

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

Carolina Petry

**Avaliação do potencial preditivo do
ki67 em relação à evolução tumoral
em pacientes com adenomas
hipofisários**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2016

Carolina Petry

Avaliação do potencial preditivo do ki67 em relação à evolução tumoral em pacientes com adenomas hipofisários

Dissertação 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 Mestre

Orientador: Dra Miriam da Costa Oliveira
Co-orientadora: Dra Júlia Fernanda Semmelmann Pereira Lima

Porto Alegre
2016

Catálogo na Publicação

Petry, Carolina

Avaliação do potencial preditivo do ki67 em relação à evolução tumoral em pacientes com adenomas hipofisários / Carolina Petry. -- 2017.

73 f. : il., tab. ; 30 cm.

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

Orientador(a): Miriam da Costa Oliveira ;
coorientador(a): Júlia Fernanda Semmelmann Pereira Lima .

1. adenomas hipofisários. 2. MANFS. 3. ki67. 4. marcadores tumorais. I. Título.

Dedicatória

Ao que aprendi chamar de Deus, por esta existência.

Aos meus pais, Maria Clara e Celso, em primeiro lugar, pelo amor incondicional, e também por seus exemplos de luta e por todos seus ensinamentos, os quais me tornaram apta a fazer minha história.

Ao meu irmão, Otávio, pelo companheirismo e amor.

Ao meu tio João Cristovão Petry, por acreditar em mim e me motivar a buscar o conhecimento e desenvolvimento intelectual desde criança.

Ao meu tio Itairan da Silva Terres, pelos exemplos de competência, dedicação e ética em nossa profissão e especialidade.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Miriam da Costa Oliveira, pela confiança depositada em mim desde 2004, quando iniciei minhas atividades no Centro de Neuroendocrinologia.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Júlia Fernanda Semmelmann Pereira Lima, pelo incentivo e acolhimento.

À minha colega, Prof^a Dr^a Carolina Garcia Soares Leães Rech, por confiar seus pacientes aos meus cuidados e por compartilhar comigo os bons e maus momentos desta caminhada.

Aos meus muitos amigos, pelo apoio, incentivo e companheirismo.

Ao Centro de Neuroendocrinologia UFCSPA/ISCOMPA, pelo conhecimento adquirido ao longo de todos esses anos.

Às instituições UFCSPA e ISCOMPA, que me permitem nelas recordar o meu passado, viver o meu presente e planejar o meu futuro.

“A mind that opens to a new idea never returns to its original size.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Introdução: Adenomas hipofisários (AH) são tumores benignos relativamente comuns, sendo que uma parcela significativa deles tem comportamento mais agressivo. Muitos estudos têm sido realizados a fim de descobrir algum marcador deste pior comportamento.

Objetivo: Avaliar o potencial do índice Ki67 em prever a evolução pós-operatória dos adenomas hipofisários em relação ao resíduo e recrescimento tumoral de acordo com o ponto de corte de 3%.

Material e Métodos: Foram incluídos 52 pacientes no estudo, 28 mulheres (53,8%), com idade média $43,5 \pm 14,1$ anos. Os AH eram não-funcionantes em 29 casos, secretores de GH em 18 e secretores de ACTH em 5 casos. Em 23 casos, o Ki67 foi igual ou maior que 3%.

Resultados: Quando os dois grupos, de acordo com o $Ki67 < 3\%$ ou $Ki67 \geq 3\%$, foram comparados, o resíduo tumoral na primeira imagem (73 vs. 52%, $p=0,15$) e na última imagem pós-operatória (56 vs. 48%, $p=0,58$), a necessidade de nova intervenção (43 vs. 34%, $p=0,57$) e a invasão do seio cavernoso na última imagem (43 vs. 24%, $p=0,23$) foram sempre maiores no grupo com $Ki67 \geq 3\%$. Recrescimento tumoral ocorreu somente em 4 pacientes, todos eles com $Ki67 < 3\%$. Um paciente com adenoma secretor de GH evoluiu com diagnóstico de carcinoma hipofisário.

Conclusão: Quando comparados dois grupos de pacientes de acordo com o ponto

de corte do Ki67 de 3%, observa-se que a maior ocorrência de resíduo tumoral e invasão do seio cavernoso não são acompanhadas de significância estatística. Estes achados não permitem sugerir neste momento que um manejo terapêutico mais agressivo deva ser indicado, a priori, para pacientes com adenomas hipofisários cujos estudos imuno-histoquímicos revelem um $Ki67 \geq 3\%$.

Palavras-chave: adenoma hipofisário; Ki67; marcador proliferativo; invasão tumoral; recorrência tumoral

ABSTRACT

Introduction: Pituitary adenomas (PA) are relatively common benign tumors, and a significant proportion of them exhibit more aggressive behavior. Many studies have been conducted in order to identify potential markers of this worse prognosis.

Objective: To evaluate the potential of the Ki67 index in predicting postoperative outcomes of pituitary adenomas regarding residual tumor and regrowth, using a 3% cutoff point.

Material and Methods: Fifty-two patients were included in the study, 28 women (53.8%), with a mean age of 43.5 ± 14.1 years. PA were non-functioning in 29 cases, GH-secreting in 18, and ACTH-secreting in 5 cases. In 23 cases, Ki67 was equal to or greater than 3%.

Results: When comparing the two groups according to Ki67 $<3\%$ or Ki67 $\geq 3\%$, tumor residue on the first imaging exam (73 vs. 52%, $p=0.15$) and on the last postoperative imaging exam (56 vs. 48%, $p=0.58$), the need for reintervention (43 vs. 34%, $p=0.57$), and cavernous sinus invasion on the last imaging exam (43 vs. 24%, $p=0.23$) were consistently higher in the Ki67 $\geq 3\%$ group. Tumor regrowth occurred in only 4 patients, all of them with Ki67 $<3\%$. One patient with a GH-secreting adenoma progressed to a diagnosis of pituitary carcinoma.

Conclusion: When comparing two groups of patients based on the Ki67 cutoff of 3%, the higher occurrence of tumor residue and cavernous sinus invasion was not accompanied by statistical significance. These findings do not currently support recommending a priori more aggressive therapeutic management for patients with pituitary adenomas whose immunohistochemical studies show Ki67 $\geq 3\%$.

Keywords: pituitary adenoma; Ki67; proliferative marker; tumor invasion; tumor recurrence

Lista de ilustrações

Figura 1. Cascata de tumorigênese hipofisária	4
--	----------

Lista de tabelas

Tabela 1.	Genes associados ao ciclo celular e à patogênese dos AH	3
Tabela 2.	Classificação de Knosp	7
Tabela 3.	Classificação de adenomas hipofisários de acordo com a malignidade	10
Tabela 4.	Principais biomarcadores de agressividade em adenomas hipofisários	12
Tabela 5.	Correlação do Ki67 com invasão tumoral em adenomas hipofisários	17
Tabela 6.	Correlação do Ki67 com recorrência/recrescimento tumoral	24

Lista de abreviaturas

AH: adenoma hipofisário

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

CCNB2: ciclina B2

CCND1: ciclina D1

CDK: quinase ciclina-dependente

CH: carcinoma hipofisário

CDKN2A: inibidor 2A de CDK

CDKN1B: inibidor de CDK

DNA: ácido desoxirribonucleico

FGFR4: *Fibroblast Growth Factor Receptor 4*

FSH: hormônio folículo estimulante

GH: hormônio do crescimento (*growth hormone*)

HMGA2: *High Mobility Group AT-Hook 2*

HEPN1: *Hepatocellular carcinoma downregulated 1*

LH: hormônio luteinizante

miRNA: micro RNA

MMP: metaloproteinases matriciais

OMS: Organização Mundial da Saúde

PPTG: *Pituitary tumor transforming gene*

pRb: proteína associada ao retinoblastoma

PRL: prolactina

RNA: ácido ribonucleico

RNM: ressonância nuclear magnética

TSH: hormônio estimulante da tireoide

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Epidemiologia	1
1.2. Patogênese dos Adenomas Hipofisários	2
1.3. Classificação dos Adenomas Hipofisários	4
1.3.1. Classificação histológica	4
1.3.2. Classificação imuno-histoquímica	5
1.3.3. Classificação clínica e bioquímica	5
1.3.4. Classificação radiológica	6
1.3.5. Outras classificações	8
1.3.6. Carcinomas hipofisários	9
1.4. Marcadores clínicos e imuno-histoquímicos do comportamento tumoral	10
1.5. Biomarcadores de agressividade tumoral	12
1.6. O Ki67 como marcador tumoral para adenomas hipofisários	13
1.6.1. O Ki67 e o poder de invasão dos adenomas hipofisários	14
1.6.2. O Ki67 e o tamanho dos adenomas hipofisários	18
1.6.3. O Ki67 e a classificação clínica dos adenomas hipofisários	19
1.6.4. O Ki67 e a recorrência tumoral dos adenomas hipofisários	20
1.6.5. A utilização do Ki67 na prática clínica	26
1.7. Referências bibliográficas	29
2. Objetivos	34

3. Artigo científico redigido em inglês	35
4. Considerações finais	51
5. Anexos	52

1. Introdução

Adenomas hipofisários (AH) são tumores benignos relativamente comuns, de crescimento lento em sua maioria, originários da hipófise anterior (adeno-hipófise) e localizados na região da sela turca. Uma parcela significativa destes tumores tem comportamento mais agressivo, invadindo estruturas adjacentes à sela turca e apresentando taxas de recrescimento e recidiva mais elevadas. Com o objetivo de prever o comportamento dos AH, são utilizados marcadores tumorais, entre eles um antígeno nuclear marcador de replicação celular, o Ki67. Atualmente, o Ki67 é incluído na rotina do estudo imuno-histoquímico dos AH ressecados; entretanto, não foi apresentado até o presente momento um protocolo que utilize este marcador como um definidor nas tomadas de decisões em relação ao tratamento e seguimento dos pacientes. Tendo em vista o acima exposto, o que se segue é uma revisão sobre os AH, com ênfase no estudo do potencial preditivo de comportamento tumoral do índice Ki67.

1.1. Epidemiologia

Os AH compreendem aproximadamente 15% das neoplasias intracranianas, fazendo deles o terceiro tumor intracraniano mais comum, atrás somente dos meningiomas e gliomas (Scheithauer e cols., 2006). Alguns estudos revelam uma prevalência que varia entre 25 e 94 casos/ 100.000 habitantes (Davis e cols., 2001; Fernandez, Karavitaki e Wass, 2010; Daly e cols., 2006). A maioria dos AH desenvolve-se esporadicamente; entretanto, aproximadamente 5% dos casos ocorre em um contexto de síndromes familiares, havendo sido identificado um número

expressivo de genes envolvidos (Sapochnik e cols., 2016). A maioria deles ocorre em mulheres (Scheithauer e cols., 2006; Fernandez, Karavitaki e Wass, 2010) entre a terceira e sexta décadas, apesar de poderem ser encontrados em qualquer idade (Tortosa e Webb, 2016). Os pacientes masculinos apresentam maior predisposição a desenvolverem adenomas não-funcionantes e macroadenomas (Scheithauer e cols., 2006). Apesar de serem considerados histologicamente benignos, 30-45% dos AH invadem os seios cavernosos ou o esfenoidal, e apresentam alta recorrência durante o seguimento, caracterizando-se como agressivos (Trouillas, 2014).

1.2. Patogênese dos Adenomas Hipofisários

Nos últimos anos, tem sido realizado um progresso considerável na identificação dos mecanismos e fatores envolvidos na iniciação e progressão de AH. A tumorigênese hipofisária parece ser um processo complexo, no qual participam fatores intrínsecos e extrínsecos (Sapochnik e cols., 2016).

O ciclo celular na hipófise é regulado pelas ciclinas, as quais estimulam as quinases ciclinas-dependentes (CDKs). Quando ativadas, estas CDKs fosforilam e inativam a proteína associada ao retinoblastoma (pRb), que é fator supressor de tumor. A forma ativa da pRb se liga ao fator de transcrição E2F, que bloqueia a progressão do ciclo celular durante a transição da fase G1 para S, prevenindo que o DNA danificado seja replicado. Pelo contrário, quando fosforilada, a pRb permite a progressão do ciclo celular (Melmed, 2011).

Os AH são tumores benignos monoclonais, sugerindo que de fato eles se desenvolvem de células precursoras individuais, que levam superioridade proliferativa em relação às demais (Melmed, 2011). A desregulação do ciclo celular é considerada como um evento patogênico para formação de AH, sendo estimado que 80% dos AH em humanos decorre de alterações em pelo menos um regulador do ciclo celular, como hiperexpressão de ciclinas, *downregulation* da família de inibidores das CDKs e expressão da pRb (Sapochnik e cols., 2016).

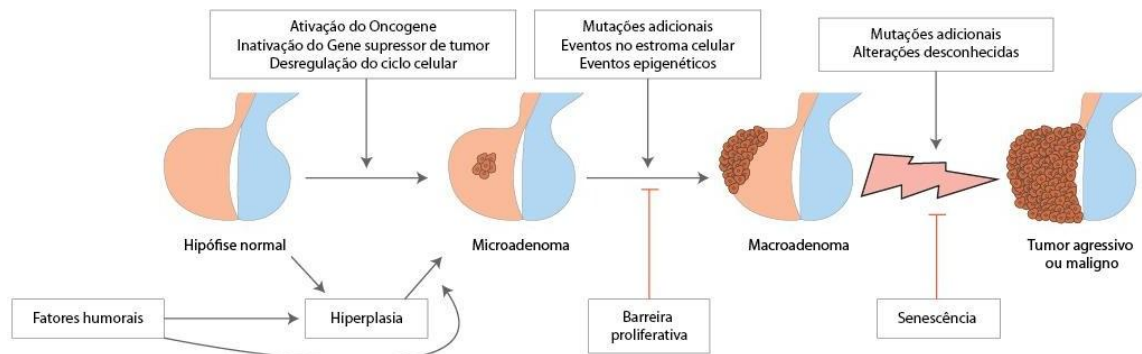
Fatores de iniciação e promoção de tumores específicos (Tabela 1) têm sido caracterizados em modelos animais, assim como em amostras limitadas de tecidos humanos. Estes fatores têm sido relacionados com o aumento do potencial proliferativo no precursor celular para formação do adenoma e subsequente crescimento tumoral, incluindo anormalidades genéticas e epigenéticas, rupturas parácrinas do fator de crescimento e um microambiente intrapituitário alterado (Sapochnik e cols., 2016; Melmed, 2011; Melmed, 2015). Na Figura 1, consta um gráfico proposto para ilustrar simplificada a tumorigênese hipofisária.

Tabela 1: Genes associados ao ciclo celular e à a patogênese dos AH

Gene	Função	Modo de ativação/inativação
CCNB2	Ciclina	Induzido por HMGA
CCND1	Oncogene	Hiperexpresso
CDKN1B	Inibidor de CDK	Inativado
HMGA2	Oncogene	Hiperexpresso
FGFR4	Oncogene	Transcrição alternativa
PTTG	Securina	Hiperexpresso
Rb	Supressor de tumor	Silenciado epigeneticamente
CDKN2A	Inibidor de CDK	Silenciado epigeneticamente

(Adaptado de Melmed, 2015)

Figura 1: Cascata de tumorigênese hipofisária



(Adaptado de Melmed, 2011)

1.3. Classificação dos Adenomas Hipofisários

Os adenomas hipofisários podem ser classificados baseando-se em diversos critérios: histológicos, imuno-histoquímicos, achados ultraestruturais, clínicos e bioquímicos, radiológicos e cirúrgicos (Tortosa e Webb, 2016). Mais recentemente, na tentativa de prever o comportamento tumoral e assim um prognóstico, foram sugeridas novas formas de classificação dos AH (Trouillas e cols., 2013).

1.3.1. Classificação histológica

Antigamente, os AH eram estudados de acordo com a afinidade de coloração do citoplasma celular à hematoxilina-eosina e eram divididos em acidófilos, basófilos e cromóforos. Acreditava-se que os adenomas acidófilos produziam excesso de hormônio do crescimento (GH) e eram relacionados à acromegalia e gigantismo; adenomas basófilos secretariam ACTH, sendo, portanto ligados à Doença de Cushing; e os adenomas cromóforos eram considerados tumores inativos

desacompanhados de excesso hormonal (Kovacs, Horvath e Vidal, 2001). Atualmente, apesar de saber-se que a classificação tumoral baseada na coloração hematoxilina-eosina não se correlaciona com o estado funcional, esta avaliação permanece válida, visto que possibilita a diferenciação de outras patologias, permite avaliar atipias celulares ou atividade mitótica e revela hemorragias ou necrose (Tortosa e Webb, 2016).

1.3.2. Classificação Imuno-histoquímica

Esta classificação constitui o padrão-ouro para diagnóstico e para análise dos principais hormônios hipofisários (prolactina - PRL, hormônio de crescimento - GH, hormônio adrenocorticotrófico - ACTH, hormônio estimulante da tireoide - TSH, hormônio luteinizante - LH e hormônio folículo-estimulante - FSH), aos quais podemos adicionar a subunidade alfa dos hormônios glicoproteicos (LH, FSH e TSH) (Tortosa e Webb, 2016). Alguns AH são imuno-negativos para todos os hormônios hipofisários e são chamados de adenomas *null cell*, estando neles ausente a hipersecreção hormonal clínica ou bioquímica (Kovacs, Horvath e Vidal, 2001). Além destes, existem ainda os adenomas silenciosos, que são aqueles com imunoexpressão para um ou mais hormônios, porém são clinicamente não-funcionantes.

1.3.3. Classificação Clínica e Bioquímica

Podemos classificar os AH de acordo com a apresentação clínica e função hipofisária em funcionantes, que secretam um ou mais hormônios, e não-

funcionantes.

No subgrupo dos funcionantes mono-hormonais, adenomas somatotróficos produzem GH, adenomas lactotróficos PRL, adenomas corticotróficos ACTH, adenomas tireotróficos TSH, e adenomas gonadotróficos FSH ou LH ou ambos. O excesso hormonal é acompanhado por diversas síndromes clínicas. A hipersecreção de GH resulta em acromegalia ou gigantismo; a hiperprolactinemia pode estar associada à amenorreia e galactorreia e infertilidade em mulheres e, nos homens, à diminuição da libido e impotência; a hipersecreção de ACTH é a causa da Doença de Cushing; o excesso de TSH pode resultar em hipertireoidismo. As manifestações clínicas do excesso de LH e FSH não são claramente definidas. Adenomas pluri-hormonais são compostos por dois ou mais tipos de células distintas, cada uma produzindo o seu respectivo hormônio (Kovacs, Horvath e Vidal, 2001); clinicamente, estes adenomas são denominados co-secretores, manifestando-se com uma combinação de sinais e sintomas associados aos hormônios hipersecretados.

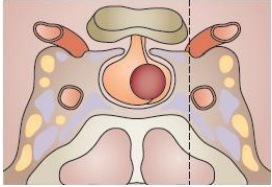
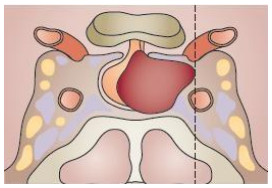
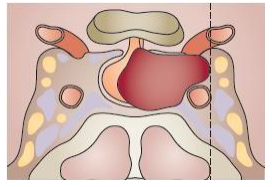
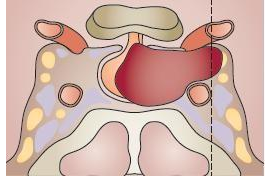
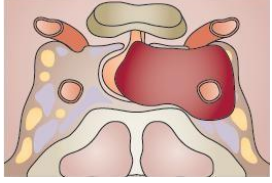
1.3.4. Classificação radiológica

Em relação aos estudos de imagem dos AH, podemos classificá-los de acordo com seu tamanho, assim como em relação à extensão e invasão de estruturas adjacentes.

Os AH podem ser classificados em microadenomas (diâmetro $<1\text{cm}$), macroadenomas (diâmetro $\geq 1\text{cm}$) ou adenomas gigantes (diâmetro $\geq 4,0\text{cm}$) (Trouillas e cols., 2013).

Adenomas invasivos são considerados tumores com crescimento para estruturas adjacentes, tais como seios cavernosos, ossos e seio esfenoidal. A extensão suprassellar não é considerada um critério de invasão. A RNM é o método mais comumente utilizado para classificar o grau de invasão, e a classificação de Knosp (Tabela 2), que é feita de acordo com o grau de invasão do seio cavernoso, é a mais amplamente utilizada (Sav e cols., 2015; Knosp e cols., 1993). Neste sistema de classificação, os AH classificados como graus 3 ou 4 é que são definidos como verdadeiramente invasivos de seios cavernosos (Di leva e cols., 2014).

Tabela 2: Classificação de Knosp

Característica radiológica	Gráfico ilustrativo
<p>Grau 0: o tumor não invade o seio cavernoso; o tumor não ultrapassa a linha tangencial que une a parede medial da artéria carótida interna supravernosa com a carótida interna intracavernosa;</p>	
<p>Grau 1: o tumor ultrapassa a tangente medial (definida como a linha que une uma das bordas mediais da carótida supra e intracavernosa), mas não ultrapassa a linha tangencial que une os dois centros da carótida supra e intracavernosa;</p>	
<p>Grau 2: caracteriza-se pelo tumor que se estende sem ultrapassar a tangente que une as bordas laterais da carótida supra e intracavernosa;</p>	
<p>Grau 3: o tumor se estende lateralmente ultrapassando a linha tangencial lateral que une a porção da carótida supravernosa com a intracavernosa;</p>	
<p>Grau 4: caracteriza-se pelo englobamento completo da carótida pelo tumor.</p>	

(Adaptado de Di leva e cols., 2014)

1.3.5. Outras classificações

Dados o comportamento tumoral imprevisível e sua diversidade funcional, muitos esforços têm sido expendidos em estudos de correlação clinicopatológica (Scheithauer e cols., 2006).

Em 2004, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um sistema de classificação para AH em que classifica os adenomas benignos como adenomas típicos, e identifica como adenomas atípicos aqueles com comportamento limítrofe ou incerto (Lloyd e cols. 2004). Estes adenomas apresentam achados morfológicos sugestivos de comportamento agressivo, como crescimento invasivo. Outros achados incluem um elevado índice mitótico e um índice de marcação de Ki67 maior que 3%, assim como uma coloração nuclear extensa para imunorreatividade da p53, uma proteína que tem como função o bloqueio da divisão celular de células geneticamente transformadas (Ferreira e cols., 2005). Nesta classificação, apesar de incluído, o critério de invasão não é sistematicamente considerado, visto que não discrimina os graus de acometimento das estruturas adjacentes, tornando os resultados dos trabalhos que se utilizam desta classificação muito discrepantes (Trouillas, 2014). Além disso, esta classificação não engloba todo o espectro de achados histopatológicos ou comportamento clínico dos AH (Di leva e cols., 2014).

AH clinicamente agressivos podem ser micro ou macroadenomas, não-invasivos ou invasivos, ou de crescimento expansivo, caracterizados por alta taxa de recorrência. Estes parecem representar uma entidade distinta, que necessita ser reconhecida, levando em consideração comportamento clínico tanto quanto os

achados histopatológicos, moleculares e radiológicos. Conseqüentemente, necessitam critérios diagnósticos específicos e requerem um seguimento estrito com tratamentos múltiplos precoces (Di Ieva e cols., 2014).

Sendo assim, mais recentemente, em 2013, Trouillas e colaboradores propuseram uma nova classificação prognóstica clinicopatológica. Considerando a invasão de seios cavernoso e esfenoidal na imagem de ressonância, marcadores do ciclo celular (ki67 e índice de mitose) e p53, os tumores foram classificados de acordo com o tamanho (microadenomas, macroadenomas ou gigantes), tipo (produtor de somatotropina, prolactina, corticotropina, tireotropina ou gonadotropinas) e grau (grau 1a: não-invasivo, 1b: não-invasivo e proliferativo; 2a: invasivo; 2b: invasivo e proliferativo, e 3: metastático) (Trouillas e cols., 2013).

Outra proposta de classificação de AH de acordo com a malignidade é exposta na Tabela 3.

1.3.6. Carcinomas hipofisários

Carcinomas hipofisários (CH) são muito raros, sendo diagnosticados somente quando um tumor hipofisário é encontrado de forma não contígua à região selar. CH podem se apresentar em qualquer idade, mas tipicamente apresentam-se entre a terceira e quinta década de vida em pacientes com AH preexistentes. Não há clara predileção por gênero nos carcinomas hipofisários. CH tendem a disseminar sistematicamente via linfática e hematogênica ao invés de via cranioespinal, com uma frequência reportada de 47% de metástases sistêmicas, 40% de metástases

cranioespinhais e 13% de ambas (sistêmicas e cranioespinhais concomitantes) (Heaney, 2011).

Tabela 3: Classificação de adenomas hipofisários de acordo com a malignidade

Características tumorais	Tumor benigno/ adenoma	Tumor suspeito de malignidade/grau 2b	Tumor maligno/ carcinoma
Tamanho do tumor	< ou > 10mm	>10mm	>10mm
Invasão	Não	Sim	Sim
Metástases	Não	Não	Sim
Número de mitoses	<2	>2	2-10 (anormal)
Ki67	0 ou <3%	>3%	>10%
Positividade para p53	0	Variável	Usualmente positiva
Neoangiogênese	0	0	Variável
Invasão vascular	0	0	Rara

(Adaptado de Trouillas, 2014)

Marques e colaboradores (2014) publicaram um relato de caso sobre uma paciente com um macroadenoma não-funcionante invasivo e com comportamento agressivo, que necessitou reintervenção em menos de um mês após a primeira cirurgia por recrescimento muito rápido, e a paciente evoluiu a óbito quase dois meses após o surgimento dos primeiros sintomas; tal tumor apresentou Ki67 estimado de 75% no estudo histopatológico. Ao final do artigo, os autores questionaram tanto a classificação dos AH de 2004 pela OMS quanto o diagnóstico de carcinoma hipofisário.

1.4. Marcadores clínicos e imuno-histoquímicos do comportamento tumoral

Yamada e colaboradores (2007) publicaram um estudo alertando sobre a importância de diferenciar as características morfológicas dos adenomas hipofisários

não-funcionantes, a fim de auxiliar na previsão do comportamento e prognóstico do tumor. Neste estudo, adenomas corticotróficos silenciosos foram os que mais apresentaram invasão de seios cavernosos.

Roelfsema, Biermasz e Pereira (2012) realizaram uma revisão e metanálise sobre os fatores clínicos envolvidos na recorrência de AH após remissão cirúrgica; sua análise indicou que a remissão é menor em pacientes com adenomas não-funcionantes, e a recorrência é maior em pacientes com prolactinomas. O pico de incidência de recorrência tumoral foi entre um e cinco anos após a cirurgia. O fator preditor de recorrência mais importante para os adenomas funcionantes foi o nível hormonal basal (não estimulado) pós-operatório, enquanto nenhum fator isolado pode ser identificado para os não-funcionantes. Além disto, encontraram um maior risco de recorrência em prolactinomas em relação aos demais adenomas funcionantes e não-funcionantes com diferença significativa ($P=0,007$).

Losa e colaboradores (2008) analisaram o risco de recorrência tumoral em pacientes com adenomas não-funcionantes. Em um tempo de seguimento médio de 53 meses, a recorrência ocorreu em 19% (83 de 436 pacientes). Invasão do seio cavernoso, diâmetro máximo do tumor e ausência de apoplexia tumoral foram associados com desfecho desfavorável. Quando a ressecção tumoral foi aparentemente completa, a idade mais jovem na cirurgia foi associada com risco de recorrência tumoral.

Bodhinayake e colaboradores (2014) publicaram um estudo retrospectivo com 64 pacientes submetidos à cirurgia transesfenoidal endonasal endoscópica para

ressecção de AH, a fim de avaliar os fatores de risco para recorrência tumoral. Após um tempo médio de 24,3 meses entre a cirurgia e a última avaliação, somente 6 pacientes (9,4%) apresentaram recorrência. A análise revelou que um diâmetro máximo maior que 10mm estava significativamente associado com recorrência. Somente 20% dos pacientes com resíduo tumoral apresentou recorrência.

1.5. Biomarcadores de agressividade tumoral

Com objetivo de prever o comportamento de tumores hipofisários, diversos marcadores biológicos têm sido investigados, incluindo alterações cromossômicas e microRNAs, marcadores de proliferação, oncogenes, genes de supressão tumoral, fatores de crescimento e seus receptores, e fatores relacionados a angiogênese e de adesão celular (Metz, Ezzat e Asa, 2012). Alguns biomarcadores estão citados na Tabela 4.

Tabela 4: Principais biomarcadores de agressividade em adenomas hipofisários

Biomarcador	Papel fisiológico	Características em AH
Ki67* (<i>Labeling Index: LI</i>)	Marcador de divisão celular Índice proliferativo em neoplasias	Ki67 LI >3%: marcador de agressividade (S: 73% e E:97%)
P53*	Proteína supressora de tumor Garante a estabilidade do genoma	Hiperexpressão em adenomas agressivos
FGFR-4 (<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 4</i>)	Isoforma 4 do receptor de FGF (fator de crescimento de fibroblasto) Regulador do crescimento, da diferenciação e da migração celular na angiogênese	Hiperexpressão de uma forma truncada de FGFR-4 (PDT-FGFR-4), aumentando o potencial de invasividade celular nos AH agressivos
MMPs (<i>Metaloproteinases Matriciais</i>)	Família de enzimas proteolíticas Regula a estruturação da matriz extracelular	O polimorfismo nucleotídico com inserção de uma guanina no promotor de MMP1 é observado em 90% dos casos de AH agressivos
PTTG	Proteína da família das securinas,	A expressão de PPTG é maior

	regulador da divisão celular	nos AH funcionantes invasivos, que nos não invasivos
HEPN1 (<i>Hepatocellular carcinoma downregulated 1</i>)	Gene supressor de tumor	HEPN1 é subexpresso nos AH invasivos versus não-invasivos
Endocan (<i>Endothelial cell specific molecule-1</i>)	Proteoglicano Marcador de neoangiogênese	O nível de expressão de Endocan nas células endoteliais se correlaciona com o tamanho dos AH e seu potencial de agressividade
Instabilidade genômica 11q e/ou 11p	Cromossomo 11 Hospeda o locus MEN1 e AIP	Instabilidade genômica 11p associa-se a um comportamento mais agressivo em prolactinomas
miRNA let-7	Pequena interferência no RNA Alvo HMGA2 e STAT3 em hipofisárias	Subexpressão de let-7 em AH invasivos

* Biomarcadores atualmente utilizados para a definição de adenomas atípicos segundo a classificação dos AH de 2004 da OMS.

(Adaptado de Cuny e Chanson, 2013)

Por exemplo, um gene importante envolvido na tumorigênese hipofisária é o *Pituitary tumor transforming gene* (PTTG), que controla a separação das cromátides irmãs durante a metáfase, também induzida pelo fator de transcrição E2F na glândula hipófise. O PTTG é um proto-oncogene que, além de exibir propriedades oncogênicas, facilita a progressão do ciclo celular, estando hiperexpresso em uma grande proporção de tumores hipofisários (Sapochnik e cols., 2016)

1.6. O Ki67 como marcador tumoral para adenomas hipofisários

Dentre os marcadores estudados, o Ki67 é o mais confiável para prever comportamento agressivo segundo diversos estudos, que serão expostos a seguir. O Ki67 é um antígeno nuclear utilizado como marcador da divisão celular, sendo usualmente medido para determinar o índice de proliferação celular em neoplasias,

especialmente naquelas de origem neuroendócrina (Mete, Ezzat e Asa, 2012). Em tumores pituitários, a expressão do Ki67 foi demonstrada pela primeira vez por Burger, Shibata e Kleihues (1986). Uma revisão publicada em 2009 já mostrava diversos estudos que tentaram correlacionar o índice de Ki67 com vários parâmetros clínico-patológicos (grau de invasão do tumor, tamanho tumoral, subtipo hormonal e recorrência/recrescimento tumoral) para predizer o curso e auxiliar no manejo clínico dos AH (Salehi e cols., 2009).

O Ki67 é detectado rotineiramente através de análise imuno-histoquímica por um anticorpo monoclonal (MIB-1). O índice de marcação de Ki67, definido pela porcentagem de positividade nuclear, é um método muito facilmente reprodutível e confiável. O índice varia de acordo com o fixador, sendo mais baixo com o Bouin-Hollande que com o formol (Trouillas, 2014).

Os valores de índice de Ki67 em AH variam de menos de 1% até 23% (Salehi e cols., 2009). A vasta maioria mostra valores de Ki67 entre 1 e 2%, enquanto valores maiores que 3% são incomuns (Chatzellis e cols., 2015). Atualmente, considera-se o ponto de corte de 3% para definir tumores atípicos, ou seja, de comportamento incerto (Trouillas, 2014).

1.6.1. O Ki67 e o poder de invasão dos adenomas hipofisários

O poder de invasão de um adenoma hipofisário continua sendo um fenômeno pouco compreendido, pois as bases biológicas permanecem obscuras (Thapar e cols., 1996). Amar e colaboradores já alertavam, em 1999, que compreender a base

biológica da invasão tumoral, correlacionando com a proliferação celular e a significância prognóstica é crucial para melhorar os resultados de pacientes que possuem tumores hipofisários agressivos (Amar e cols., 1999). Atualmente, muitos estudos mostraram uma associação significativa do Ki-67 com invasão tumoral (Wolfsberger e cols., 2004; Fusco e cols., 2008; Salehi e cols., 2009).

O primeiro estudo que correlacionou o índice Ki67 com o poder de invasão dos AH foi realizado por Landolt, Shibata e Kleihues e publicado em 1987. Este estudo mostrou Ki67 mais elevado em tumores invasivos que em tumores não invasivos.

Thapar e colaboradores (1996) reportaram que o ponto de corte do índice Ki67 de 3,0% é associado com 72,7% de sensibilidade e 97,3% de especificidade e valores preditivo positivo e negativo de 96 e 80%, respectivamente, em distinguir adenomas pituitários não-invasivos de invasivos. Os mesmos autores também sugerem que um índice de Ki67>10% deve sempre levar à suspeição de potencial de malignidade do tumor.

Zhao, Tomono e Nose (1999), ao estudarem uma série de 123 casos de AH, também encontraram diferença significativa do Ki67 entre AH invasivos e não-invasivos (Zhao, Tomono e Nose, 1999).

Yokoyama e colaboradores (2001) publicaram um artigo, cujo resultado indicava que adenomas hipofisários não-funcionantes que se estendiam aos seios cavernosos não eram nem agressivos, nem invasivos, visto que a alta incidência

desta característica em adenomas benignos devia-se a fragilidade da parede medial dos seios cavernosos. Não houve diferença significativa do índice Ki67 entre o grupo com extensão ao seio cavernoso e o grupo controle.

Pizzarro e colaboradores (2004) mostraram que os tumores pituitários invasivos têm um índice Ki67 significativamente maior que os macroadenomas não-invasivos ($2,01 \pm 3,15\%$ VS $1,12 \pm 1,87\%$; $P=0,02$); entretanto, o índice Ki67 não foi significativamente diferente nos pacientes com invasão do seio cavernoso comparado com os outros tipos de invasão.

Pan e colaboradores (2005) publicaram um estudo sobre ressonância nuclear magnética e biomarcadores em AH invasivos dos seios cavernosos, no qual avaliaram o Ki67 em um total de 45 amostras, sendo 25 de AH invasivos, e encontraram diferença significativa deste marcador em relação ao grau de invasão tumoral ($P=0,039$).

Em um estudo conduzido por Suzuki e colaboradores (2006), quando foram analisados marcadores de proliferação celular em incidentalomas hipofisários, não foi encontrada diferença significativa com relação ao Ki67 e grau de invasão tumoral, sendo que os valores de Ki67 apresentaram tendência a estarem mais elevados nos tumores pouco ou não-invasivos (graus 0 a 2 de Knosp) em comparação aos demais.

Já em outro estudo, Madsen e colaboradores (2011) analisaram 17 casos de AH gigantes (diâmetro do tumor maior que 4cm em um dos planos) e encontraram

uma média de Ki67 de 2,7% em AH gigantes e invasivos contra 1,3% em AH não-gigantes e não-invasivos. O Ki67 dos AH gigantes e invasivos não foi invariavelmente >3%, assim como um AH não-agressivo mostrou Ki67 de 3%.

Sánchez-Tejada e colaboradores (2013) realizaram um estudo sobre potenciais marcadores de prognóstico para tumores hipofisários e não encontraram diferença do índice Ki67 entre os adenomas invasivos e não-invasivos.

Em mais recente estudo com o propósito de correlacionar o Ki67 com a expressão de outro biomarcador, a osteonectina, Onoz e colaboradores (2015) não encontraram diferença significativa do índice Ki67 com grau de invasão tumoral. De um total de 40 pacientes, somente 24% dos AH invasivos apresentavam Ki67 acima de 1%.

A Tabela 5 apresenta alguns estudos em que foram comparados os valores de Ki67 entre os grupos de adenomas invasivos com os não-invasivos.

Tabela 5: Correlação do Ki67 com invasão tumoral em adenomas hipofisários

Autor, ano	N	Variável estatística	Adenomas invasivos	Adenomas não-invasivos	P
Landolt, 1987	31	Média	1,15%	0,6%	*
Thapar, 1996	70	Média ±DP	4,66±0,57%	1,37±0,15%	0,0029
Zhao, 1999	123	Média ±DP	2,17±0,24%	0,73±0,14%	<0,001
Yokoyama, 2001	10	Média ±DP	0,36±0,12%	0,41±0,12%	0,65
Wolfsberger, 2004	260	Mediana	1,9%	1,7%	0,03
Pizzarro, 2004	159	Média ±DP	2,01±3,15%	1,12±1,87%	0,02
Fusco, 2008	68	Média ±DP	2,05±2,10%	1,10±0,7%	<0,01
Onoz, 2015	40	Média ±DP	1,03±0,59%	0,93±0,25%	>0,05

N: número de pacientes; DP: desvio-padrão; * não foi mencionado no artigo

1.6.2. O Ki67 e o tamanho dos adenomas hipofisários

Vários trabalhos não obtiveram êxito em relacionar o índice Ki67 com tamanho tumoral.

Mastronardi, Guiducci e Puzzilli (2001) publicaram estudo, no qual não encontraram diferença significativa do índice Ki67 em relação ao tamanho tumoral estimado por imagem ou durante a cirurgia.

Ferreira e colaboradores (2005) publicaram um estudo no qual foi analisado o índice Ki67 em relação ao tamanho do tumor, não sendo encontrada diferença significativa. Os autores concluem que o Ki67 não demonstra ser um bom índice de proliferação celular.

Fusco e colaboradores (2008) realizaram um estudo comparando três grupos de pacientes portadores de adenomas secretores de GH: microadenomas (grupo 1), tumores de até 20mm (grupo 2) e tumores com mais de 20mm de diâmetro (grupo 3). A média do índice do Ki67 não foi significativamente diferente em relação ao tamanho do tumor nem à extensão extrasselar.

Quando foram analisados os adenomas hipofisários gigantes (adenomas com 4,0cm ou mais em um dos diâmetros), Madsen e colaboradores (2011) não encontraram diferença estatisticamente significativa em relação à expressão do Ki67 quando comparados adenomas gigantes a adenomas não-gigantes e não-agressivos.

Somente Ramirez e colaboradores (2012) em seu estudo encontraram diferença estatística do Ki67 em relação ao tamanho do tumor maior que 3cm (OR 2,32, IC 95%, 1,17 – 4,58).

1.6.3. O Ki67 e a classificação clínica dos adenomas hipofisários

A subdivisão dos tumores pituitários em funcionantes e não-funcionantes é fundamental para o entendimento do seu comportamento e seu manejo. Muitos estudos encontraram correlação entre Ki67 e tumores pituitários com secreção hormonal e status funcional conhecidos, mas os achados reportados não são uniformes (Salehi e cols., 2009).

Estudando 61 adenomas (57 macro e 4 microadenomas), Padrão (2007) encontrou média do índice Ki67 de 4,39% (variação de 0 – 36,9%); entre os subtipos hormonais, os adenomas com expressão positiva para GH, mono ou pluri-hormonais, apresentaram índice de proliferação significativamente maior em relação aos demais subtipos ($P=0,001$). Os macroadenomas funcionantes invasivos apresentaram maior índice de proliferação em relação aos macroadenomas não-funcionantes invasivos ($P = 0,0328$).

Entretanto, um número considerável de estudos falhou em demonstrar diferença significativa em relação à expressão de Ki67 e o status funcional dos adenomas hipofisários (Salehi e cols., 2009; Sánchez-Tejada e cols., 2013).

1.6.4. O Ki67 e recorrência tumoral dos adenomas hipofisários

O manejo dos adenomas hipofisários é complicado pela dificuldade em prever seu curso, particularmente a respeito da recorrência (Salehi e cols., 2009).

Ekramullah e colaboradores (1996) estudaram a correlação do índice Ki67 com recrescimento tumoral em AH não funcionantes e encontraram índices mais elevados do marcador naqueles tumores que cresceram em relação aos tumores de pacientes que permaneceram curados por 5 anos ($p < 0,01$).

Mizoue e colaboradores (1997) avaliaram a associação da imunopositividade do Ki67 com um rápido recrescimento dos AH, encontrando diferença significativa entre os grupos com e sem recrescimento rápido. Naquela ocasião, sugeriram um ponto de corte de 1% do Ki67 como bom preditor de recrescimento tumoral.

Filippella e colaboradores (2006) avaliaram o PTTG (pituitary tumor transforming gene) e o Ki67 como marcadores de recorrência, encontrando que, quando a duração do seguimento é superior a um ano, o Ki67 é melhor preditor de recorrência que o PTTG, sendo o ponto de corte de 2,9%.

Gejman, Swearingen e Hedley-Whyte (2008) compararam o índice Ki67 entre dois grupos de pacientes, o primeiro com progressão tumoral e o outro sem, após 5 anos de seguimento da primeira cirurgia de ressecção do adenoma hipofisário. Estes autores constataram que houve diferença significativa entre os dois grupos, a média do índice de Ki67 sendo de $1,45\% \pm 0,09\%$ no grupo com progressão, contra

0,41%±0,01% no grupo sem progressão tumoral ($P=0,01$). Além disso, o Ki67 se correlacionou inversamente com o intervalo livre de progressão (coeficiente de correlação -0,296; $P<0,05$).

Em contrapartida, o estudo realizado por Dubois e colaboradores (2007) não encontraram diferença significativa no índice de Ki67 em relação à recorrência de adenomas gonadotrópicos. Neste trabalho, somente o diâmetro ântero-posterior maior e a menor idade do paciente foram fatores preditores de maior risco de recorrência tumoral.

Em seu trabalho, Fusco e colaboradores (2008) também demonstraram que tumores de pacientes acromegálicos curados após a cirurgia têm uma média do Ki67 significativamente menor ao serem comparados com os pacientes não curados ($P<0,01$). Tumores de pacientes controlados com análogos da somatostatina também apresentam com um índice Ki67 significativamente menor quando comparados com os não-controlados ($P<0,05$). Sendo assim, os autores sugerem que o Ki67 deva ser rotineiramente incluído na avaliação dos adenomas secretores de GH, como importante preditor de desfecho no manejo pós-cirúrgico dos pacientes acromegálicos.

Ramírez e colaboradores (2012) publicaram estudo no qual demonstraram relação com significância estatística entre o Ki67 e risco de recorrência tumoral (OR 1,4; IC 95%, 1,03-1,89).

Righi e colaboradores (2012) também realizaram estudo retrospectivo para

avaliar o papel do índice Ki67 e da expressão da proteína p53 no risco de recorrência e progressão em 166 pacientes com seguimento de pelo menos 6 anos. Estes autores encontraram uma média de Ki67 mais elevada nos adenomas hipofisários com progressão/recorrência ($5,4\pm 9,5\%$) que naqueles adenomas incluídos no grupo de não-recorrentes ($1,3\pm 0,9\%$). A análise de regressão multivariada de Cox estimou um Ki67 com ponto de corte de 3,0% para ser um forte fator preditor de recorrência/progressão tumoral ($P < 0,001$; hazard ratio 18,69). O valor de ponto de corte mais comumente utilizado de 3,0% de índice Ki67 evidenciou alta especificidade (89,5%) mas baixa sensibilidade (53,8%). Os autores concluíram que o índice Ki67 maior que 3,0% e o crescimento invasivo parecem ser os dois achados patológicos mais importantes interferindo no manejo dos pacientes afetados por adenomas hipofisários. A média do índice de p53 foi mais elevada nos AH com recorrência/progressão ($1,3\pm 2,9\%$; entre 0-14) que naqueles sem recorrência/progressão ($0,6\pm 1,5\%$; entre 0-14).

Trouillas e colaboradores (2013) concluíram que os adenomas grau 2b, os quais apresentavam marcadores de proliferação celular elevados além de serem invasivos, apresentaram maior risco de comportamento agressivo e maior risco de metástase em oito anos de acompanhamento, quando comparados aos adenomas classificados como 1a (não-invasivos e não-proliferativos).

Magagna-Poveda e colaboradores (2013) conduziram uma coorte retrospectiva de 25 pacientes, no qual comparam dois grupos de pacientes de acordo com o valor do Ki67 maior ou menor que 3%, encontrando uma diferença significativa entre os grupos em relação ao tempo livre de recorrência tumoral

($P < 0,0001$).

Ainda no mesmo ano, em um estudo com objetivo principal de investigar o papel da galectina como preditor de recorrência tumoral em AH secretores de PRL e ACTH, Righi e colaboradores (2013) encontraram 75% de recorrência/progressão tumoral contra 26,1% de não-recorrência no grupo com Ki67 $>3\%$ ($P=0,015$). A média do Ki67 foi maior nos pacientes com prolactinomas que naqueles com adrenocorticotropinomas, 4,2% e 1,9% respectivamente.

Chiloiro e colaboradores (2014), ao analisarem retrospectivamente 191 casos de AH com história de ressecção radical, identificaram um ponto de corte para o Ki67 de 1,5% (sensibilidade 55,1% e especificidade 66,9%). A sobrevida livre de doença em 1,2 e 5 anos foi 90, 87 e 82% no grupo de pacientes com $Ki67 \leq 1,5\%$ e 78, 66 e 60% respectivamente no grupo de pacientes com $Ki67 > 1,5\%$.

Alimohamadi e colaboradores (2014) estudaram o impacto dos marcadores Ki67 e p53 em uma coorte de pacientes com AH secretores de GH; eles encontraram que o nível de expressão do Ki67 teve uma correlação significativa com a recorrência hormonal e a presença de resíduo tumoral após a cirurgia. Notavelmente, o Ki67 pôde, independentemente, predizer alguns aspectos do desfecho nos seus pacientes.

Tortosa e Webb (2015) publicaram sobre o risco de recorrência de adenomas pituitários atípicos segundo a classificação da WHO, que inclui $Ki67 >3\%$ como um critério. Após uma média de $56,2 \pm 31,4$ meses (entre 3 e 312 meses), 36 de 220

pacientes (16,4%) apresentaram recorrência tumoral, 20 de 192 dos pacientes (10,4%) com adenomas típicos e 16 de 28 (57,1%) com adenomas atípicos.

Também em 2015, um grupo alemão publicou que, em sua análise, o índice Ki67 é o melhor parâmetro isolado para o diagnóstico de adenomas hipofisários atípicos, sugerindo o ponto de corte de 4%, quando encontraram sensibilidade de 95% e especificidade de 97% ($p < 0,001$) (Miermeister e cols., 2015).

Em recente publicação, Costa e colaboradores (2016) relataram um caso de macroadenoma hipofisário não-funcionante de comportamento agressivo, com rápido crescimento e refratariedade ao tratamento (radioterapia e múltiplas cirurgias), embora não apresentasse características de adenoma atípico, visto que sua análise imuno-histoquímica mostrava Ki67 de 1%, p53 negativo e baixo índice mitótico.

Na Tabela 6, estão elencados os estudos citados acima com homogeneidade das principais variáveis encontradas, correlacionando o Ki67 com risco de recorrência/progressão tumoral.

Tabela 6: Correlação do Ki67 com recorrência/recrescimento tumoral

	Número de casos	Classificação clínica ou IH	Ki67 (Média ± DP)	Ponto de corte do Ki67 para recorrência	Tempo de seguimento
Ekramullah e cols., 1996	33	MANF	Sem recrescimento: 0,23±0,03% Com recrescimento: 0,86±0,10% ($P < 0,01$)	NA	Até 5 anos
Mizoue e	48	NE	Sem recrescimento:	1%	Recrescimento

cols., 1997			0,19±0,06% Com recrescimento: 1,27±0,31% (<i>P</i> <0,0001)	(<i>P</i> <0,005)	rápido: em até 2 anos
Filipella e cols., 2006	45	14 PRL, 8 GH, 6 ACTH, 11 FSH/LH, 6 <i>null cell</i>	NA	2,9% (S: 85% e E: 64%)	10 a 72 meses
Gejman e cols., 2008	55	34 MANF, 7 GHoma, 7 ACTHoma, 7 PRLoma	Sem progressão: 0,41±0,01% Com progressão: 1,45±0,09% (<i>P</i> =0,01)	1,3% (S: 40% e E: 90%)	Até 5 anos
Fusco e cols., 2008	68	GHoma	Grupo A: 1,1±0,8% ^a Grupo B: 1,5±1,2% ^b Grupo C: 2,4±1,9% a: <i>P</i> <0,05 vs grupo C b: <i>P</i> <0,01 vs grupo C	NA	12 a 48 meses
Righi e cols., 2012	166	88 MANF, 27 GHoma, 20 ACTHoma, 24 PRLoma, 3 TSHomas, 6 PRL/GHomas 4 outros	Não-recorrentes: 1,3±0,9% Recorrentes: 5,4±9,5%	3% (S: 53,8% e E: 89,5%)	1,6 a 15,3 anos (Média: 9 anos)
Ramírez e cols., 2012	74	MANF	NA	2,0% (OR 5,09; 95% CI 1,23-21; <i>P</i> <0,002)	Média 32,5 meses
Trouillas e cols., 2013	410	111 GHoma, 78 ACTHoma, 116 PRLoma, 105 FSH/LHoma	Não-recorrentes: BH: 0,4% e F: 0,68% Recorrentes: BH: 1,52% e F: 3,6%	NA	1,19 a 23,8 anos (Média: 11,14 anos)
Magagna- Poveda e cols., 2013	25	2 ACTH, 3 PRL, 2 GH/PRL, 6 FSH/LH, 7 pluri-hormonal, 5 <i>null cell</i>	SLD em 15 meses: 100% quando Ki67<3,0% 30% quando Ki67 ≥ 3,0% (<i>P</i> <0,0001)	NA	3,4 a 114,13 meses (Média: 67,7 meses)
Righi e cols., 2013	92	59 PRLoma, 33 ACTHoma	Ki67 > 3,0% Não-recorrentes: 26,1% Recorrentes: 75% (<i>P</i> =0,015)	NA	24 a 230 meses (Média: 50 meses)
Chiloiro e	191	53 MANF, 77 GHoma,	Recorrência em 5 anos:	1,5%	6 meses a 26,5

cols., 2014		21 ACTHoma, 39 PRLoma, 1 TSHoma	Ki67>1,5%: 36,5% Ki67≤1,5%: 18,8% (P=0,004)	(S: 55,1% e E: 66,9%)	anos
Alimohama- di e cols., 2014	47	32 GHoma, 15 PRL/GHoma	Recorrência hormonal: Sim: média Ki67 = 4,3% Não: média Ki67 = 1,6% (P<0,005)	NA	3,0 a 8,5 anos (Média: 5,2 anos)

(IH: imuno-histoquímica; DP: desvio-padrão; MANF: Macroadenoma não-funcionante; NA: não avaliado; NE: não especificado; S: sensibilidade; E: especificidade; Grupo A: curados; Grupo B: não-curados controlados com análogo da somatostatina; Grupo C: não-curados e não-controlados com análogo de somatostatina; GHoma: adenoma secretor de GH; ACTHoma: adenoma secretor de ACTH; PRLoma: adenoma secretor de PRL; TSHoma: adenoma secretor de TSH; PRL/GHoma: adenoma co-secretor de PRL e GH; BH: fixador da amostra de tecido Bouin-Holland; F: fixador da amostra de tecido formalina; SLD: sobrevida livre de doença; OR: Odds Ratio; CI: intervalo de confiança)

1.6.5. Utilização do índice Ki67 na prática clínica

Embora existam evidências suficientes que relacionam o índice Ki67 com um comportamento mais agressivo dos adenomas hipofisários, os protocolos de seguimento de pacientes em pós-operatório de adenomas secretores de GH (Katznelson e cols., 2014), ACTH (Colao e cols., 2014), prolactina (Melmed e cols., 2011) e de adenomas não-funcionantes (Dekkers, Pereira e Romijn, 2008) ainda não contemplam o Ki67 como parâmetro para modificar a conduta frente a um caso com Ki67 mais elevado; entretanto, encontram-se na literatura alguns autores sugerindo a sua inclusão como ponto importante para determinar uma conduta mais agressiva e cuidadosa.

Wolfsberger e colaboradores (2004), que estudaram e encontraram associação do Ki67 com invasão tumoral, sugerem que os marcadores de proliferação celular possam ser usados como parâmetro para o manejo pós-

operatório dos pacientes com adenomas hipofisários com altos índices de proliferação, encurtando os intervalos entre as consultas endocrinológicas e a realização de imagens de controle, com especial relevância para os adenomas não-funcionantes com ressecção incompleta, a fim de detectar o recrescimento antes da ocorrência de efeitos de massa.

Steno e colaboradores (2014) avaliaram a associação do Ki67 com recrescimento de adenomas não-funcionantes, mostrando que este índice fornece informação valiosa e útil para o manejo pós-operatório desses adenomas. Estes autores sugerem que o recrescimento tumoral é esperado nos casos de resíduo tumoral com Ki67 superior a 2,2%, requerendo intervalos mais curtos entre as imagens de ressonâncias de controle no seguimento e/ou terapia adjuvante precoce.

Também em 2014, um grupo espanhol publicou uma revisão sobre os fatores de risco que modificam o comportamento natural dos AH, propondo um sistema de estratificação que permite predizer ou graduar o risco de resistência ao tratamento e/ou de recorrência tumoral em pacientes com acromegalia. Os fatores de risco utilizados na escala proposta pelos autores foram: histologia escassamente granulada, hiperintensidade em T2 na RNM, idade mais jovem no diagnóstico, Ki67 >3%, níveis basais de GH e IGF-1 mais elevados, volume tumoral e aumento progressivo do volume tumoral. O prognóstico pode ser dimensionado em uma escala de 0 a 13, de acordo com a presença ou ausência dos fatores acima mencionados (Fernandez-Rodriguez, Casanueva e Bernabeu, 2015).

Finalmente, em publicação mais recente, Chatzellis e colaboradores (2015)

propõem um algoritmo para tratamento de adenomas hipofisários agressivos, dividindo o seguimento entre adenomas típicos e atípicos (por biomarcadores e grau de invasão), considerando terapia adjuvante (radioterapia e/ou medicação) para pacientes com resíduo tumoral, os quais a receberiam precocemente, ou para os casos com recorrência tumoral naqueles com ressecção completa do tumor.

São as considerações acima que possibilitam elaborar as hipóteses a serem exploradas com o desenvolvimento do presente estudo.

1.7. Referências Bibliográficas

Amar AP, Hinton DR, Krieger MD, Weiss MH. Invasive Pituitary Adenomas: significance of proliferative parameters. *Pituitary*. 1999;2:117-122.

Alimohamadi M, Ownagh V, Mahouzi L, Ostovar A, Abbassioun K, Amirjmschidi A. The impact of immunohistochemical markers of Ki-67 and p53 on the long-term outcome of growth hormone-secreting pituitary adenomas: A cohort study. *Asian J Neurosurg*. 2014;9(3):130-136.

Bodhinayake I, Ottenhausen M, Mooney MA, Kesavabhotla K, Christos P, Schwarz JT, et al. Results and risk factors for recurrence following endoscopic endonasal transsphenoidal surgery for pituitary adenoma. *Clin Neurol Neurosurg*. 2014;119:75-79.

Burger PC, Shibata T, Kleihues P. The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol*. 1986;10(9):611-617.

Chatzellis E, Alexandraki KI, Androulakis II, Kaltsas G. Aggressive Pituitary Tumors. *Neuroendocrinology*. 2015;101(2):87-104.

Chiloiro S, Bianchi A, Doglietto F, de Waure C, Giampietro A, Fusco A, et al. Radically resected pituitary adenomas: Prognostic role of Ki 67 labeling index in a monocentric retrospective series and literature review. *Pituitary*. 2014;17(3):267-276.

Colao A, Boscaro M, Ferone D, Casanueva FF. Managing Cushing's disease: the state of the art. *Endocrine*. 2014;47:9-20.

Costa SC, Scaliante EN, Garcia LR, Volpi M, Crespigio J, Dias MA, et al. Evolução de um tumor agressivo de hipófise: um desafio terapêutico. *Arch Endocrinol Metab*. 2016;60(S2):S20.

Cuny T, Chanson P. Adénomes hypophysaires agressifs et résistants au traitement. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2013;74(S1):S3-S12.

Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA, Beckers A. High prevalence of pituitary adenomas: A cross-sectional study in the province of Liège, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(12):4769-4775.

Davis FG, Kupelian V, Freels S, McCarthy B, Surawicz T. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by behavior and major histology groups. *Neuro Oncol*. 2001;3(3):152-158.

Dekkers OM, Pereira AM, Romijn JA. Treatment and follow-up of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):3717-3726.

Di Ieva A, Rotondo F, Syro L V, Cusimano MD, Kovacs K. Aggressive pituitary adenomas--diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(7):423-435.

Dubois S, Guyétant S, Menei P, Rodien P, Illouz F, Vielle B, et al. Relevance of Ki-67 and prognostic factors for recurrence/progression of gonadotropic adenomas after first surgery. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(2):141-147.

Ekramullah SM, Saitoh Y, Arita N, Ohnishi T, Hayakawa T. The correlation of Ki-67 staining indices with tumour doubling times in regrowing non-functioning pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 1996;138(12):1449-1455.

Fernandez A, Karavitaki N, Wass JAH. Prevalence of pituitary adenomas: A community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(3):377-382.

Fernandez-Rodriguez E, Casanueva FF, Bernabeu I. Update on prognostic factors in acromegaly: Is a risk score possible? *Pituitary*. 2015;18:431-440.

Ferreira JEA, Mello PA, Magalhães AV, Botelho CHA, Naves LA, Nosé V, et al. Caracterização clínica e imunoistoquímica dos adenomas clinicamente não-funcionantes de hipófise. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005;63(4):1070-1078.

Filippella M, Galland F, Kujas M, Young J, Faggiano, A, Lombardi G, et al. Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status of pituitary adenomas: A clinical and immunohistochemical study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;65(4):536-543.

Fusco A, Zatelli MC, Bianchi A, Cimino V, Tilaro L, Veltri F, et al. Prognostic significance of the Ki-67 labeling index in growth hormone-secreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(7):2746-2750.

Gejman R, Swearingen B, Hedley-Whyte ET. Role of Ki-67 proliferation index and p53 expression in predicting progression of pituitary adenomas. *Hum Pathol*. 2008;39(5):758-766.

Heaney AP. Pituitary carcinoma: difficult diagnosis and treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(12):3649-3660.

Katznelson L, Laws ER, Melmed S, Molitch ME, Murad MH, Utz A, et al. Acromegaly: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11):3933-3951.

Knosp E, Steiner E, Kitz K, Matula C. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery*. 1993;33(4):610-617.

Kovacs K, Horvath E, Vidal S. Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol*. 2001;54(2):121-127.

Landolt AM, Shibata T, Kleihues P. Growth rate of human pituitary adenomas. *J Neurosurg.* 1987;67(6):803-806.

Lloyd RV, Kovacs K, Young WF, Farrell WE, Asa SL, Trouillas J, et al. Pituitary tumours: introduction. In chapter 1: Tumours of the pituitary. World Health Organization Classification of Tumours – Pathology and genetics of tumours of endocrine organs, IARC Press, Lyon. (2004);10-13.

Losa M, Mortini P, Barzaghi R, Ribotto P, Terreni MR, Marzoli SB, et al. Early results of surgery in patients with nonfunctioning pituitary adenoma and analysis of the risk of tumor recurrence. *J Neurosurg.* 2008;108(3):525-532.

Madsen H, Borges TM, Knox AJ, Michaelis KA, Xu M, Lillehei KO, et al. Giant pituitary adenomas: pathologic-radiographic correlations and lack of role for p53 and MIB-1 labeling. *Am J Surg Pathol.* 2011;35(8):1204-1213.

Magagna-Poveda A, Leske H, Schmid C, Bernays R, Rushing EJ. Expression of somatostatin receptors, angiogenesis and proliferation markers in pituitary adenomas: An immunohistochemical study with diagnostic and therapeutic implications. *Swiss Med Wkly.* 2013;143:w13895.

Marques P, Mafra M, Calado C, Martins A, Monteiro J, Leite V. Aggressive pituitary lesion with a remarkably high Ki-67. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(6):656-660.

Mastronardi L, Guiducci A, Puzzilli F. Lack of correlation between Ki-67 labelling index and tumor size of anterior pituitary adenomas. *BMC Cancer.* 2001;1:12.

Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, et al. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(2):273-288.

Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7:257-266.

Melmed S. Pituitary Tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015;44(1):1-9.

Mete O, Ezzat S, Asa SL. Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol.* 2012;49(2):R69-R78.

Miermeister CP, Petersenn S, Buchfelder M, Fahlbusch R, Lüdecke DK, Hölsken A, et al. Histological criteria for atypical pituitary adenomas - data from the German pituitary adenoma registry suggests modifications. *Acta Neuropathol Commun.* 2015;3:50.

Mizoue T, Kawamoto H, Arita K, Kurisu K, Tominaga A, Uozumi T. MIB1 immunopositivity is associated with rapid regrowth of pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien).* 1997;139(5):426-432.

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*. 2015;123:199-204.

Padrão IL. Adenomas hipofisários: estudo clínico, morfológico e morfométrico; busca de fatores de prognóstico utilizando o método imunoistoquímico. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2007.

Pan LX, Chen ZP, Liu YS, Zhao JH. Magnetic resonance imaging and biological markers in pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space. *J Neurooncol*. 2005;74(1):71-76.

Pizarro CB, Oliveira MC, Coutinho LB, Ferreira NP. Measurement of Ki-67 antigen in 159 pituitary adenomas using the MIB-1 monoclonal antibody. *Brazilian J Med Biol Res*. 2004;37(2):235-243.

Ramírez C, Cheng S, Vargas G, Asa SL, Ezzat S, González B, et al. Expression of Ki-67, PTTG1, FGFR4, and SSTR 2, 3, and 5 in nonfunctioning pituitary adenomas: a high throughput TMA, immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(5):1745-1751.

Righi A, Agati P, Sisto A, Frank G, Faustini-Fustini M, Agati R, et al. A classification tree approach for pituitary adenomas. *Hum Pathol*. 2012;43(10):1627-1637.

Righi A, Morandi L, Leonardi E, Farnedi A, Marucci G, Sisto A, et al. Galectin-3 expression in pituitary adenomas as a marker of aggressive behavior. *Hum Pathol*. 2013;44(11):2400-2409.

Roelfsema F, Biermasz NR, Pereira AM. Clinical factors involved in the recurrence of pituitary adenomas after surgical remission: a structured review and meta-analysis. *Pituitary*. 2012;15(1):71-83.

Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd R V, Cusimano M. Ki-67 in pituitary neoplasms: A review - Part I. *Neurosurgery*. 2009;65(3):429-437.

Sánchez-Tejada L, Sánchez-Ortiga R, Moreno-Pérez O, Montañana CF, Niveiro M, Tritos NA, et al. Pituitary tumor transforming gene and insulin-like growth factor 1 receptor expression and immunohistochemical measurement of Ki-67 as potential prognostic markers of pituitary tumors aggressiveness. *Endocrinol Nutr*. 2013;60(7):358-367.

Sapochnik M, Nieto LE, Fuertes M, Arzt E. Molecular mechanisms underlying pituitary pathogenesis. *Biochem Genet*. 2016;54:107-119.

Sav A, Rotondo F, Syro L V., Di Ieva A, Cusimano MD, Kovacs K. Invasive, atypical and aggressive pituitary adenomas and carcinomas. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2015;44:99-104.

Scheithauer BW, Gaffey TA, Lloyd RV, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, et al.

Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas. *Neurosurgery*. 2006;59(2):341-353.

Šteňo A, Bocko J, Rychlý B, Chorváth M, Celec P, Fabian M, et al. Nonfunctioning pituitary adenomas: association of Ki-67 and HMGA-1 labeling indices with residual tumor growth. *Acta Neurochir (Wien)*. 2014;156:451-461.

Suzuki M, Minematsu T, Oyama K, Tahara S, Miyai S, Sanno N, et al. Expression of proliferation markers in human pituitary incidentalomas. *Endocr Pathol*. 2006;17(3):263-276.

Thapar K, Kovacs K, Scheithauer BW, Stefanescu L, Horvath E, Pernicone P, et al. Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody. *Neurosurgery*. 1996;38(1):99-107.

Tortosa F, Webb SM. Atypical pituitary adenomas: 10 years of experience in a reference centre in Portugal. *Neurología*. 2016;31(2):97-105.

Trouillas J, Roy P, Sturm N, Dantony E, Cortet-Rudelli C, Viennet G, et al. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol*. 2013;126:123-135.

Trouillas J. In search of a prognostic classification of endocrine pituitary tumors. *Endocr Pathol*. 2014;25:124-132.

Wolfsberger S, Wunderer J, Zachenhofer I, Czech T, Böcher-Schwarz HG, Hainfellner J, et al. Expression of cell proliferation markers in pituitary adenomas - correlation and clinical relevance of MIB-1 and anti-topoisomerase-II α . *Acta Neurochir (Wien)*. 2004;146:831-839.

Yamada S, Ohyama K, Tagushi 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(3):580-585.

Yokoyama S, Hirano H, Moroki K, Goto M, Imamura S, Kuratsu JI. Are nonfunctioning pituitary adenomas extending into the cavernous sinus aggressive and/or invasive? *Neurosurgery*. 2001;49(4):857-863.

Zhao D, Tomono Y, Nose T. Expression of P27^{kip1} and ki-67 in pituitary adenomas: An investigation of marker of adenoma invasiveness. *Acta Neurochir (Wien)*. 1999;141:187-192.

2. Objetivos

Principal: Avaliar a capacidade do Ki67 em prever o comportamento tumoral evolutivo em pacientes submetidos à ressecção de adenomas hipofisários.

Secundários: Investigar possíveis diferenças entre os grupos separados de acordo com o valor de Ki67 menor ou maior u igual que 3, quanto a:

- 1- Gênero dos pacientes
- 2- Idade na intervenção cirúrgica
- 3- Tamanho do tumor
- 4- Presença de invasão de seio cavernoso
- 5- Classificação funcional do tumor
- 6- Recidiva tumoral
- 7- Intervenções terapêuticas subsequentes
- 8- Cura anatômica e funcional na última avaliação
- 9- Cura anatômica e funcional por classificação funcional do adenoma

3. Artigo científico redigido em inglês

Evaluation of the potential Ki67 to predict the tumor evolution in patients with pituitary adenomas

Carolina Petry^{a, c}, Jefferson Henrique Zwir Poli^b, Isabella de Azevedo Dossin^b, Carolina Garcia Soares Leães Rech^{a, c}, Júlia Fernanda Semmelmann Pereira Lima ^{a, c}, Nelson Pires Ferreira ^c, Miriam da Costa Oliveira ^{a, c}

^a Graduate Program in Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245 – CEP 90050-170, Porto Alegre,RS, Brazil

^b School of Medicine, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245 – CEP 90050-170, Porto Alegre,RS, Brazil

^c Neuroendocrinology Center of Santa Casa of Porto Alegre/UFCSPA, Rua Professor Annes Dias, 295 – CEP 90020-090, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Carolina Petry

Rua Engenheiro Adolfo Stern, 20/1003

CEP 90440-100, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: + 55 51 9668.4485 / 3208.0760

E-mail: carolina_petry@hotmail.com and carolinapetrymd@gmail.com

ABSTRACT

Many efforts have been done to know if something could predict worse behavior in pituitary adenomas (PA). This study was accomplished to evaluate the potential of Ki67 in predicting the postoperative evolution of PA in relation to the tumoral residue and recurrence according the cutoff 3%. This retrospective study included 52 cases of patients in postoperative period of PA resection who have had assessed Ki67 in its immunohistochemical study (IHS) and that have done a pituitary image at least one year after the surgery. The maximum follow-up was 273 months. The Ki67 index ranged between 0 and 30%; in 23 cases, was greater than or equal to 3%. When the two groups according the Ki67 were compared, tumoral residue in the first (73 vs. 52%, $p=0,15$) and in the last postoperative image (56 vs. 48%, $p=0,58$), requirement of a new intervention (43 vs. 34%, $p=0,57$) and cavernous sinus invasion in the last image (43 vs. 24%, , $p=0,23$), have gone always greater in the group of $Ki67 \geq 3\%$. Only four patients have shown tumor recurrence, all with $Ki67 < 3\%$. One patient with GH secreting PA evolved for diagnosis of pituitary carcinoma. When comparing two groups according to the Ki67 cutoff of 3%, it's observed that the higher occurrence of residual tumor and cavernous sinus invasion is not accompanied by statistical significance. These findings don't permit to suggest, at this moment, that more aggressive therapeutic management, a priori, should be taken in pituitary adenomas associated with $Ki67 \geq 3\%$.

Keywords: Pituitary adenoma; Ki67; proliferation marker; invasiveness; recurrence

INTRODUCTION

Pituitary adenomas (PA) are benign tumors that reach 15% of intracranial neoplasms [1] and have a prevalence of 25 to 97.5 cases/100.000 [2-4]. Although PA are considered histologically benign, 30-45% are invasive and a significant number are considered as aggressive based on recurrence during follow-up [5]. Several biological markers have been investigated to predict the behavior of the tumors; one of them is Ki67, which is a nuclear protein that assesses cellular proliferation.

Ki67 is associated with the pituitary tumor behavior since 1987, when one study has shown that invasive tumor had more elevated Ki67 than others [6]. After that, others investigators have been studied and had successful to correlate Ki67 with invasiveness [7-11], functional classification [12] and recurrence of the tumor [13-22]. Nowadays, Ki67 is used as a biological marker to classify the PA in typical or atypical or to define the aggressiveness of the tumor. The Ki67 cutoff more acceptable is 3% [18,20]. However, the endocrine societies' guidelines don't use this marker to modify the patient treatment in the follow-up.

This study was accomplished to evaluate the potential of Ki67 in predicting the postoperative behavior of PA in relation to the tumoral residue and recurrence.

SUBJECTS AND METHODS

The medical records of 134 patients of a neuroendocrinology center were assessed retrospectively to review clinical and demographic informations (age at diagnosis, age at surgery and gender), functional classification of tumors, pituitary images, histological and immunohistochemical results, data surgery and treatment modalities (such as radiotherapy and drugs). Only patients who have had assessed Ki67 in its immunohistochemical study and that have a pituitary image at least one

year after the surgery that leads the Ki67 have been included. The maximum follow-up was 273 months.

The study was approved by the Hospital Ethics Committee where the neurosurgery was performed.

Tumor classification

Patients were classified according to functional status as nonfunctioning adenomas (NFPA), GH secreting and ACTH secreting adenomas and, according to size, as microadenomas (<10mm) or macroadenomas (\geq 10mm). Invasiveness was defined by the presence of tumoral invasion of cavernous sinus.

Histology

Ki67 have been measured in tumor samples that were fixed with formalin and reduced to paraffin block. For detection of the Ki67 antigen, MIB-1 antibody was used (Dakocytomation, Glostrup, Denmark). Proliferative activity was measured in areas of high density of labeled cells.

Statistical analysis

Data were tested for statistical significance using SPSS 22.0 software. The Chi-square test followed by Fisher's exact test was used to identify correlations between categorical parameters. Data are shown as mean \pm standard deviation (normal distribution) or median (non-normal distribution). p values <0,05 were considered statistically significant.

RESULTS

The samples of 52 patients were included in postoperative period of PA resection, including 28 women. Some of these patients had undergone previous pituitary surgery without checking the Ki67 index. The ages ranged between 20 and

75 years (43.5 ± 14.1) at the time of surgery that gave rise to the material from which the Ki67 was first assessed. PA were NFPA in 29 cases, GH secreting in 18 and ACTH secreting in five cases. Concerning tumor size, seven were microadenomas. The Ki67 index, in 52 cases, ranged between 0 and 30%; in 23 cases, was greater than or equal to 3%, including five cases with $Ki67 > 10\%$. The sample was divided into two groups according to the result of Ki67 (smaller, or greater than or equal to 3%). The characteristics of each group in the preoperative period are described in Table 1.

In the group of patients with $Ki67 < 3\%$ (29), 14 (48%) haven't shown tumoral residue in the first postoperative image, and four of them have evolved with recurrence. About these patients with recurrence, two have undergone to new surgical intervention and one patient to radiotherapy, and only one didn't have residue in the current assessment. Of the 15 (52%) patients that had shown postoperative residue, six were submitted to new surgical intervention, in five cases associated to radiotherapy, and two have made only radiotherapy. These eight with some reintervention, three didn't have residual tumor in the last assessment.

In the group of patients with $Ki67 \geq 3\%$ (23), six (26%) were without residue in the first image after surgery and none of them had tumor recurrence in 18 months. Of the 17 (74%) who had shown residue in the first image, 10 were submitted to new interventions: surgery in six cases associated with radiotherapy in four cases, and only to radiotherapy in four cases. Among the patients undergoing these interventions, three had image without tumor lesion at the last evaluation.

When compared $Ki67 < 3\%$ group with $Ki67 \geq 3\%$ group, it's possible observe that there is a difference in the residual tumor frequency in the first postoperative image, in the number of additional interventions and in the presence of tumoral

residue and cavernous sinus invasion in the last image, always higher in the group with higher Ki67. These differences did not reach, however, statistical significance. Table 2 shows the results of postoperative follow-up according to Ki67 index smaller, or greater or equal 3%.

It's important to mention that the median of follow-up time from the surgery until recurrence in the group with Ki67 <3% was higher, statistically significant when compared to the follow-up time from the surgery until the last evaluation in the group with Ki67 ≥3% (85 vs. 16.5 months, $p < 0.001$).

Considering only the patients with NFPA (divided according to the greater or smaller value of Ki67, in a context of follow-up time similar between the groups, there was no statistically significant difference with respect to tumoral residue and tumor invasion in the last image. Table 3 shows these results.

With respect to patients with GH-secreting PA, 70% with Ki67 <3% and 75% with Ki67 ≥3% were receiving drug treatment in the last evaluation. The patients that are in follow-up for Cushing's disease (ACTH-secreting PA), a sample of five patients, between them three with Ki67 ≥3%, all were in remission at the last evaluation.

During the follow-up, one patient with GH-secreting PA evolved for diagnosis of pituitary carcinoma from a lesion in the frontal lobe of the central nervous system; this fact occurred 28 years after the first pituitary surgery and five years after the intervention in which the Ki67 was assessed for the first time, when it revealed to be 30%.

DISCUSSION

The Ki67 index is an easy, reproducible and reliable method and is used to assess cell proliferation; however, its correlation with tumor growth and invasion is

conflicting, and so by itself, it isn't able to predict tumor behavior [5].

Thapar et al. two decades ago, as Righi et al. in the last decade, had published that a cutoff of 3% for Ki67 is associated with a specificity of 97.3% and 89.5% respectively for distinguish PA noninvasive from invasive [7,18]. The vast majority of tumor adenomas has Ki67 values between 1 and 2%, whereas values >3% are uncommon [23]. In this sample of patients, were reported Ki67 values between 0 and 30%; these values are approaching to those described by Chatzellis, which were between 1 and 23%, and by Padrão, between 0 and 36.9% [12,23](1,2). The current patient sample contains a proportionately larger number of tumors with $Ki67 \geq 3\%$ (44%) than previous studies [7,12,16].

About the relationship between the expression of Ki67 and functional classification of PA, several studies have failed to show a significant difference [12,24,25]; the present study is in accordance with that data.

Some authors found statistically significant difference about the Ki67 values when the groups of invasive and noninvasive adenomas were compared [7-11] while others didn't get the same results [26,27]. In the sample of the present study, the frequency of invasive tumors was higher in the group with $Ki67 \geq 3\%$ than in the group with $Ki67 < 3\%$ in both the preoperative image (48% vs. 31%) and the last image (43% vs. 24%), but these values didn't achieve statistical significance, probably due to the small number of patients included.

With regard to tumor recurrence, it's important know that patients with $Ki67 < 3\%$ that had shown relapsed, had longer follow-up time requiring further intervention (surgery and/or radiotherapy) at least seven years after the first surgery. The subgroup of patients with $Ki67 \geq 3\%$, which have remained without evidence of tumoral lesion in the last image had a maximum follow-up time of 3.5 years. Given

this data, it is not possible to say that the group with lower Ki67 has presented more recurrence than the other.

Some studies have shown that tumors with regrowth have higher Ki67 expression than those without regrowth [14,16]. Magagna-Poveda et al. found 100% disease-free survival in the group with Ki67 <3%, while only 30% on the group with Ki67≥3% in the period of 15 months [21].

If the requirement for surgical interventions and radiotherapy denotes a more aggressive behavior of pituitary adenomas, this study will have failed to correlate these data with Ki67 and will not have demonstrated a statistically significant higher rate of reintervention in the group with Ki67≥3%.

When only patients with NFPA were evaluated, there was no statistically significant difference with respect to residual tumor in the last image and tumor invasion in the last image in a follow-up period with a median about three years comparing the groups with Ki67 <3 % and Ki67≥3%. About this, Ekramullah et al. studied 33 patients with NFPA, for a follow-up period of up five years, finding correlation of Ki67 value with tumor regrowth ($p < 0.01$) [13]. Another study, conducted by Ramirez et al., that included the Ki67 in a multivariate equation as a continuous variable, has shown that a Ki67 index greater than 2% was significantly associated with tumor recurrence (OR, 5.09; 95% CI, 1.23-21; $p < 0.02$) [17].

In the current sample, considering only those with GH secreting adenomas, the frequency of patients requiring adjuvant drug treatment is similar between the groups with Ki67<3 and Ki67≥3%; this result is different from that found by Alimohamadi et al., which Ki67 value was positively correlated with hormonal recurrence after surgery in patients with acromegaly [22].

Thapar et al. suggest that a Ki67 expression greater than 10% should always

be an alert to the potential of malignancy of the tumor, and this idea was corroborated by Trouillas [5,7]. In the present study, a patient with GH secreting adenoma evolved to pituitary carcinoma 5 years following resection of pituitary adenoma, which tissue showed Ki67 of 30%. It's remarkable that this patient had at least 23 years of evolution with pituitary disease before surgery that given rise the sample in which Ki67 expression was assessed by the first time. However, other four patients with Ki67 > 10%, two with Cushing's disease and two with nonfunctioning adenomas, showed no evidence of malignancy in the last assessment, in a follow-up time between 12 and 49 months.

In conclusion, when a group of 23 cases of tumoral tissue having Ki67 index equal or greater than 3% was compared with a group of patients with pituitary adenoma with lower Ki67 index, it was observed that the most occurrences of cavernous sinus invasion in the first and in last image and the occurrence of more cases of residual tumor in the last evaluation is not accompanied by statistical significance; considering the Ki67 value in the cases of absence of hormone secretion (NFPA), no difference was observed about presence of residual tumor in the last assessment, as like no difference in the requirement for drug complementary intervention in GH hypersecretion or remission of the disease in ACTH hypersecretion; only 20% (one case) of patients with Ki67 > 10% evolved with the diagnosis of pituitary carcinoma. These findings don't permit to suggest, at this moment, that more aggressive therapeutic management, a priori, should be taken in pituitary adenomas associated with Ki67 ≥ 3%.

References

- [1] Scheithauer BW, Gaffey TA, Lloyd R V., Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, Yapicier O, Young WF Jr, Meyer FB, Kuroki T, Riehle DL, Laws ER Jr (2006) Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas. *Neurosurgery* 59(2): 341–353
- [2] Davis FG, Kupelian V, Freels S, McCarthy B, Surawicz T (2001) Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by behavior and major histology groups. *Neuro Oncol* 3(3):152–158
- [3] Fernandez A, Karavitaki N, Wass JAH (2010) Prevalence of pituitary adenomas: A community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clin Endocrinol (Oxf)* 72(3):377–382
- [4] Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA, Beckers A (2006) High prevalence of pituitary adenomas: A cross-sectional study in the province of Liège, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab* 91(12):4769–4775
- [5] Trouillas J (2014) In search of a prognostic classification of endocrine pituitary tumors. *Endocr Pathol* 25(2):124–132
- [6] Landolt AM, Shibata T, Kleihues P (1987) Growth rate of human pituitary adenomas. *J Neurosurg* 67(6):803–806
- [7] Thapar K, Kovacs K, Scheithauer BW, Stefanescu L, Horvath E, Pernicone PJ, Murray D, Laws ER Jr (1996) Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody. *Neurosurgery* 38(1):99–107
- [8] Zhao D, Tomono Y, Nose T (1999) Expression of P27^{kip 1} and Ki-67 in pituitary adenomas: an investigation of marker of adenoma invasiveness. *Acta Neurochir (Wien)* 141(2):187–192
- [9] Wolfsberger S, Wunderer J, Zachenhofer I, Czech T, Böcher-Schwarz H-G,

- Hainfellner J, Knosp E (2004) Expression of cell proliferation markers in pituitary adenomas - correlation and clinical relevance of MIB-1 and anti-topoisomerase-II α . *Acta Neurochir (Wien)* 146(8):831–839
- [10] Pizarro CB, Oliveira MC, Coutinho LB, Ferreira NP (2004) Measurement of Ki-67 antigen in 159 pituitary adenomas using the MIB-1 monoclonal antibody. *Brazilian J Med Biol Res* 37(2):235–243
- [11] Fusco A, Zatelli MC, Bianchi A, Cimino V, Tilaro L, Veltri F, Angelini F, Lauriola L, Vellone V, Doglietto F, Ambrosio MR, Maira G, Giustina A, degli Uberti EC, Pontecorvi A, De Marinis L (2008) Prognostic significance of the Ki-67 labeling index in growth hormone-secreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 93(7):2746–2750
- [12] Padrão IL (2007) Adenomas hipofisários: estudo clínico, morfológico e morfométrico; busca de fatores de prognóstico utilizando o método imunistoquímico. Universidade Estadual de Campinas
- [13] Ekramullah SM, Saitoh Y, Arita N, Ohnishi T, Hayakawa T (1996) The correlation of Ki-67 staining indices with tumour doubling times in regrowing non-functioning pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien)* 138(12):1449–1455
- [14] Mizoue T, Kawamoto H, Arita K, Kurisu K, Tominaga A, Uozumi T (1997) MIB1 immunopositivity is associated with rapid regrowth of pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien)* 139(5):426–432
- [15] Filippella M, Galland F, Kujas M, Young J, Faggiano A, Lombardi G, Colao A, Meduri G, Chanson P (2006) Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status of pituitary adenomas: a clinical and immunohistochemical study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65(4):536–543
- [16] Gejman R, Swearingen B, Hedley-Whyte ET (2008) Role of Ki-67 proliferation

index and p53 expression in predicting progression of pituitary adenomas. *Hum Pathol* 39(5):758–766

[17] Ramírez C, Cheng S, Vargas G, Asa SL, Ezzat S, González B, Cabrera L, Guinto G, Mercado M (2012) Expression of Ki-67, PTTG1, FGFR4, and SSTR 2, 3, and 5 in nonfunctioning pituitary adenomas: a high throughput TMA, immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab* 97(5):1745–1751

[18] Righi A, Agati P, Sisto A, Frank G, Faustini-Fustini M, Agati R, Mazzatenta D, Farnedi A, Menetti F, Marucci G, Foschini MP (2011) A classification tree approach for pituitary adenomas. *Hum Pathol* 43(10):1627–1637

[19] Righi A, Morandi L, Leonardi E, Farnedi A, Marucci G, Sisto A, Frank G, Faustini-Fustini M, Zoli M, Mazzatenta D, Agati R, Foschini M (2013) Galectin-3 expression in pituitary adenomas as a marker of aggressive behavior. *Hum Pathol* 44(11):2400–2409

[20] Trouillas J, Roy P, Sturm N, Dantony E, Cortet-Rudelli C, Viennet G, Bonneville JF, Assaker R, Auger C, Brue T, Cornelius A, Dufour H, Jouanneau E, François P, Galland F, Mougél F, Chapuis F, Villeneuve L, Maurage CA, Figarella-Branger D, Raverot G (2013) A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol* 126(1):123–135

[21] Magagna-Poveda A, Leske H, Schmid C, Bernays R, Rushing EJ (2013) Expression of somatostatin receptors, angiogenesis and proliferation markers in pituitary adenomas: an immunohistochemical study with diagnostic and therapeutic implications. *Swiss Med Wkly* 143:w13895

[22] Alimohamadi M, Ownagh V, Mahouzi L, Ostovar A, Abbassioun K, Amirjmschidi A (2014) The impact of immunohistochemical markers of Ki-67 and p53 on the long-

term outcome of growth hormone-secreting pituitary adenomas: A cohort study.

Asian J Neurosurg 9(3):130-136

[23] Chatzellis E, Alexandraki KI, Androulakis II, Kaltsas G (2015) Aggressive Pituitary Tumors. Neuroendocrinology 101(2):87–104

[24] Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd R V, Cusimano M (2009) Ki-67 in pituitary neoplasms: A review - Part I. Neurosurgery 65(3):429-437

[25] Sánchez-Tejada L, Sánchez-Ortiga R, Moreno-Pérez O, Montañana CF, Niveiro M, Tritos N a, Alfonso AMP (2013) Pituitary tumor transforming gene and insulin-like growth factor 1 receptor expression and immunohistochemical measurement of Ki-67 as potential prognostic markers of pituitary tumors aggressiveness. Endocrinol Nutr 60(7):358–367

[26] Yokoyama S, Hirano H, Moroki K, Goto M, Imamura S, Kuratsu JI (2001) Are nonfunctioning pituitary adenomas extending into the cavernous sinus aggressive and/or invasive? Neurosurgery 49(4):857–863

[27] Onoz M, Basaran R, Gucluer B, Isik N, Kaner T, Sav A, Elmaci I (2015) Correlation between SPARC (Osteonectin) expression with immunophenotypical and invasion characteristics of pituitary adenomas. APMIS 123(3):199–204

Table 1. Characteristics of each group in the preoperative period

	Ki67<3 (29)	Ki67≥3 (23)	p value
Gender (F:M)	16:13	12:11	>0.99
Age (median)	43 years	46 years	0.99
Follow-up time since surgery which provided the Ki67 sample (median)	34 months (12-252 months)	23 months (12-273 months)	0.04*
Functional classification	NFPA 17 GH secreting 10 ACTH secreting 2	NFPA 12 GH secreting 8 ACTH secreting 3	0.53
Macroadenomas	25 (87%)	20 (87%)	>0.99
Cavernous sinus invasion	09 (31%)	11 (48%)	0.26

*significant difference

Table 2. Follow-up results in the postoperative period

	Ki67<3% (29)	Ki67≥3% (23)	p value
Tumoral residue in the first postoperative image	15 (52%)	17 (73%)	0.15
Surgical intervention and/or radiotherapy after the surgery that gave rise to Ki67	10 (34%)	10 (43%)	0.57
Tumoral residue in the last image	14 (48%)	13 (56%)	0.58
Intrassellar residue in the last image	3 (10%)	01 (4%)	0.62
Cavernous sinus invasion in the last image	7 (24%)	10 (43%)	0.23
Tumoral recurrence	4 (28%)	0	0.26

Table 3. Postoperative results in nonfunctioning adenomas

	Ki67<3% (17)	Ki67≥3% (12)	p value
NFPA with tumoral residue in the last image	9 (52%)	8 (67%)	0.70
NFPA with cavernous sinus invasion in the last image	5 (29%)	7 (58%)	0.14
Follow-up time (median)	34 months	32,5 months	0.25
Ki67 (median)	1,95%	4,05%	<0.001*

*significant difference

4. Considerações finais

Quando um grupo de 23 casos de material tumoral apresentando índice Ki67 igual ou maior a 3% foi comparado a um grupo de pacientes com adenoma hipofisário associado a menor índice Ki67, observou-se que o maior número de ocorrências de invasão do seio cavernoso na primeira e na última imagem e mais casos de resíduo tumoral na última avaliação não se acompanharam de significância estatística; considerando o valor de ki67 nos casos de ausência de secreção hormonal (MANF), não se observou diferença na presença de resíduo tumoral na última avaliação, assim como não se observou diferença na necessidade de intervenção complementar medicamentosa na hipersecreção de GH ou remissão da doença na hipersecreção de ACTH; em apenas 20% (um caso) dos pacientes com $Ki67 > 10\%$ houve evolução para o diagnóstico de carcinoma.

Estes achados não permitem sugerir, neste momento, medidas terapêuticas mais agressivas, a priori, nos adenomas hipofisários associados a $Ki67 \geq 3\%$. Estudos com tempo de seguimento mais longo e maior número de casos são necessários para esclarecer o verdadeiro papel do Ki67 na determinação do manejo pós-operatório de pacientes com adenomas hipofisários.

5. Anexos

5.1. Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre conforme parecer substanciado nº 1.590.879 e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre conforme parecer nº 1.642.670 e está de acordo com as normas brasileiras estabelecidas para pesquisas com seres humanos. Foram respeitados os requisitos quanto à confidencialidade das informações, de acordo com determinações da Resolução 466/12, mantendo-se o compromisso ético e legal do anonimato e sigilo dos dados dos prontuários.

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREDITIVO DO KI67 EM RELAÇÃO AO COMPORTAMENTO PÓS-OPERATÓRIO DE ADENOMAS HIPOFISÁRIOS

Pesquisador: Miriam da Costa Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56388116.3.0000.5335

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.590.879

Apresentação do Projeto:

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREDITIVO DO KI67 EM RELAÇÃO AO COMPORTAMENTO PÓS-OPERATÓRIO DE ADENOMAS HIPOFISÁRIOS

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo tem como objetivo avaliar a capacidade do índice

ki67 em prever recrescimento/recorrência de adenomas de hipófise após um ano da primeira cirurgia, e, com base nos resultados, buscar definir um protocolo de seguimento mais criterioso para pacientes com maior risco. Pacientes e métodos: serão incluídos aproximadamente 60 pacientes por amostra de conveniência, cujos dados serão obtidos através da pesquisa de prontuários e resultados de exames pré e pós-cirúrgico realizados. Tendo como objetivo primário: Avaliar a capacidade do Ki67 em prever recorrência ou recrescimento tumoral em pacientes em pós-operatório de ressecção de adenomas hipofisários. E como objetivo secundário: Avaliar o papel dos demais fatores prognósticos, tais como classificação hormonal dos tumores (não funcionantes, Adenomas hipofisários (AH) são os tumores intracranianos mais frequentes, afetando 1/1.000 na população. Os AH são considerados histologicamente benignos, mas 30-45% deles invadem os seios cavernosos ou esfenoidais, e apresentam alta recorrência durante o seguimento,

Endereço: R. Profº Annes Dias, 295 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: 1.590.879

caracterizando-se como agressivos. Com objetivo de prever o comportamento de tumores hipofisários, diversos marcadores biológicos têm sido investigados, incluindo alterações cromossômicas e microRNAs, marcadores de proliferação, oncogenes, genes de supressão tumoral, fatores de crescimento e seus receptores, e fatores relacionados a angiogênese e adesão celular. Dentre eles, o Ki67 é um antígeno nuclear utilizado como marcador da divisão celular, sendo usualmente medido para determinar o índice de proliferação celular em neoplasias, especialmente naquelas de origem neuroendócrina. Em tumores pituitários, a expressão do Ki67 foi demonstrada pela primeira vez por Burger e colaboradores em 1986. Desde então, diversos estudos tentam correlacionar o índice de Ki67 com vários parâmetros clínico-patológicos (grau de invasão do tumor, tamanho tumoral, subtipo hormonal e recorrência/recrescimento tumoral) para prever o curso e auxiliar no manejo clínico dos AH. Os valores de índice de Ki67 em AH variam de menos de 1% até 23%. A vasta maioria tem valores de Ki67 entre 1 e 2%, enquanto valores maiores que 3% são incomuns. Atualmente, considera-se o ponto de corte de 3% para definir tumores atípicos, ou seja, de comportamento incerto. O poder de invasão de um adenoma hipofisário continua sendo um fenômeno pouco compreendido, pois as bases biológicas permanecem obscuras. Atualmente, muitos estudos mostraram uma associação significativa do Ki-67 com invasão tumoral. „O manejo dos adenomas hipofisários é complicado pela dificuldade em prever seu curso, particularmente a respeito da recorrência. Em 2012, foi publicada uma metanálise sobre recorrência de adenomas pituitários após remissão cirúrgica, na qual Roelfsema e Biermasz encontraram um maior risco de recorrência em prolactinomas em relação aos demais adenomas funcionantes e não-funcionantes, com diferença significativa ($P=0,007$). O pico de recorrência ocorreu entre 1 e 5 anos de seguimento. Righi e colaboradores realizaram estudo retrospectivo para avaliar o papel do índice Ki67 e da expressão da proteína p53 no risco de recorrência e progressão em 166 pacientes com seguimento de pelo menos 6 anos. Estes autores encontraram uma média de Ki67 mais elevada nos adenomas hipofisários com progressão/recorrência ($5,4\pm 9,5\%$) que naqueles adenomas

Endereço: R. Profº Annes Dias, 295 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: 1.590.879

incluídos no grupo de não-recorrentes ($1,3 \pm 0,9\%$). A análise de regressão multivariada de Cox estimou um Ki67 com ponto de corte de 3,0% para ser um forte fator preditor de recorrência/progressão tumoral ($P < 0,001$; hazard ratio 18,69). O valor de limiar comumente utilizado de 3,0% de índice Ki67 evidenciou alta especificidade (89,5%) mas baixa sensibilidade (53,8%). Os autores concluíram que o índice Ki67 maior que 3,0% e o crescimento invasivo parecem ser os dois achados patológicos mais importantes interferindo no manejo dos pacientes afetados por adenomas hipofisários. Filippella et al, avaliou o PTTG (pituitary tumor transforming gene) e o Ki67 como marcadores de recorrência, encontrando que, quando a duração do seguimento é superior a um ano, o Ki67 é melhor preditor de recorrência que o PTTG, sendo o ponto de corte de 2,9%. Gejman e colaboradores compararam o índice Ki-67 entre dois grupos de pacientes, o primeiro dos quais com progressão tumoral e o outro sem após 5 anos de seguimento após a primeira cirurgia de ressecção do adenoma hipofisário. Estes autores constataram que houve diferença significativa entre os dois grupos, a média do índice de Ki67 de $1,45\% \pm 0,09\%$ no grupo com progressão contra $0,41\% \pm 0,01\%$ no grupo sem progressão tumoral com $P = 0,01$. Além disso, o Ki67 se correlacionou inversamente com o intervalo livre de progressão (coeficiente de correlação $-0,296$; $P < 0,05$). Em seu trabalho, Fusco et al. também demonstraram que tumores de pacientes curados após a cirurgia têm uma média do ki67 significativamente menor ao serem comparados com os pacientes não curados ($P < 0,01$). Tumores de pacientes controlados com análogos da somatostatina também apresentam com um índice Ki67 significativamente menor quando comparados com os não-controlados ($P < 0,05$). Sendo assim, os autores sugerem ao final do trabalho que o Ki67 deva ser rotineiramente incluído na avaliação dos adenomas secretores de GH, como importante preditor de desfecho no manejo pós-cirúrgico dos pacientes acromegálicos. Trouillas e colaboradores concluíram que os adenomas grau 2b, os quais apresentavam marcadores de proliferação celular elevados além de serem invasivos, apresentaram maior risco de comportamento agressivo e maior risco de metástase em oito anos de acompanhamento,

Endereço: R. Profº Annes Dias, 295 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: 1.590.879

quando comparados aos adenomas classificados como 1a (não-invasivos e não-proliferativos). Embora existam evidências suficientes a relacionar o índice Ki67 com um comportamento mais agressivo dos adenomas hipofisários, os protocolos de seguimento de pacientes em pós-operatório de adenomas secretores de GH, ACTH e prolactina e de adenomas não-funcionantes ainda não contemplam o Ki67 como parâmetro para modificar a conduta frente a um caso com Ki67 mais elevado; entretanto, encontram-se na literatura alguns autores sugerindo a sua inclusão como ponto importante para determinar uma conduta mais agressiva e cuidadosa. Wolfsberger e colaboradores, que estudaram e encontraram associação do Ki67 com invasão tumoral, sugerem que os marcadores de proliferação celular possam ser usados como parâmetro para o manejo pós-operatório dos pacientes com adenomas hipofisários com altos índices de proliferação, encurtando os intervalos entre as consultas endocrinológicas e a realização de imagens de controle, com especial relevância para os adenomas não-funcionantes com ressecção incompleta, a fim de detectar o recrescimento antes da ocorrência de efeitos de massa. Steno et al. avaliaram a associação do Ki67 com recrescimento de adenomas não-funcionantes, mostrando que este índice fornece informação valiosa e útil para o manejo pós-operatório de adenomas não-funcionantes. Estes autores sugerem que o recrescimento tumoral é esperado nos casos de resíduo tumoral com Ki67 superior a 2,2%, requerendo intervalos mais curtos entre as imagens de ressonâncias de controle no seguimento e/ou terapia adjuvante precoce. Finalmente, em publicação recente, Chatzellis e colaboradores propõem um algoritmo para tratamento de adenomas hipofisários agressivos, dividindo o seguimento entre adenomas típicos e atípicos (por biomarcadores e grau de invasão), considerando terapia adjuvante (radioterapia e/ou medicação) para pacientes com resíduo tumoral, os quais a receberiam precocemente, ou para os casos com recorrência tumoral naqueles com ressecção completa do tumor.

Introdução:

Data de Submissão do Projeto: 23/05/2016 Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_660382.pdf Versão do Projeto: 1

Endereço: R. Profº Annes Dias, 295 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: 1.590.879

Página 3 de 6

Tamanho da Amostra no Brasil: 60

prolactinomas, somatotropinomas e adrenocorticotropinomas), tamanho do tumor (microadenomas, macroadenoma e adenomas gigantes) e grau de invasão tumoral presente no diagnóstico em prever comportamento agressivo em pacientes em pós-operatório de ressecção de adenoma hipofisário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme as realizadoras da pesquisa os benefícios pretendem através da compilação dos dados um melhor entendimento em relação a relevância do Ki67 na prática clínica local, oportunizando a criação de um protocolo de manejo dos adenomas hipofisários no Centro de Neuroendocrinologia da ISCMPA/UFCSPA. E mesmo que não citado pelas pesquisadoras há um risco, nem que seja mínimo, conforme a resolução:466/12.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerando a clareza dos objetivos propostos e benefícios com o projeto de pesquisa, parecer é favorável.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Dispensa TCLE pois se trata de um estudo observacional retrospectivo de revisão de prontuários. Consta conforme a obrigatoriedade o termo de confiabilidade.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conforme o projeto de pesquisa apresentado não há nenhuma pendência ou inadequação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após avaliação 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.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 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 chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de

Endereço: R. Profº Annes Dias,295 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: 1.590.879

Ética.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_660382.pdf	23/05/2016 21:30:22		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_ki67_2016.doc	23/05/2016 21:28:53	Carolina Petry	Aceito
Outros	formulario_da_instituicao.pdf	23/05/2016 21:24:20	Carolina Petry	Aceito
Cronograma	cronograma_final.pdf	23/05/2016 21:18:18	Carolina Petry	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	15/03/2016 16:57:50	Carolina Petry	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_do_responsavel_pelo_sefor_UFCSPA.pdf	29/02/2016 23:10:42	Carolina Petry	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_para_entrega_de_relatorio_UFCSPA.pdf	29/02/2016 23:07:05	Carolina Petry	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_para_utilizacao_de_dados_e_prontuarios.pdf	29/02/2016 22:59:00	Carolina Petry	Aceito
Outros	Declaracao_de_uso_e_publicacao_de_dados.pdf	29/02/2016 22:57:42	Carolina Petry	Aceito
Outros	Declaracao_de_uso_de_dados_e_materiais.pdf	29/02/2016 22:57:01	Carolina Petry	Aceito
Outros	Declaracao_de_isencao_de_onus_a_instituicao.pdf	29/02/2016 22:56:22	Carolina Petry	Aceito
Outros	Declaracao_de_confidencialidade_do_sujeito_no_estudo.pdf	29/02/2016 22:55:44	Carolina Petry	Aceito
Outros	Declaracao_de_autorizacao_da_Chefia.pdf	29/02/2016 22:54:51	Carolina Petry	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	29/02/2016 22:44:36	Carolina Petry	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: R. Profº Annes Dias, 295 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: 1.590.879

PORTO ALEGRE, 15 de Junho de 2016

Assinado por:
ELIZETE KEITEL
(Coordenador)

Endereço: R. Profº Annes Dias,295 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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREDITIVO DO KI67 EM RELAÇÃO AO COMPORTAMENTO PÓS-OPERATÓRIO DE ADENOMAS HIPOFISÁRIOS

Pesquisador: Miriam da Costa Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56388116.3.3001.5345

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.642.670

Apresentação do Projeto:

Projeto de mestrado junto ao PPG de Patologia, com origem no PPG Patologia da UFCSPA, realizado na Santa Casa de Misericórdia.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a capacidade do Ki67 em prever recorrência ou recrescimento tumoral em pacientes em pós-operatório de ressecção de adenomas hipofisários.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Por ser um estudo observacional retrospectivo sem intervenção junto aos indivíduos não há risco médico associado.

Benefícios: os autores pretendem através da compilação dos dados um melhor entendimento em relação a relevância do Ki67 na prática clínica local, oportunizando a criação de um protocolo de manejo dos adenomas hipofisários no Centro de Neuroendocrinologia da ISCMPA/UFCSPA.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa embasada bibliograficamente, com local de estudo adequado e metodologia simples e exequível.

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 1.642.670

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos apresentados, destacando a dispensa de TCLE, por se tratar de estudo retrospectivo em base de dados.

Recomendações:

Aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto adequado do ponto de vista ético e metodológico.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_660382.pdf	23/05/2016 21:30:22		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_ki67_2016.doc	23/05/2016 21:28:53	Carolina Petry	Aceito
Outros	formulario_da_instituicao.pdf	23/05/2016 21:24:20	Carolina Petry	Aceito
Cronograma	cronograma_final.pdf	23/05/2016 21:18:18	Carolina Petry	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_660382.pdf	15/03/2016 16:59:53		Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	15/03/2016 16:57:50	Carolina Petry	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_do_responsavel_pelo_señor_UFCSPA.pdf	29/02/2016 23:10:42	Carolina Petry	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_para_entrega_de_relatorio_UFCSPA.pdf	29/02/2016 23:07:05	Carolina Petry	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_para_utilizacao_de_dados_e_prontuarios.pdf	29/02/2016 22:59:00	Carolina Petry	Aceito
Outros	Declaracao_de_uso_e_publicacao_de_dados.pdf	29/02/2016 22:57:42	Carolina Petry	Aceito
Outros	Declaracao_de_uso_de_dados_e_materiais.pdf	29/02/2016 22:57:01	Carolina Petry	Aceito
Outros	Declaracao_de_isencao_de_onus_a_instituicao.pdf	29/02/2016 22:56:22	Carolina Petry	Aceito
Outros	Declaracao_de_confidencialidade_do_sujeito_no_estudo.pdf	29/02/2016 22:55:44	Carolina Petry	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 1.642.670

Outros	Declaracao_de_autorizacao_da_Chefia.pdf	29/02/2016 22:54:51	Carolina Petry	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	29/02/2016 22:44:36	Carolina Petry	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 20 de Julho de 2016

Assinado por:
Airton Tetelbom Stein
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br