grade or invasiveness and gene expression of E-cadherin (*CDH1*), SLUG (*SNAI2*), and NCAM. **Conclusions:** The absence of Slug overexpression and of E-cadherin and NCAM suppression suggests that expression of these markers is not associated with tumor invasiveness in GH-secreting pituitary adenomas.

Key words: acromegaly, pituitary neoplasms, cadherins, Slug, neural cell adhesion molecules.

Introduction

Pituitary adenomas are common tumors, with an estimated prevalence of 16.7%, and autopsy studies have reported their presence in 20 to 25% of cases, accounting for 10 to 15% of primary intracranial tumors (1). Growth hormone (GH)-secreting pituitary adenomas account for 13% of all pituitary adenomas and lead to acromegaly, a chronic disease characterized by hypersecretion of GH and insulin-like growth factor (IGF)-1. The mean age at diagnosis of patients with acromegaly is 40 years, with no difference between men and women (2). The disease has cardiovascular, rheumatologic, respiratory and metabolic consequences. The main cause of death is cardiovascular disease, accounting for 60% of cases, while respiratory disease and malignancies account for 25% and 15% of cases respectively (3).

Pituitary adenomas are considered benign tumors, but they may become aggressive and invade surrounding tissues. Approximately 60% of patients with adenomas greater than 1 cm (macroadenomas) have tumor recurrence after surgical treatment. The mechanisms underlying the pathogenesis of these tumors are unclear and genes classically involved in neoplastic development, such as *TP53* and *KRAS*, rarely show mutations. In addition, the mitosis index is generally low and Ki67 and PCNA, markers of cell proliferation, have little relevance in predicting tumor behavior (4). The absence of a prognostic classification or consensual prognostic markers limits the evaluation of medical strategies for pituitary tumors.

Some studies have shown that loss of adhesion protein expression may be involved in the pathogenesis of pituitary adenomas and contribute to tumor aggressiveness and invasiveness (4-7). Currently, there are few reports in the literature regarding the role of cell adhesion proteins, such as E-cadherin (ECAD), and neural cell adhesion molecule (NCAM) in pituitary adenomas, as well as of SLUG, which is an important transcriptional regulator of ECAD. Studies suggest that loss of ECAD expression is critical for epithelial-mesenchymal transition, a process in which neoplastic cells acquire cellular motility and invasiveness (8). The results are quite controversial regarding the role of these markers in the invasiveness of pituitary adenomas. Some studies indicate an association of markers with tumor invasiveness (6-7,9), while others do not recognize this association (10-12).

The factors involved in the growth and invasiveness of these tumors are not fully understood, but, once identified, they will aid in the identification of invasion and recurrence markers and of potential therapeutic targets (13). The aim of the present study was to evaluate ECAD, SLUG and NCAM expression in GH-secreting pituitary adenomas and its relationship to the degree of tumor invasiveness.

Material and methods

This is a cross-sectional study.

Patients

The sample consisted of 35 consecutive patients with a clinical and laboratory diagnosis of acromegaly who underwent neurosurgery performed by

a single surgeon (NPF) at Hospital São José, Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, southern Brazil, from April 2007 to December 2014. All patients undergoing the procedure during this period were included in the study. Written informed consent was obtained from all individual participants prior to their inclusion in the study.

The diagnosis of pituitary adenoma was confirmed by anatomopathological examination. The histopathological diagnosis was made by the neuropathologists of the Department of Pathology of the institution in accordance with the World Health Organization (WHO) guidelines. Hematoxylin and eosin (HE)-stained slides were available for all cases to confirm the presence of tumors. The HE-stained slides were used to guide sampling of the tissue of interest. Each adenoma was immunohistochemically stained for six pituitary hormones (GH, PRL, ACTH, FSH, LH, and TSH) using commercially available antibodies. Immunohistochemical analysis was performed using chromogranin A antibody for all cases in order to characterize the pituitary tissue. The patients' medical records were then reviewed to collect data on sex, age, preoperative images, and the results of anatomopathological examination and immunohistochemistry. Tumor grade and invasiveness were defined based on magnetic resonance images (MRI 1.5T) or X-ray computed tomography (CT) scans obtained preoperatively and classified according to the criteria proposed by Hardy (13): grade I (microadenomas, < 1 cm in diameter), grade II (≥ 1 cm in diameter, intrasellar or with suprasellar extension without causing bony erosion), grade III (locally invasive tumors that may be associated with diffuse sellar enlargement and bony erosion of the sella turcica), and grade IV (invasive tumors that involve extrasellar structures including bone, hypothalamus, and the

cavernous sinus). Grade I and II pituitary adenomas are considered noninvasive tumors, while grade III and IV adenomas are invasive tumors (14).

The study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), protocol number 512/230, and conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki.

Immunohistochemistry

Tumor tissue samples were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours and embedded in paraffin. Serial 4-micrometer-thick sections were cut for immunohistochemical analysis. To detect protein expression, sections were incubated with the monoclonal anti-ECAD antibody G-10 (sc- 8426; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), at a 1:50 dilution, and anti-NCAM antibody ([EPR2566] [ab133345], Abcam, Cambridge, UK), at a 1:300 dilution. The labeled streptavidin-biotin method (LSAB kit + Peroxidase; Dako, Carpinteria, CA, USA) was used for detection. Due to technical problems related to the primary antibody, it was not possible to analyze SLUG by means of immunohistochemistry. Endogenous peroxidase activity was blocked using three 10-minute baths in 5% hydrogen peroxide (H_2O_2) 30 V in methanol. Nonspecific protein binding was blocked using 1% BSA for 30 minutes. Incubation with primary antibody was performed overnight at 4°C. Incubation with secondary antibody and tertiary antibody was performed for 40 minutes at room temperature. The primary antibody was replaced with saline to serve as a negative control. Human tonsil was used as a positive control for E-cadherin and glioma for NCAM. The antigen-antibody binding was visualized with the diaminobenzidine (DAB) chromogen.

A positive expression was defined as plasma membrane staining classified according to a score based on staining intensity and ratio of positive cells after analysis of the slides (7). Staining intensity was scored as 0 (no staining), 1 (weak), 2 (moderate), and 3 (strong). The ratio of positive cells was scored as 0 (0-5% stained cells), 1 (6-10%), 2 (11-50%), 3 (51-80%), and 4 (>80%). The final score was obtained by multiplying the intensity ratio by the positive cell ratio: 0 (-, negative expression), 1-3 (+, weak expression), 4-6 (++, moderate expression), and >6 (+++, strong expression). The slides were read by two independent observers by optical microscopy. The observers were blinded to the tumor characteristics.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Tumor fragments were obtained immediately after surgery, frozen in liquid nitrogen, and stored in a biofreezer at -80°C . Total RNA was extracted using TriReagent (Ludwig Biotec, Alvorada, RS, Brazil), according to the manufacturer's instructions. RNA was then reverse transcribed into cDNA at a final volume of 21 μL using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA samples were diluted to a final concentration of 250 $\text{ng}/\mu\text{L}$ for qRT-PCR of ECAD (*CDH1*) and SLUG (*SNAI2*), and of 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ for qRT-PCR of NCAM. The samples were amplified using Sybr Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a total reaction volume of 15 μL under the following conditions: initial denaturation at 50°C for 2 minutes and at 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The following primers were used: *CDH1* (Forward 5'-GCCGAGAGCTACACGTTTAC-3' Reverse 5'-ACTTTGAATCGG GTGTCGAG-

3'), *SNAI2* (Forward 5'-ATATTCGGACCCACACATTACC-3' Reverse 5'-ACATTCTGGAGAAGGTTTTGGA-3'), and *NCAM-1* (Forward 5'-AACAAAGCATGATGGGTGAA-3' Reverse 5'-GTCTGTGGTGTGGAAATGC-3'). All reactions were run in duplicate using a StepOnePlus system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Samples without cDNA were used as negative controls. As an endogenous control, *GAPDH* was used as a reference for normalization (Forward 5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3' Reverse 5'-GTCATTGATGGCAACAATATCCACT-3'). *GAPDH* was amplified by qRT-PCR for each sample and also for each RT-negative control, with the same specified conditions for gene analysis. A cycle threshold (Ct) <40 was classified as showing good quality cDNA. Commercially available pooled RNA (Human Pituitary Gland Pool of RNA-636157, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA), consisting of 39 healthy pituitary glands from adult males and females, was used for calibration of qRT-PCR. Data were converted to normalize expression ratios using the Applied Biosystems-recommended $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method. Relative expression (the normalized target concentration related to the endogenous reference) was given by the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ formula, where: $\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ target gene} - Ct \text{ GAPDH gene in samples}) - (Ct \text{ normal pituitary target gene} - Ct \text{ GAPDH normal pituitary gland pool})]$. Data from tumor tissues are expressed equal to 1 (reference level). An expression level < 1 was defined as absence of expression and ≥ 1 as presence of expression (15).

Statistical analysis

Descriptive statistical analysis and normality testing of the data (Shapiro-Wilk test) were performed to determine the distribution of the data. Quantitative variables were expressed as means and standard deviations (SD) or medians according to their distribution. Age was symmetrically distributed and expressed as mean (SD). The gene expression of ECAD (*CDH1*), SLUG (*SNAI2*) and NCAM (*NCAM1*) was presented as median and interquartile range due to their asymmetrical distribution. Immunohistochemical expression was presented as frequencies and percentages. Noninvasive and invasive adenomas were compared using the chi-square and Mann-Whitney tests. The level of significance was set at 5% and data were analyzed using SPSS, version 23.0.

Results

Of 35 patients with acromegaly, 19 (54.3%) were women. Mean (SD) patient age was 47.1 (13.4) years, ranging from 18 to 74 years. Immunohistochemically, 15 (42.9%) adenomas expressed GH alone, 14 (40%) expressed both GH and prolactin, and the remaining adenomas expressed GH and other hormones.

Regarding tumor grade based on preoperative images, 3 (8.6%) patients had grade I adenomas, 9 (25.7%) had grade II adenomas, 10 (28.6%) had grade III adenomas, and 13 (37.1%) had grade IV adenomas. Of these, 12 (34.3%) were noninvasive and 23 (65.7%) were invasive tumors. There was no statistically significant difference in sex or age between the noninvasive and invasive groups ($p=0.135$ and $p=0.128$, respectively).

Immunohistochemical expression of ECAD and NCAM

Due to material availability, the samples of 30 patients were subjected to immunohistochemical analysis of protein expression. Of these, 11 (36.7%) were noninvasive tumors (3 grade I and 8 grade II tumors) and 19 (63.3%) were invasive tumors (8 grade III and 11 grade IV tumors).

The samples of 29 (96.7%) patients expressed ECAD. Of these, 26 (86.7%) showed strong expression (+++), 2 (6.7%) showed moderate expression (++) , 1 (3.3%) showed weak expression (+), and 1 (3.3%) no expression (Figure 1).

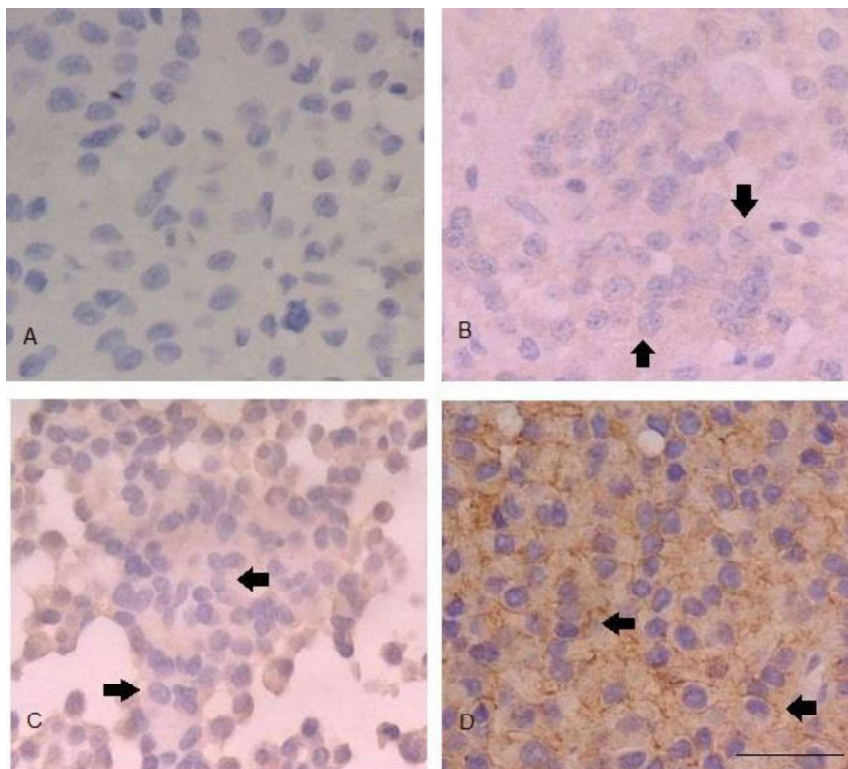


Figure 1: Immunohistochemical expression of ECAD (400x).

A. Negative expression (-); invasive. B. Weak expression (+) (final score: 3); invasive. C. Moderate expression (++) (final score: 6); invasive. D. Strong expression (+++) (final score: 12); invasive. Bar = 200 μ m for both panels.

When analyzed according to tumor grade, ECAD was strongly expressed in 100% of grade I and II adenomas, 62.5% of grade III adenomas, and 90.9% of grade IV adenomas. Strong expression of ECAD was observed in 100% of noninvasive tumors and 78.9% of invasive tumors (Table 1).

The samples of 24 (80%) patients expressed NCAM. Of these, 3 (10%) showed strong expression (+++), 8 (26.7%) showed moderate expression (++), 13 (43.3%) showed weak expression (+), and 6 (20%) showed no expression (Figure 2).

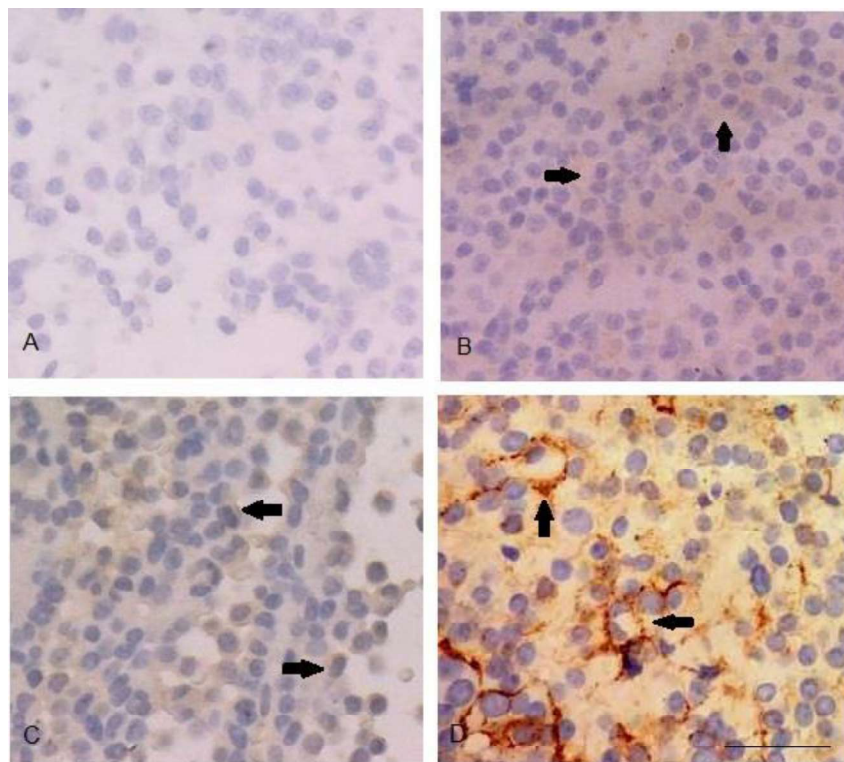


Figure 2: Immunohistochemical expression of NCAM (400x).

A. Negative expression (-); invasive. B. Weak expression (+) (final score: 3); invasive. C. Moderate expression (++) (final score: 6); invasive. D. Strong expression (+++) (final score: 8); invasive. Bar = 200 μ m for both panels.

When NCAM expression was analyzed according to tumor grade, grade I adenomas showed moderate expression in 100% of cases, grade II adenomas

showed weak and strong expression in 75% of cases, grade III adenomas showed weak and moderate expression in 87.5% of cases, and grade IV adenomas showed weak, moderate and strong expression in 72.7% of cases (Table 1). Weak, moderate and strong expression of NCAM was observed in 81.8% of noninvasive tumors and 79% of invasive tumors (Table 1). There was no statistically significant relationship between tumor grade or invasiveness and immunohistochemical expression of ECAD ($p=0.445$) and NCAM ($p=0.708$). There was no statistically significant relationship between tumor grade or invasiveness and negative expression or any positive expression (weak, moderate, and strong) of ECAD ($p=0.543$) and NCAM ($p=0.896$).

Table 1: Immunohistochemical expression of ECAD and NCAM according to tumor grade and invasiveness based on preoperative images.

Grade	(n=30)	Immunohistochemistry							
		ECAD				NCAM			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
I	3	0	0	0	3	0	0	3	0
II	8	0	0	0	8	2	4	0	2
Noninvasive	11	0	0	0	11	2	4	3	2
III	8	1	1	1	5	1	4	3	0
IV	11	0	0	1	10	3	5	2	1
Invasive	19	1	1	2	15	4	9	5	1

Grade I, II, III, and IV (Asa and Ezzat (13)). Immunohistochemical expression: (-) negative, (+) weak, (++) moderate, (+++) strong.

Gene expression of E-cadherin (CDH1), Slug (SNAI2), and NCAM

Due to RNA availability, the samples of 20 patients were analyzed for *CDH1* gene expression. Of these, 10 (50%) showed expression (median, 1.08).

Of 12 samples analyzed for *SNAI2*, none showed gene expression. Of 15 samples analyzed for *NCAM1*, 8 showed gene expression (median, 1.14) (Table 2).

Among noninvasive tumors, 5 (55.6%) expressed E-cadherin (*CDH1*), none expressed Slug (*SNAI2*), and 3 (42.9%) expressed NCAM. Among invasive tumors, 5 (45.5%) expressed E-cadherin (*CDH1*), none expressed Slug (*SNAI2*), and 5 (62.5%) expressed NCAM (Table 2).

Table 2: Gene expression of ECAD (*CDH1*), SLUG (*SNAI2*) and NCAM (*NCAM1*). The data are presented in general samples and according to invasiveness based on preoperative images.

Gene expression	<i>CDH1</i> (n=20)	<i>SNAI2</i> (n=12)	<i>NCAM1</i> (n=15)
n (%)	10(50%)	0(0%)	8(53.3%)
Median	1.08	0.22	1.14
Interquartile range (25th-75th)	0.10-5.64	0.08-0.44	0.72-2.67
Noninvasive tumor	(n=9)	(n=6)	(n=7)
n (%)	5 (55.6%)	0 (0%)	3 (42.9%)
Median	1.20	0.27	0.84
Interquartile range (25th-75th)	0.83-5.20	0.09-0.52	0.33-2.19
Invasive tumor	(n=11)	(n=6)	(n=8)
n (%)	5 (45.5%)	0 (0%)	5 (62.5%)
Median	0.12	0.22	1.36
Interquartile range (25th-75th)	0.02-6.85	0.04-0.36	0.78-3.51

There was no statistically significant relationship between tumor grade or invasiveness and gene expression of *CDH1* ($p=0.295$), *SNAI2*, ($p=0.485$) and *NCAM1* ($p=0.463$).

Discussion

Epithelial-mesenchymal transition is an important process in embryonic development that has been associated with cancer progression and metastasis, and loss of ECAD is considered a key initial step in the transdifferentiation of epithelial cells into a mesenchymal phenotype (16-19). In the present study, 29 (96.7%) patients showed immunohistochemical expression of ECAD.

Several studies of pituitary adenomas have analyzed ECAD and reported positivity in most cases, albeit at varying levels. Yamada et al. (12) analyzed 40 nonfunctioning adenomas and found that 24 cases had moderate to strong staining. Kawamoto et al. (10) identified ECAD at different staining intensities in all pituitary adenomas investigated. Qian et al. (20), investigating functioning and nonfunctioning pituitary adenomas, detected immunohistochemical expression of ECAD in 70% of the sample. Fougner et al. (6) evaluated 80 patients with acromegaly and observed immunohistochemical expression of ECAD in 73% of cases. In the study conducted by Zhou et al. (7), analyzing the immunohistochemical expression of ECAD in 35 GH-secreting tumors, only 2 patients did not express ECAD.

In the present study, 50% of patients showed *CDH1* gene expression. Elston et al. (21) evaluated *CDH1* gene expression and found that, of 30 adenomas analyzed, only one did not show gene expression. Jia et al. (22) found a significant correlation between reduced *CDH1* gene expression and findings of tumor invasion and cystic lesions. In general, PCR methods have increased sensitivity and specificity compared to immunohistochemistry, and agreement between the two methods is poor. The lack of agreement is due to the fact that, despite being complementary techniques, each one analyzes

different aspects of cell biology. The purpose of RT-PCR is to verify whether the gene that produces protein is active through mRNA analysis, whereas immunohistochemistry verifies the presence of protein. In the present study, higher positivity was observed in immunohistochemistry than in PCR. A possible explanation for this finding is that the protein was probably extralocally produced. The significance of this finding may be related to the heterogeneity of tumor cells and the presence of mutation in a small proportion of tumor cells, but the mechanisms involved in this process need further clarification. In addition, as a universal explanation, one can consider the heterogeneity of the tumor and the fact that the immunohistochemically analyzed tissue was not exactly the same tissue fragment examined by RT-PCR. Finally, the expression on mRNA and protein levels was not always synchronized (23-24).

The role of ECAD in pituitary adenoma invasiveness is controversial. Reduced ECAD expression has been described in prolactinomas and is inversely associated with tumor size and invasion (21,25). Studies have demonstrated reduced immunohistochemical expression of ECAD in invasive and recurrent adenomas (4, 6-7) as well as in invasive macroadenomas (20). In the study conducted by Yamada et al. (12), 40 nonfunctioning adenomas were analyzed and no significant difference was observed in the immunohistochemical expression of ECAD between tumors with and without cavernous sinus invasion. Likewise, other studies of pituitary adenomas have found no association between ECAD and tumor invasiveness (10-11, 22), which is consistent with the findings of the present study.

SLUG is a member of the Snail family of transcription factors that acts to suppress ECAD expression and helps regulate tight and adherens junction

stability, desmosome disassembly, and protease expression (8). SLUG overexpression leads to reduced ECAD expression, an important factor for epithelial-mesenchymal transition (26). *In vitro* and *in vivo* studies of different cancer cell lines have demonstrated that SLUG expression is correlated with loss of ECAD (*CDH1*) transcripts, which may influence the prognosis of patients (26-29).

There are few studies in the literature that report on SLUG expression in pituitary adenomas. In a study of 41 nonfunctioning adenomas, the expression of SLUG by immunohistochemistry, PCR and Western blotting was significantly increased in invasive tumors (4). Jia et al. (22) investigated the presence of SLUG in 59 functioning and 36 nonfunctioning adenomas and identified an association of *SNAI2* gene expression with tumor invasiveness and bone destruction of the sella turcica. In the present study, no *SNAI2* expression was detected by the qRT-PCR method. Data interpretation is difficult because *SNAI2* expression is known to be regulated by microRNAs (a group of small non-coding RNAs) and the Wnt (wingless) signaling pathway, although the exact mechanisms of molecular regulation of *SNAI2* are unclear (30,31). Several genes are involved in the pathogenesis of pituitary adenomas, and changes in multiple genes are required for neoplastic transformation, which may reflect the heterogeneous behavior of these tumors (32). In addition to SLUG, other transcription factors, such as SNAIL, TWIST, ZEB1, and ZEB2, may inhibit ECAD transcription and contribute to epithelial-mesenchymal transition (33). Likewise, the methylation status of the *CDH1* gene is also responsible for gene silencing in certain pituitary tumors (32,34).

NCAM is a membrane glycoprotein that belongs to the immunoglobulin superfamily and plays a role in the proliferation, growth, differentiation and survival of different cell types (35). It is known that progression to neoplasia involves the ability to adhere and interact with the surrounding cells and extracellular matrix, and loss or adhesion difficulties may be a determinant of epithelial neoplasia (36). Studies have demonstrated immunohistochemical expression of NCAM in pituitary adenomas, including GH-secreting tumors (5, 37-39).

Regarding invasiveness, Kleinschmidt-DeMasters et al. (38) analyzed 20 pituitary adenomas and found no correlation between NCAM expression and tumor invasiveness, suggesting that this protein is not a useful marker of tumor invasiveness. In the study conducted by Trouillas et al. (5), only polysialylated NCAM (PSA-NCAM) was expressed in 46.3% of adenomas and in 85% of invasive tumors. Similar to our results of 53% of the sample with *NCAM1* gene expression, Rubinek et al. (40) showed, by means of RT-PCR, that this gene was expressed in 67% of GH-secreting adenomas, in only a minority of prolactin-secreting tumors, and in normal pituitary tissue.

In conclusion, the characterization of GH-secreting pituitary adenomas allows the early identification of patients with tumors with a high risk of recurrence or resistant to conventional therapy, thus providing a basis for the development of patient-tailored treatment strategies and follow-up. The absence of SLUG (*SNAI2*) overexpression and of ECAD (*CDH1*) and NCAM (*NCAM1*) suppression suggests that protein and gene expression of ECAD and NCAM and gene expression of SLUG are not associated with tumor invasiveness in GH-secreting pituitary adenomas. Further studies with a larger sample size are

needed to better demonstrate the interrelationship of ECAD, SLUG and NCAM and to determine the influence of these and other markers on the pathogenesis of acromegaly and tumor invasiveness.

References

1. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*. 2004;101:613-619.
2. Annamalai AK, Gayton EL, Webb A et al. Increased prevalence of gallbladder polyps in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:1120-1125.
3. Colao A, Ferone D, Marzullo P, Lombardi G. Systemic complications of acromegaly: epidemiology, pathogenesis, and management. *Endocrine Reviews*. 2004;25:102-152.
4. Zhou W, Song Y, Xu H, Zhou K, Zhang W, Chen J, et al. In nonfunctional pituitary adenomas, estrogen receptors and slug contribute to development of invasiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1237-1245.
5. Trouillas J, Daniel L, Guigard MP, Tong S, Gouvernet J, Jouanneau E, et al. Polysialylated neural cell adhesion molecules expressed in human pituitary tumors and related to extrasellar invasion. *J Neurosurg* 2003;98:1084-1093.
6. Fougner SL, Lekva T, Borota OC, Hald JK, Bollerslev J, Berg JP. The expression of E-cadherin in somatotroph pituitary adenomas is related to tumor size, invasiveness, and somatostatin analog response. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2334-2342.
- 7 Zhou K, Jin H, Luo Y. Expression and significance of E-cadherin and β -catenins in pituitary adenoma. *Int J Surg Pathol*. 2013;21:363-367.
8. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15:117-134.
9. Chauvet N, Romanò N, Meunier AC, Galibert E, Fontanaud P, Mathieu M, et al. Combining Cadherin Expression with Molecular Markers Discriminates

Invasiveness in Growth Hormone and Prolactin Pituitary Adenomas. *J Neuroendocrinol.* 2016;28:1-11.

10. Kawamoto H, Mizoue T, Arita K, Tominaga A, Eguchi K, Kurisu K. Expression of epithelial cadherin and cavernous sinus invasion in human pituitary adenomas. *J Neurooncol* 1997;34:105-109.

11. Xu B, Sano T, Yoshimoto K, Yamada S. Downregulation of E-cadherin and its undercoat proteins in pituitary growth hormone cell adenomas with prominent fibrous bodies. *Endocr Pathol* 2002;13:341-351.

12. Yamada S, Ohyama K, Taguchi M, Takeshita A, Morita K, Takano K, et al. A study of the correlation between morphological findings and biological activities in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurosurgery* 2007;61:580-584.

13. Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev* 1998;19:798-827.

14. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. *World Health Organization Classification of tumors, pathology and genetics of endocrine organs.* Lyon, France: IARC Press; 2004.

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

16. Yamashita S, Miyagi C, Fukada T, Kagara N, Che YS, Hirano T. Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature* 2004;429:298-302.

17. Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol* 2007;213:581-588.

18. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:151-166.
19. Vergara D, Merlot B, Lucot JP, Collinet P, Vinatier D, Fournier I, et al. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett* 2010; 291:59-66.
20. Qian ZR, Sano T, Yoshimoto K, Asa SL, Yamada S, Mizusawa N, et al. Tumor-specific downregulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2007;20:1269-1277.
21. Elston MS, Gill AJ, Conaglen JV, Clarkson A, Cook RJ, Little NS, et al. Nuclear Accumulation of E-Cadherin Correlates with Loss of Cytoplasmic Membrane Staining and Invasion in Pituitary Adenomas. *Endocrinol Metab* 2009;94:1436-1442.
22. Jia W, Zhu J, Martin TA, Jiang A, Sanders AJ, Jiang WG. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers in human pituitary adenomas indicate a clinical course. *Anticancer Res* 2015;35(5):2635-43.
23. Kordek R, Potemski P, Kusinska R, Pluciennik E, Bednarek A. Basal keratin expression in breast cancer by quantification of mRNA and by immunohistochemistry. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;28;29:39.
24. Paja FM, Ugalde OA, Fuertes TE, Oleaga AA. Immunohistochemical detection of the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma. Evaluation against real-time polymerase chain reaction. *Endocrinol Diabetes Nutr*. 2017;64:75-81.

25. Qian ZR, Li CC, Yamasaki H, Mizusawa N, Yoshimoto K, Yamada S, et al. Role of E-cadherin, alpha-, beta-, and gamma-catenins, and p120 (cell adhesion molecules) in prolactinoma behavior. *Mod Pathol* 2002;15:1357-1365.
26. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62:1613-1618.
27. Yoshida J, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi A, Osada R, Ohira S, et al. Changes in the expression of E-cadherin repressors, Snail, Slug, SIP1, and Twist, in the development and progression of ovarian carcinoma: the important role of Snail in ovarian tumorigenesis and progression. *Med Mol Morphol* 2009;42:82-91.
28. Zhang KJ, Wang DS, Zhang SY, Jiao XL, Li CW, Wang XS, et al. The E-cadherin repressor slug and progression of human extrahepatic hilar cholangiocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29:88-97.
29. Shah PP, Kakar SS. Pituitary tumor transforming gene induces epithelial to mesenchymal transition by regulation of Twist, Snail, Slug, and E-cadherin. *Cancer Lett* 2011;311:66-76.
30. Cui Z, Hu Y. MicroRNA-124 suppresses Slug-mediated lung cancer metastasis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20:3802-3811.
31. Wang SH, Chang JS, Hsiao JR, Yen YC, Jiang SS, Liu SH, et al. Tumour cell-derived WNT5B modulates in vitro lymphangiogenesis via induction of partial endothelial-mesenchymal transition of lymphatic endothelial cells. *Oncogene.* 2017;36:1503-1515.
32. Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. Genetic and epigenetic mutations of tumor suppressive genes in sporadic pituitary adenoma. *Mol Cell Endocrinol* 2014 Apr 5;386(1-2):16-33.

33. Ferrari-Amorotti G, Chiodoni C, Shen F, Cattelani S, Soliera AR, Manzotti G, et al. Suppression of invasion and metastasis of triple-negative breast cancer lines by pharmacological or genetic inhibition of slug activity. *Neoplasia* 2014 Dec;16(12):1047-58.
34. Sano T, Rong QZ, Kagawa N, Yamada S. Down-regulation of E-cadherin and catenins in human pituitary growth hormone-producing adenomas. *Front Horm Res* 2004;32:127-32.
35. Gubkina O, Cremer H, Rougon G. Mutation in the neural cell adhesion molecule interferes with the differentiation of anterior pituitary secretory cells. *Neuroendocrinology* 2001;74:335-346.
36. Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat Rev Cancer* 2002;2:836-849.
37. Aletsee-Ufrecht MC, Langley K, Gratzl O, Gratzl M. Differential expression of the neural cell adhesion molecule NCAM 140 in human pituitary tumors. *FEBS Lett* 1990;15:45-49.
38. Kleinschmidt-DeMasters BK, Conway DR, Franklin WA, Lillehei KO, Kruse CA. Neural cell adhesion molecule expression in human pituitary adenomas. *J Neurooncol* 1995;25:205-213.
39. De Jong I, Aylwin SJ, Olabiran Y, Geddes JF, Monson JP, Wood DF, et al. Expression and secretion of neural cell adhesion molecules by human pituitary adenomas. *Ann Clin Biochem* 1999;36:660-665.
40. Rubinek T, Yu R, Hadani M, Barkai G, Nass D, Melmed S, et al. The cell adhesion molecules N-cadherin and neural cell adhesion molecule regulate human growth hormone: a novel mechanism for regulating pituitary hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3724-3730.

4. Considerações finais

Muitos são os fatores envolvidos na biologia dos adenomas hipofisários secretores de GH. Mais recentemente, o processo de transição epitélio-mesenquimal tem sido implicado na patogênese desta neoplasia que, apesar de possuir características benignas, pode ser agressiva e invadir estruturas vizinhas. A investigação de marcadores relacionados à invasão tumoral contribui na compreensão da tumorigênese destes tumores e permite melhorar a avaliação prognóstica de pacientes acromegálicos, principalmente no que se refere à remissão da doença.

No presente estudo não foi verificada superexpressão do Slug, nem supressão dos marcadores de adesividade E-caderina e NCAM, sugerindo que a expressão destes marcadores não está associada com a invasividade tumoral em adenomas hipofisários secretores de GH. Torna-se necessário ampliar a investigação sobre a inter-relação da E-caderina, do Slug e da NCAM, assim como determinar a influência destes e de outros marcadores na patogênese da acromegalia e da invasividade tumoral.

5. Anexos

Anexo 1

Parecer consubstanciado do CEP da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avanços em biologia molecular de Adenomas hipofisários secretores de GH.

Pesquisador: Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19074413.1.0000.5335

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 512.230

Data da Relatoria: 20/12/2013

Apresentação do Projeto:

Estudo transversal, observacional, retrospectivo e prospectivo, a ser realizado com 70 pacientes do Hospital São José da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) que realizaram Hipofisectomia em pacientes com Adenoma de hipófise. Serão utilizados tecido hipofisário normal adjacente ao tumor como controle, para avaliar a expressão gênica dos marcadores em tecido hipofisário normal e amostras do Adenoma.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar marcadores teciduais de tumorigênese e angiogênese em adenomas hipofisários secretores de GH e sua relação com grau de invasividade tumoral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já referidos em parecer anteriormente emitido.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Já referidos em parecer anteriormente emitido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Já referidos em parecer anteriormente emitido.

Recomendações:

Não aplicável.

Endereço: R. Prof. Azevedo Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Salmeri

Bairro: 8º andar - Centro CEP: 90.020-000

UF: RS Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571

E-mail: cep@iscmpa.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 512.230

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ITENS ADEQUADOS:

1.TCLE:

- Situação anterior: retirar do TCLE que a amostra poderá ser utilizada em estudos futuros.
- Situação atual: Retirada a Informação em documento anexado em 19/12/2013.

2.Delineamento do projeto e Riscos:

- Situação anterior: rever delineamento do projeto pois refere que também será observacional (além de retrospectivo e prospectivo).
- Situação atual: alterado o delineamento do projeto para transversal prospectivo, em documento anexado em 19/12/2013.

3.Item "Metodologia proposta", "Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco" e "Justificativa":

- Situação anterior: obtenção de amostras: rever proveniência de amostras, refere que há um biorepositório que pertence ao Grupo de Neuroendocrinologia, mas não refere como será obtido o TCLE destes pacientes.
- Situação atual: nos itens "Metodologia Proposta", "Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco" e "Justificativa"/"Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisador": foram retirados da PB a Informação de uso de amostras retrospectivas provenientes de um biorepositório pertencente ao grupo de Neuroendocrinologia e alterado o número de casos de 70 para 24. Estas informações também são confirmadas na "carta resposta ao parecer", em 19/12/2013.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Após reavaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Endereço: R. Prof. Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer 513.230

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar a este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA, Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior a 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefe do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

PORTO ALEGRE, 20 de Janeiro de 2014

Assinador por:
Claudio Teloken
(Coordenador)

Endereço: R. Prof. Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 8º andar - Centro CEP: 91.020-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@santacasa.br

ANEXO 2

Técnica de Imuno-histoquímica

- Seccionar o bloco de parafina com uma espessura de 3 a 5 micrômetros;
 - Colocar o corte na lâmina previamente preparada com organossilano;
- 1) Desparafinar o tecido:
 - Deixar as lâminas na estufa a 60° C por 30 minutos a 1 hora.
 - Xilol 2x de 5 minutos.
 - Passar nos álcoois absolutos. Deixar 5 minutos no último álcool.
 - Lavar em água destilada por 5 minutos.
 - 2) Recuperação antigênica:
 - Aquecer em banho-maria a solução de citrato de sódio pH 6,0 (ou Tris/EDTA pH 9,0) até 92°C .
 - Colocar as lâminas e deixar por 40 minutos.
 - Retirar do banho e deixar esfriar a temperatura ambiente por 20 minutos.
 - Lavar em água destilada.
 - 3) Bloqueio da peroxidase endógena:
 - Metanol (95 ml) + água oxigenada 30 V (5 ml) 2x de 10 minutos (protegido da luz). Adicionar a água oxigenada somente no momento do uso.
 - Lavar 2x em água destilada.
 - Lavar em PBS por 5 minutos com agitação.
 - 4) Bloqueio das ligações inespecíficas:
 - Incubar com uma solução de proteína inócua à amostra (BSA 1%) por 30 min para mouse e 1 hora para rabbit. Preparo: 200 ml PBS + 2 g albumina bovina.
 - 5) Incubar com anticorpo primário:

- Deixar escorrer o excesso do soro.
 - Aplicar $\pm 50\mu\text{l}$ do anticorpo primário em cada lâmina (diluir em PBS ou BSA).
 - Deixar de 30 minutos a 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, colocar a 4°C (na geladeira) overnight.
 - No outro dia, lavar em PBS 2x de 5 minutos.
- 6) Incubar com anticorpo secundário biotinilado:
- Aplicar o anticorpo secundário sobre cada lâmina e deixar por 40 minutos a temperatura ambiente. Lavar em PBS 2x por 5 minutos.
- 7) Incubar com complexo streptavidin– peroxidase:
- Aplicar o anticorpo terciário sobre cada lâmina e deixar por 40 minutos a temperatura ambiente. Lavar em PBS 2x 5 minutos.
- 8) Revelação com substrato cromógeno (DAB): 1 ml de água destilada + 1 gota do frasco 1 + 2 gotas do frasco 2. Agitar em vórtex e adicionar 1 gota do frasco 3. Pingar sobre as lâminas e deixar 5 minutos.
- Lavar em água corrente e destilada e descartar em frasco identificado.
- 9) Contracorar com Hematoxilina:
- 30 segundos no corante hematoxilina e lavar em água corrente até clarificar a água.
- 10) Desidratar:
- Passar nos álcoois absolutos. Deixar 5 minutos no último álcool.
 - Xilol 2x de 5 minutos.
- 11) Montar com Entellan.

ANEXO 3

1) Extração do RNA:

O procedimento foi realizado conforme as instruções do fabricante, TriReagent (Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS). A técnica segue abaixo:

- Homogeneizar o tecido em 500 μ L de solução desnaturante contendo tiocianato de guanidina (TriReagent). Para realizar a homogeneização foi utilizado um extrator. Para limpeza do extrator entre as amostras, foi usado água Milli-Q e álcool 75%;

- Incubar por 5 minutos em temperatura ambiente;
- Adicionar 100 μ L de clorofórmio;
- Agitar por 15 segundos no vórtex;
- Incubar por 3 minutos à temperatura ambiente;
- Centrifugar a 12.000 giros por 15 minutos a 4°C;
- Transferir fase aquosa para tubo estéril;
- Adicionar 250 μ L de propanol-2. Misturar no vórtex;
- Centrifugar a 12.000 giros por 15 minutos a 4°C;
- Desprezar o sobrenadante (o RNA precipita formando um *pellet*);
- Adicionar 500 μ L de etanol 75% gelado. Usar o vórtex para desagregar;
- Centrifugar a 8.000 giros por 10 minutos a 4°C;
- Desprezar o sobrenadante;
- Inverter o tubo em papel para secagem do *pellet*;
- Adicionar 10 μ L de água estéril previamente tratada com dietilpirocarbonato de sódio (DEPC);
- Incubar em banho maria por 10 minutos a 60°C;
- Incubar por 1 minuto no gelo;

- Centrifugar até 4.000 rpm.

As amostras, após a quantificação, foram armazenadas em biofreezer a -80°C até realização da síntese de DNA complementar.

2) Síntese do cDNA:

O RNA foi reversamente transcrito a cDNA em um volume final de 21 µL. Foi utilizado o kit SuperScript III First-Strand for RT-PCR (Invitrogen, San Diego, CA). A técnica foi realizada conforme instruções do fabricante:

- Para concentrações de até 5 µg de RNA, adicionar 1 µL de dNTP mix, 1 µL de oligodT e 7 µL de água DEPC (qsp);
- Incubar 65°C por 5 minutos;
- Incubar 1 minuto no gelo;
- Adicionar 9 µL da MIX em cada reação (10xRT buffer (2 µL), 25mM MgCl₂ (4µL), 0,1M DTT (2 µL), RNase Out (1 µL));
- Incubar 42°C por 2 minutos;
- Adicionar 1 µL (50 unidades) de Superscript III RT em cada reação;
- Incubar 42°C por 50 minutos;
- Terminar a reação em 70°C por 15 minutos;
- Gelar;
- Adicionar 1 µL de RNaseH em cada reação;
- Incubar 37°C por 20 minutos.

A concentração do cDNA sintetizado foi analisada através do aparelho NanoSpec. A estimativa da quantidade de cDNA foi realizada medindo-se as absorvâncias em 260 nm e em 280 nm, sendo que 260nm corresponde a concentração de ácidos nucleicos (RNA e DNA) e 280nm corresponde a

concentração de proteínas. Os cDNAs foram considerados de boa qualidade quando a relação 260/280 foi superior a 1,7.

As amostras foram armazenadas em freezer -20°C até realização da PCR em tempo real quantitativa.

ANEXO 4

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: **Avanços em Biologia Molecular dos Adenomas Hipofisários Produtores de GH**

Adenomas hipofisários são tumores benignos da glândula hipofisária, sendo adenomas produtores de hormônio do crescimento (GH) os que apresentam características de produção aumentada do hormônio do crescimento (GH). Você está sendo convidado a participar do estudo: “Avanços em Biologia Molecular dos Adenomas Hipofisários Produtores de GH”. Nesse estudo, investigaremos diversos marcadores envolvidos na formação desses tumores para avaliar se há relação com os quadros mais graves desses tumores. Para tanto, o material retirado após a cirurgia, o tumor, será encaminhado ao laboratório de patologia do hospital para identificação do tipo de tumor. Posteriormente, uma porção deste material retirado será estudada quanto à avaliação imuno-histoquímica e de biologia molecular, sem nenhum custo para o convidado.

Os benefícios esperados com os resultados desta pesquisa são para o paciente, para outros pacientes com o mesmo tipo de lesão e para o desenvolvimento da ciência. Não será feito nenhum procedimento adicional na retirada do tumor, não sendo deste modo adicionados riscos. É garantido ao paciente o recebimento de resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca do estudo.

Caso existirem novas perguntas sobre este estudo, sobre os direitos como participante do mesmo ou prejuízo de qualquer natureza pela participação, deve ser contatada a Dra *Julia Pereira-Lima* (investigador principal) pelo telefone (51) 3303.8779 ou o Comitê de Ética em Pesquisa da ISMCPA (51) 3214-8571 ou e-mail: cep@santacasa.tche.br ou o Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA (51) 3303-8804 ou e-mail cep-ceua@ufcspa.edu.br

A participação no estudo é voluntária, dando-se a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo ao tratamento e acompanhamento do paciente.

É dada a garantia de não ser identificado e de ser mantido o caráter confidencial de informação em relação à privacidade do paciente.

É assumido o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade em continuar participando.

É garantido que todos os gastos de realização de exames do protocolo da pesquisa serão absorvidos pelo orçamento do estudo.

Estou ciente de que não serão violados os segredos profissionais obtidos pelo exame clínico e subsidiário aos quais me submeterei. Assino o presente documento, em duas vias de igual teor, ficando uma em minha posse, ciente de todos os benefícios e riscos descritos acima.

A minha assinatura neste *Consentimento Livre e Esclarecido* dará autorização ao coordenador do estudo de utilizar o material retirado e dados obtidos quando se fizer necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha privacidade.

Recebi claras explicações sobre o estudo e sobre este formulário de consentimento. Os pesquisadores responderam a todas as minhas perguntas até minha completa satisfação. Fui informado da disponibilidade dos pesquisadores de fornecer qualquer outra informação que eu desejar, sobre o estudo. Entendo as implicações da minha participação no estudo. Estou de acordo em autorizar a minha participação neste estudo. Recebi uma cópia deste consentimento e uma cópia assinada por mim será mantida na instituição.

Porto Alegre, _____, _____, _____.
(dia) (mês) (ano)

Nome do

Voluntário: _____

Assinatura do Voluntário:

Assinatura do(s) Médico(s) Responsáveis pelo projeto:

Nome da médica responsável: Dra. Julia F. S. Pereira-Lima

ANEXO 5

Trabalhos apresentados

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE E-CADERINA E N-CAM EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS SECRETORES DE GH

dos autores: GRAZIELLA ALEBRANT MENDES; TAIANA HAAG; GERALDINE TROTT; NELSON PIRES FERREIRA; CAROLINA GARCIA SOARES LEÃES RECH; JÚLIA FERNANDA SEMMELMANN PEREIRA-LIMA; MIRIAM DA COSTA OLIVEIRA, foi apresentado, na modalidade Pôster, no evento XVIII Simpósio Internacional de Neuroendocrinologia ocorrido de 16 a 18 de junho de 2016 no Centro de Eventos do Hotel Plaza São Rafael em Porto Alegre/RS.

Porto Alegre, 18 de junho de 2016



XVIII SINE

Simpósio Internacional de Neuroendocrinologia

16 a 18 Junho 2016
Plaza São Rafael | Porto Alegre | RS

REALIZAÇÃO




GERENCIAMENTO





MAURO ANTONIO CZEPIELEWSKI
Presidente do Evento



LUCIO VILAR
Presidente da Comissão Científica

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho
**“EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE E-CADERINA E
 N-CAM EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS SECRETORES DE GH”**
 dos autores: Graziella Alebrant Mendes; Taiana Haag;
 Geraldine Trott; Nelson Pires Ferreira; Carolina Garcia Soares
 Leães Rech; Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima;
 Miriam da Costa Oliveira.

foi o vencedor do prêmio “Melhor Pôster”, pelo **Pôster**
 apresentado durante **XVIII Simpósio Internacional de
 Neuroendocrinologia**, ocorrido de 16 a 18 de junho de 2016 no
 Centro de Eventos do Hotel Plaza São Rafael em Porto
 Alegre/RS.

Porto Alegre, 18 de junho de 2016



XVIII SINE

Simpósio Internacional de
 Neuroendocrinologia

16 a 18 Junho 2016
 Plaza São Rafael | Porto Alegre | RS

Maurício Antônio Czebielewski
 MAURÍCIO ANTONIO CZEBIELEWSKI
 Presidente do Evento

Lucio Vilar
 LUCIO VILAR
 Presidente da Comissão Científica





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTERIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Certificamos que **Graziella Alebrant Mendes** apresentou o trabalho intitulado "AVANÇOS EM BIOLOGIA MOLECULAR DOS ADENOMAS HIPOFISÁRIOS SECRETORES DE GH", na forma de apresentação oral na "X Jornada do Programa de Pós-Graduação em Patologia", nos dias 20 e 21 de agosto de 2015, realizada pela Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Assinatura manuscrita em azul da Maristela Pasin, sobreposta ao nome impresso.

Maristela Pasin

Secretária do Programa de
Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA

ANEXO 6

Comprovante de submissão de artigo científico para publicação



Expression of E-cadherin, Slug and NCAM and its relationship to tumor invasiveness in patients with acromegaly

Journal:	Brazilian Journal of Medical and Biological Research
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Mendes, Graziella; Universidade de Cruz Alta, Ciências da Saúde e Agrárias; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, PPG Patologia Haag, Talana; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia; Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Neuroendocrinologia Trott, Geraldine; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia; Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Neuroendocrinologia Garcia Soares Leães Rech, Carolina; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre Pires Ferreira, Nelson; Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Centro de Neuroendocrinologia Oliveira, Miriam; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia; Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Neuroendocrinologia Kobek, Maria; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia Pereira-Lima, Júlia; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia; Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Neuroendocrinologia
Keywords:	acromegaly, pituitary neoplasms, cadherins, Slug, neural cell adhesion molecules
Social Sections:	Biomedical Sciences/Biochemistry and Molecular Biology