

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

Lisiane Cervieri Mezzomo

**Expressão de marcadores de
células tronco tumorais em
adenomas hipofisários.**

**Porto Alegre
2016**

Lisiane Cervieri Mezzomo

Expressão de marcadores de células tronco tumorais em adenomas hipofisários.

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

Orientador: Prof. Dra Maria Beatriz da Fonte Kohek
Co-orientador: Prof. Dra. Miriam da Costa Oliveira

**Porto Alegre
2016**

**A persistência é o menor caminho do
êxito. (Charles Chaplin)**

Dedico esse trabalho a minha família, meus pais Euclides e Helena, ao meu esposo Rodrigo e ao meu filho Luiz Fernando. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Agradecimentos

A realização desta pesquisa contou com a ajuda e dedicação de diversas pessoas que contribuíram para os resultados aqui apresentados. Gostaria de agradecer algumas dessas pessoas citadas logo abaixo.

Agradecimento afetuoso a minha família, meus pais Euclides e Helena, minha irmã Patricia e, em especial, ao meu esposo Rodrigo, pelo companheirismo, estímulo, paciência e carinho durante a realização desta pesquisa. Não poderia deixar de mencionar meu projeto mais valioso, meu filho, Luiz Fernando que foi paciente com minhas ausências nos seus primeiros meses de vida.

A querida orientadora Professora Doutora Maria Beatriz da Fonte Kohek, por me acolher como aluna, pela confiança em mim depositada, pelos ricos ensinamentos desde a época do mestrado, pela orientação, compreensão e leitura crítica do trabalho.

Ao grupo de Pesquisa em Neuroendocrinologia, em especial a Professora Doutora Julia Pereira Lima e a Pós-doutoranda Taiana Haag, pelo apoio, disponibilidade e auxílio na elucidação das diversas dúvidas que surgiram ao longo desse trabalho.

A Patologista, querida Professora Msc. Josenel Marçal pelos ensinamentos e auxílio com a leitura das laminas de HE e IHQ.

Agradecimento especial também a Professora Doutora Lígia Maria Barbosa Coutinho pela orientação e auxílio inicial na identificação das laminas de HE.

A Professora Doutora Gisele Branchini, pela disponibilidade, auxílio inicial no projeto e por disponibilizar a bolsista Andressa Glaeser, que auxiliou na busca dos dados clínicos. A vocês duas, muito obrigada.

As técnicas do Laboratório de Patologia do Programa de Pós-Graduação da UFCSPA Rosalva, Terezinha e Keli pela confecção perfeita das laminas de HE e imunohistoquímica.

A Técnica do laboratório de biologia molecular, Msc Grasiela Agnes pela imensa ajuda nas técnicas de qRT-PCR. Sem seu auxílio seria impossível finalizar o trabalho.

Ao colega Msc. Frederico Giacomoni Pesce, por me acompanhar nessa longa caminhada como aluna de Pós-Graduação e por todo o auxílio ao longo desses anos.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA, em especial a Maristela Pasin, pela constante atenção, solicitude e auxílio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA, meu reconhecimento pelo acolhimento como aluna, ensinamentos no decorrer desses anos e auxílio financeiro.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Patologia da UFCSPA, por partilharem seus conhecimentos.

A todos os colegas e bolsistas que de alguma forma ajudaram e participaram de alguma etapa do trabalho; o apoio de vocês foi fundamental para o desenvolvimento desse projeto.

Aos familiares e amigos pelo apoio, compreensão e carinho durante a realização dessa pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram e comigo conviveram durante estes anos.

A todos vocês, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO	12
INTRODUÇÃO.....	13
1. REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1. A glândula hipófise.....	16
1.2. Definição de células tronco adultas	18
1.3. A origem celular das células tronco hipofisárias/candidatos a células tronco	21
1.3.1. Remodelamento celular na hipófise pós-natal.....	26
1.4. Tumorigênese hipofisária	28
1.5. Células tronco tumorais	32
1.6. Marcadores de superfície.....	36
1.6.1. Nestina.....	39
1.6.2. O antígeno de superfície celular CD44	41
1.6.3. Marcadores de proliferação celular	42
1.6.3.1. KI-67.....	43
1.6.4. p63 e manutenção da pluripotência	44
1.6.5. O <i>TP63</i> promove quiescência celular via indução e ativação do Notch e seu ligante Jagged.	49
1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
2. OBJETIVOS.....	65
2.1. Objetivo geral	65
2.2. Objetivos específicos.....	65
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS REDIGIDOS EM INGLÊS.....	66
3.1. Artigo científico 1.....	67
3.2. Artigo científico 2.....	90
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
5. ANEXOS.....	112
ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	113
ANEXO 2 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFCSPA.....	115
ANEXO 3 – METODOLOGIA.....	117
ANEXO 4 – ARTIGOS DESENVOLVIDOS DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hipófise humana.	17
Figura 2: Representação esquemática da zona marginal, um nicho para as possíveis células tronco hipofisárias.	22
Figura 3: Dois modelos de auto-regeneração e renovação das células tronco teciduais.	23
Figura 4: Relação entre células tronco auto-renováveis e diferenciação.....	25
Figura 5: Células tronco tumorais	32
Figura 6: A origem celular e a evolução da célula tronco tumoral.....	34
Figura 7: Moduladores e efetores do p63.	48
Figura 8: Regulação específica e função do p63 e sinalização Notch na glândula mamária.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparativo entre as características das células tronco adultas e células tronco tumorais.....	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCB5 – Membro da subfamília b do cassete de ligação do ATP

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

ADH – Hormônio anti-diurético

AMPc – AMP(Adenosina 3',5' monofosfato) cíclico

ASPP1/2 – Proteína estimuladora da apoptose do p53 – membros 1 e 2

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

cMyc – V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

CTTs – Células tronco tumorais

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EPCAM - Molécula de adesão epitelial celular

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto

FGFR2 – Receptor 2 do fator de crescimento de fibroblasto

FSH – Hormônio folículo-estimulante

GAPDH – Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase

GH – Hormônio do crescimento

GRFa2 – Receptor alfa 2 do fator neurotrófico das células gliais

HIPK2 – Homeodomain interacting protein kinase 2

IKKA – Ankit singh patial

IHQ – Imuno-histoquímica

LH – Hormônio Luteinizante

mdm2 – Mourine double minute 2

OMS – Organização mundial da saúde

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Pin1 – Peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1

PRL - Prolactina

PROM1 – Prominina 1

RT-PCRq – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA – Ácido ribonucleico

SCA1 – Antígeno de células tronco 1

SOX2 – SRI (Sex determination region Y) - box 2

SOX9 - SRY (sex determining region Y) – box 9

T3 – Triiodotironina

T4 - Tiroxina

TACSTD1 – Transdutor de sinal de cálcio associado ao tumor 1

TH1 – Células T helper 1

TSH – Hormônio tireotrófico

RESUMO

Introdução: Apesar dos adenomas hipofisários serem a neoplasia intracraniana mais comum, sua tumorigênese não está ainda claramente definida. A presença de células tronco/progenitoras tem sido descritas em um crescente número de tecidos adultos, e hipotetiza-se que essas células existam na hipófise, principalmente por sua plasticidade constante devido à resposta hormonal a estimulação hipotalâmica. Alguns estudos utilizando diferentes metodologias *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado a presença dessas células através de alguns marcadores específicos. Através desses estudos, é possível associar a presença dessas células tronco à patofisiologia da glândula hipófise, e melhorar o entendimento da participação desses marcadores tanto no tecido normal quanto no patológico. Recentemente, foi demonstrado o papel do p63 na manutenção da proliferação celular em diversos tecidos, porém esse mecanismo ainda não está descrito claramente na hipófise. **Objetivos:** O objetivo principal do estudo é identificar a presença das células tronco tumorais através da análise da expressão genica e proteica de alguns marcadores em adenomas hipofisários humanos. **Materiais e Métodos:** Amostras de adenomas de hipófise obtidos após cirurgia transfenoidal foram incluídas no estudo. A expressão do mRNA dos genes *TP63* (isoformas TAp63 e Δ Np63), *Notch3* e seu ligante *Jagged1* foram avaliados por qRT-PCR em 77 amostras de tumores hipofisários. Também foram avaliadas a expressão proteica do p63, CD44 e Nestina em 105 amostras de tumores de hipófise emblocados em parafina. Os resultados foram correlacionados com a expressão do marcador de proliferação celular KI-67. Os dados clínicos dos pacientes (sexo, idade, tamanho do tumor, subtipo tumoral, imunohistoquímica para os tumores hipofisários e queixas pré-operatórias) foram obtidos através de análise retrospectiva dos prontuários dos pacientes. **Resultados:** A expressão genica (isoformas TAp63 e Δ Np63) e proteica do p63 está diminuída nos adenomas de hipófise. Observou-se expressão da Nestina em pequeno percentual das amostras analisadas. Correlação positiva entre a expressão do *TP63*, *Notch3* e *Jagged1* foi encontrada, similarmente aos estudos anteriormente publicados. Não houve expressão do CD44 nos adenomas estudados. Além disso, não encontramos associação da expressão proteica dos marcadores estudados com o marcador de proliferação celular KI-67. A expressão dos genes não teve associação estatisticamente significativa com os dados clínicos avaliados. **Conclusão:** Esse estudo descreve pela primeira vez, a expressão do p63 nos adenomas hipofisários, e destaca que ambas as isoformas estão subexpressas nesses adenomas. Esses resultados são positivamente correlacionados com a expressão genica do *Notch3* e *Jagged1*, que de forma contrária, está aumentada nas amostras avaliadas. Apesar de não haver expressão do CD44 nos adenomas hipofisários, a expressão proteica da Nestina sugere a existência de células imaturas nos adenomas hipofisários. Mais estudos são necessários para elucidar esse mecanismo e caracterizar efetivamente esses marcadores como marcadores de células tronco tumorais.

Palavras-chave: Células tronco tumorais, adenomas hipofisários, pluripotência, tumores benignos, marcadores de células tronco.

ABSTRACT

Introduction: Although pituitary adenomas are the most common intracranial neoplasm, its tumorigenesis is not yet clearly defined. The presence of stem/progenitor cells have been described in a growing number of adult tissues, and it is hypothesized that these cells exist in the pituitary, mainly due to its constant plasticity response to hypothalamic hormone stimulation. Some studies using different methodologies in vitro and in vivo have demonstrated the presence of these cells through some specific markers. Through these studies, it is possible to associate the presence of these stem cells pathophysiology of pituitary gland, and improve our understanding of the role of these markers in both normal and pathological tissue. Recently, the role of p63 in the maintenance of cell proliferation was demonstrated in several tissues, but the mechanism is not clearly described in the pituitary.

Objectives: The main objective of this study is to identify the presence of tumor stem cells through the analysis of gene and protein expression of some probable stem cell markers in human pituitary adenomas. **Materials and Methods:** Pituitary adenomas samples obtained after transsphenoidal surgery were included in the study. The mRNA expression of the *TP63* gene (*TAp63* and Δ *Np63* isoforms), *Notch3* and its ligand *Jagged1* were assessed by qRT-PCR in 77 samples of pituitary tumors. We evaluated the protein expression of p63, CD44 and Nestin in 105 samples of pituitary tumors embedded in paraffin. The results were correlated with the expression of the proliferation marker Ki-67. Clinical patient data (sex, age, tumor size, tumor subtype, immunohistochemistry for pituitary tumors and preoperative complaints) were obtained by retrospective analysis of medical records. **Results:** Gene expression (*TAp63* and Δ *Np63* isoforms) and protein p63 are decreased in pituitary adenomas. There was expression of Nestin in a small percentage of the samples. Positive correlation between the *TP63*, *Notch3* and *Jagged1* gene expression was found, similarly to the earlier published studies. There was no expression of CD44 in all adenomas studied. Also, we do not find any association between protein expression of the markers studied and the cell proliferation marker KI-67. The expression of the genes had no statistically significant association with the evaluated clinical data.

Conclusion: Our study shows for the first time the expression of *p63* in pituitary adenomas, and points out that both isoforms are subexpressed in these adenomas. These results are positively correlated with the gene expression of *Notch3* and *Jagged1*, which contrary to, is increased in the analyzed samples. Although there was no expression of CD44 in pituitary adenomas, protein expression of Nestin suggested the existence of immature cells in pituitary adenomas. More studies are needed to elucidate the mechanism involved in these process and effectively characterize these markers as tumor stem cell markers.

Keywords: Tumor stem cells, pituitary adenomas, pluripotency, benign tumors, stem cell markers.

INTRODUÇÃO

Os mecanismos subjacentes à plasticidade celular hipofisária, bem como o *turnover* homeostático são ainda desconhecidos, apesar do progresso na caracterização fisiopatológica e genética dos adenomas hipofisários, com resultados significativos demonstrados por nosso grupo (Oliveira e cols., 2002; (Pizarro e cols., 2004; (Pizarro e cols., 2009; Dallago e cols., 2010; Mezzomo e cols., 2011; Gonzales e cols., 2015). Assim, estudos com a finalidade de identificar eventos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento desses tumores ainda são necessários.

Como demonstrado em outros tecidos, as evidências de regeneração e plasticidade sugerem a existência de células tronco hipofisárias, porém, a natureza dessas células ainda é controversa. Estudos recentes demonstraram que as células tronco tumorais (CTTs) podem agir como células iniciadoras ou atuar na manutenção da tumorigênese em alguns tipos de cânceres. Tem sido proposto que essas células atuem como iniciadoras dos tumores malignos, e mais recentemente estudos indicam a presença de uma subpopulação de células tronco/progenitoras em tumores hipofisários e alguns outros tumores benignos, sendo que essas células poderiam ser as responsáveis pela iniciação e manutenção desses tumores. Entretanto, em tumores benignos, as evidências que demonstram a presença de células tronco ainda são escassas e controversas.

Além disso, é sabido que o fator de transcrição p63 é necessário para a manutenção da troncidade e proliferação celular em diversos tipos de tumores. Apesar de o p63 e suas isoformas estarem sub/superexpressos em uma grande variedade de tumores humanos, como o cervical, cabeça e pescoço, endometrial e fígado, o seu papel nos adenomas hipofisários tem sido pouco explorado.

O conhecimento dos fatores necessários para a organogênese hipofisária são úteis para o entendimento dos mecanismos da diferenciação, desenvolvimento, progressão e recorrência dos adenomas hipofisários. Neste contexto, a compreensão do papel das células progenitoras em adenomas demanda a investigações adicionais.

Pretende-se ampliar os conhecimentos referentes aos fatores envolvidos na tumorigênese hipofisária e sua influência na patogênese dos adenomas, e com isso contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na etiologia desta doença. Nesse trabalho, investigaremos a expressão de marcadores de células tronco tumorais nesses adenomas hipofisários humanos. O conjunto de resultados buscados nesse estudo contribuirá para uma melhor compreensão da fisiopatologia da hipófise agregando valor na busca de futuras opções terapêuticas. O conhecimento gerado nessa área poderá servir como um aprofundamento do entendimento no manejo futuro dos tumores hipofisários.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. A glândula hipófise

A hipófise é a glândula que governa todo o sistema endócrino do corpo humano, pois regula numerosos processos fisiológicos vitais através da secreção de seus hormônios, incluindo crescimento, metabolismo, maturação sexual, reprodução, resposta ao *stress* e defesa imunológica. Suas funções são reguladas pelo hipotálamo, que produz uma variedade de fatores inibitórios e de liberação que modulam a síntese e a secreção hormonal hipofisária (Carbajo-Perez e Watanabe, 1990; Vankelecom, 2012; Nassiri e cols., 2013).

A hipófise madura consiste de dois componentes, a hipófise anterior (adenohipófise) e a hipófise posterior (neurohipófise). A neurohipófise (também chamada de lobo neural, ou hipófise posterior) contém projeções axonais do núcleo hipotalâmico, os quais produzem oxitocina e hormônio anti-diurético (ADH). A adenohipófise, também chamada hipófise anterior, é formada pelo lobo anterior e intermediário e é composta por cinco diferentes células secretoras de hormônios: somatotrófos, os quais secretam hormônio do crescimento (GH), lactotrófos, que secretam prolactina (PRL), corticotrófos que secretam hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), tireotrófos que secretam hormônio estimulador da tireoide (TSH) e gonadotrófos que secretam hormônio luteinizante e hormônio foliculoestimulante (LH e FSH) (Asa e Ezzat, 2009) (Figura 1). Além disso, a adenohipófise também contém células não hormonais incluindo células endoteliais que formam a rede de capilares sinusóides, fibroblastóides mesenquimais e células foliculoesteladas, que dão suporte mecânico e trófico ao compartimento celular endócrino (Vankelecom, 2012).

O remodelamento das células endócrinas da glândula possibilita que o suprimento hipofisário seja adaptável as respostas das demandas hormonais. Sugere-se que células tronco/progenitoras participam da formação das novas células hormonais e desse remodelamento hipofisário, e sua existência na hipófise bem como sua relação com os tumores hipofisários tem sido foco de debate em alguns estudos atualmente (Vankelecom, 2007b; a; Vankelecom e Chen, 2014).

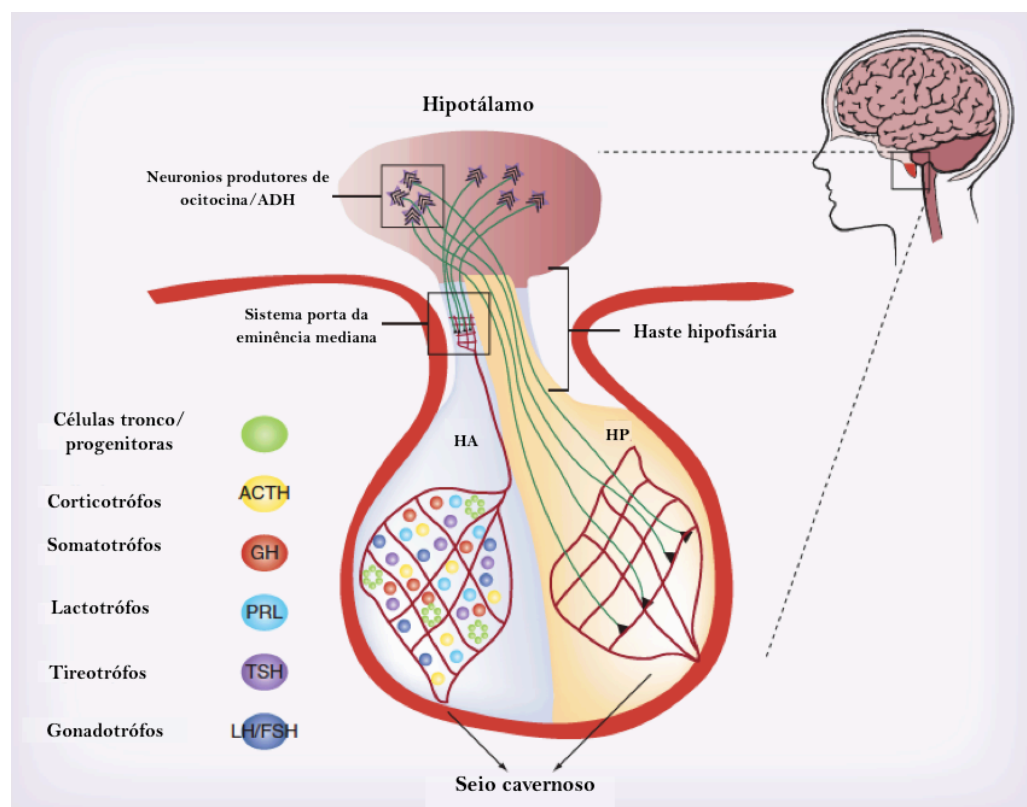


Figura 1: Hipófise humana.

Localizada abaixo da área hipotalâmica do cérebro, compreende duas partes distintas: a adenohipófise (AP) e neurohipófise (NP). A glândula é conectada ao hipotálamo via haste hipofisária ou infundíbulo. A NH compreende principalmente projeções terminais de neurônios alcançando a área hipotalâmica, e secreta ocitocina e ADH. A adenohipófise contém múltiplos tipos celulares hormonais dedicados a produção de ACTH (corticotrófos), GH (somatotrófos), PRL (lactotrófos), TSH (tireotrófos) ou LH/FSH (gonadotrófos). Células tronco/progenitoras poderiam estar distribuídas na AH. A produção de hormônios adenohipofisários é controlada por hormônios estimulatórios e inibitórios sintetizados nos neurônios hipotalâmicos e secretados no sistema porta da eminência mediana. Após ativação, células hipofisárias sintetizam e secretam hormônios que alcançam a circulação através das veias dos sinos cavernosos e agem em órgãos distantes. Adaptado de Willems e Vankelecom, 2014.

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico; ADH: Hormônio anti-diurético; HA: hipófise anterior; HP: Hipófise posterior; FSH: Hormônio folículo-estimulante; GH: Hormônio do crescimento; LH: Hormônio luteinizante; PRL: Prolactina; TSH: Hormônio estimulador da tireóide.

1.2. Definição de células tronco adultas

A presença de populações de células tronco foi inicialmente sugerida devido a evidências histológicas de células aparentemente indiferenciadas entre ou adjacentes às células teciduais histologicamente diferenciadas. A função biológica das células tronco é clara: são cruciais para a renovação fisiológica dos tecidos (*turnover* homeostático), geração de novas células quando solicitado (plasticidade) e a regeneração tecidual após injúrias (Li e Clevers, 2010; Rinkevich e cols., 2011; Nguyen e cols., 2012). Nesse sentido, o estudo sobre a reprogramação de células adultas humanas diferenciadas em células tronco capazes de regenerar todos os tecidos do corpo tem ganhado força nos últimos anos (Castinetti e cols., 2011).

As células tronco, ou ao menos, potenciais candidatos, tem sido descritos em quase todos os tecidos adultos. Acredita-se atualmente que as células tronco adultas residem na maioria dos tecidos humanos (Rando, 2006), em órgãos adultos como coração, fígado e gônadas, bem como em órgãos geralmente considerados pós-mitóticos, como cérebro, músculo esquelético e próstata (Murry e Keller, 2008; Castinetti e cols., 2011; Tang, 2012). Entretanto, em órgãos como cérebro e coração, o significado funcional das células tronco residentes permanecem foco de debate uma vez que reparo e *turnover* não são observados (Gage, 2000; Beltrami e cols., 2003). Por outro lado, em virtude do alto *turnover*, as células tronco hematopoiéticas, células tronco intestinais e epitélio escamoso estão entre os mais bem estudados (Fuchs e Horsley, 2011; Medema e Vermeulen, 2011; Simons e Clevers, 2011). Em tecidos nos quais as células são frequentemente renovadas, como o intestino e pele, novas células são continuamente formadas com o objetivo de repor as células que se perdem

(Moore e Lyle, 2011), e assim corroboram a teoria da presença das células tronco teciduais.

Alguns critérios definem as células tronco, como seu infinito potencial de auto-renovação: uma célula tronco passa por divisões simétricas para produzir duas células tronco idênticas. As células podem também se dividir assimetricamente para dar origem a uma célula tronco e uma célula progenitora. A célula progenitora possui capacidade de auto-renovação limitada ou ausente, porém pode proliferar para expandir como células amplificadoras de transição que se tornam comprometidas com programas de diferenciação através de um variado espectro de células maduras teciduais. Além disso a célula deve ter habilidade de regeneração tecidual após perda celular através de programas de diferenciação (pluripotência). Dependendo da capacidade de diferenciação, células tronco/progenitoras são consideradas multipotentes (formam todas as linhagens teciduais ex: células tronco hematopoiéticas), oligopotentes (geram um limitado numero de linhagens ex: células tronco neurais que dão origem a alguns tipos de neurônios) e onipotentes (dão origem a uma única linhagem ex: células tronco espermatogônicas). Por fim, a célula deve demonstrar ausência de especialização (Chen e cols., 2005; Castinetti e cols., 2011; Vankelecom, 2012).

Sob condições homeostáticas, o número de células tronco em um tecido permanece relativamente constante (Knoblich, 2008). Os sinais precisos que desencadeiam a expansão de uma população celular específica são desconhecidos, porém, acredita-se que provavelmente estão relacionados à mecanismos de *feedback*, fatores de crescimento, mecanismos de sinalização e fatores de transcrição (Castinetti e cols., 2011; Leis e cols., 2012). Evidências tem demonstrado que tantas células quiescentes (células que estão fora do ciclo celular e em um estado de baixo

metabolismo), ativas (no ciclo celular) e subpopulações de células tronco podem coexistir em diversos tecidos (Li e Clevers, 2010).

As células tronco adultas são multipotentes e podem gerar diferentes linhagens de células progenitoras que posteriormente se diferenciarão em células funcionantes maduras. Nesse sentido, células tronco adultas, células progenitoras e células em vários estágios de diferenciação constituem o escopo de células nos órgãos adultos e criam o que chamamos de heterogeneidade celular (Tang, 2012).

É importante mencionar que as células tronco e células progenitoras dos tecidos adultos são consideradas células com características embrionárias. Células tronco e células progenitoras tecido-específicas podem residir em estados de desenvolvimento similares às células embrionárias que as originaram (Slack, 2008).

Um grande esforço tem sido realizado na busca de populações consideradas células tronco na glândula hipófise. Yoshimura e colegas (Yoshimura e cols., 1969) descreveram as primeiras possíveis células progenitoras na glândula hipófise de ratos em 1969. Anos mais tarde, Chen e colaboradores sugeriram que a hipófise adulta continha células que expressam marcadores de células tronco/progenitoras (Chen e cols., 2005), dado que foi corroborado posteriormente por outros estudos (Fauquier e cols., 2008; Gleiberman e cols., 2008). Entretanto, apesar de diversos candidatos terem sido identificados em estudos envolvendo principalmente modelos animais, uma conclusão definitiva sobre esse assunto ainda não foi encontrada (Florio, 2011).

1.3. A origem celular das células tronco hipofisárias/candidatos a células tronco

Evidências sugerem a existência de células tronco hipofisárias em tecidos adultos (Castinetti e cols., 2011; Vankelecom e Chen, 2014; Orciani e cols., 2015), porém, até o momento não há consenso em relação aos tipos celulares hipofisários capazes de serem considerados definitivamente células tronco. As células cromóforas (ou células hormonalmente inativas), foram o primeiro grupo de células a ser considerado como uma potencial célula tronco (Yoshimura e cols., 1969). Células foliculoesteladas, descobertas há mais de meio século, e as células foliculares, igualmente hormonalmente inativas, também foram consideradas candidatas a células tronco em virtude de sua morfologia e comportamento reativo (Allaerts e Vankelecom, 2005). Posteriormente, uma subfração da população de células cromóforas, compreendida como “células marginais” foi proposta como provável população de células tronco. Recentemente as pesquisas enfocam que um reservatório de células tronco (nicho) estaria presente na zona marginal da hipófise pós-natal (Vankelecom, 2012).

A teoria mais aceita atualmente é que células tronco/progenitoras são tipicamente localizadas em um microambiente celular especializado, o nicho, que regula sua manutenção e destino (Moore e Lemischka, 2006). Esses nichos de células tronco adultas diferem na sua composição celular, estrutura e localização nos diferentes tecidos (Braun e Prowse, 2006; Tang, 2012). Na hipófise, as células tronco são geralmente raras. Acredita-se que o nicho dessas células localiza-se na zona marginal adjacente a fenda de Rathke, e é composto de várias células de suporte (epitelial ou estromal), matriz extracelular, vasos sanguíneos e fibras nervosas (Figura 2). Essas células apresentariam características morfológicas sugestivas de células

tronco, como a ausência de grânulos secretórios, pouca diferenciação do retículo endoplasmático, abundância de ribossomos e polissomos livres e uma atividade proliferativa desde o nascimento até a idade adulta. Essas observações sugerem que ao menos parte do sistema endócrino é derivado de células da zona marginal (Castinetti e cols., 2011). Publicações baseadas no potencial dos marcadores de células tronco hipofisárias, corroboram essa teoria e serão detalhados mais adiante (Chen e cols., 2005; Fauquier e cols., 2008; Garcia-Lavandeira e cols., 2009).

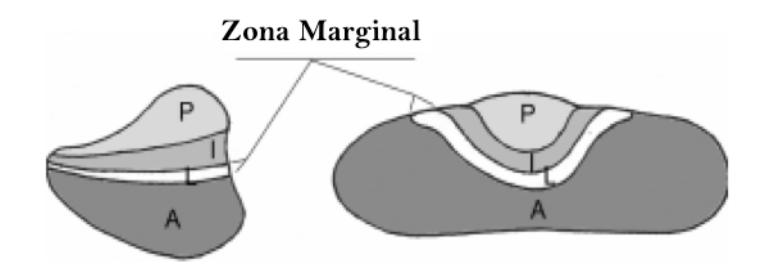


Figura 2: Representação esquemática da zona marginal, um nicho para as possíveis células tronco hipofisárias.

P: lobo posterior; I: lobo intermediário; A: lobo anterior; L: lúmen. Adaptado de Castinetti e cols., 2011.

Apesar da alta capacidade proliferativa das células tronco, a maior parte parece ser quiescente. Assim, as células tronco ativas são uma subpopulação de células que representam a maioria do tecido de reposição, enquanto as células quiescentes funcionam como um *backup* ou subpopulação reserva. Essa subpopulação reserva poderia ser ativada por um mecanismo determinado ou por *feedback*, após perda de células tronco ativas ou após extensivo dano tecidual (Tang, 2012) (Figura 3).

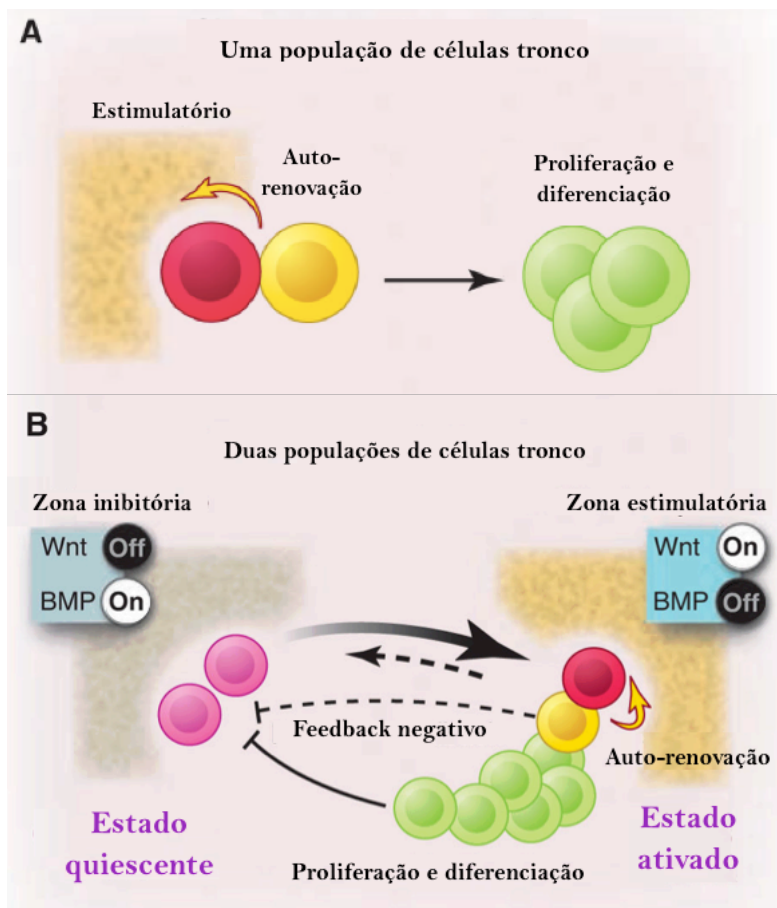


Figura 3: Dois modelos de auto-regeneração e renovação das células tronco teciduais.

(A) Modelo prevalente que mostra uma única população de células tronco localizadas no nicho. A divisão assimétrica é o mecanismo chave que mantém o balanço entre auto-renovação e diferenciação. (B) Modelo alternativo e complementar: Co-existência de populações de células tronco quiescentes e ativas localizadas em zonas adjacentes com sinais correspondentes inibitórios e estimulatórios. Células quiescentes repõem células tronco ativas danificadas. Por outro lado, células tronco ativas podem repor células tronco quiescentes. Um *feedback* negativo pode contribuir para a prevenção da ativação de células tronco quiescentes. Adaptado de Li e Clevers, 2010.

Desse modo, manter uma subpopulação de células tronco é particularmente vantajoso em tecidos com rápida capacidade de regeneração, pois esse mecanismo diminui o risco de mutações tumorigênicas. O pool de células tronco quiescentes proporciona aumento da longevidade das células tronco adultas através da população substituída, uma vez que essas células quiescentes podem repor células tronco ativas danificadas. Esse mecanismo evita que o pool de células tronco ativas se esgote e

ainda protege do acúmulo de mutações potencialmente tumorigênicas que ocorre durante a replicação do DNA. Em paralelo, as células tronco ativas possivelmente são capazes de regenerar células tronco quiescentes sob circunstâncias muito especiais. Assim, a combinação desses sistemas de *backup* recíproco propõe um mecanismo que garanta um alto índice de renovação fisiológica (Li e Clevers, 2010). Logo, a subpopulação de células tronco sustentaria a homeostase tecidual, garantindo a reposição celular durante o processo de envelhecimento ou após danos celulares.

A propriedade de auto-renovação das células tronco permite a persistência de um número constante dessas células nos nichos de cada órgão. Em resposta a estímulos específicos, ainda não completamente caracterizados, as células tronco entrariam assimetricamente em divisão resultando em uma célula tronco e uma célula filha comprometida com a divisão celular (progenitora) (Figura 4). Essas células progenitoras desempenham atividade limitada de auto-renovação, porém possuem uma alta taxa de proliferação gerando as células amplificadoras de transição, uma população celular que, de acordo com o ambiente específico que cresce, terminalmente se diferencia em células especializadas que compõem cada órgão (Slack, 2008).

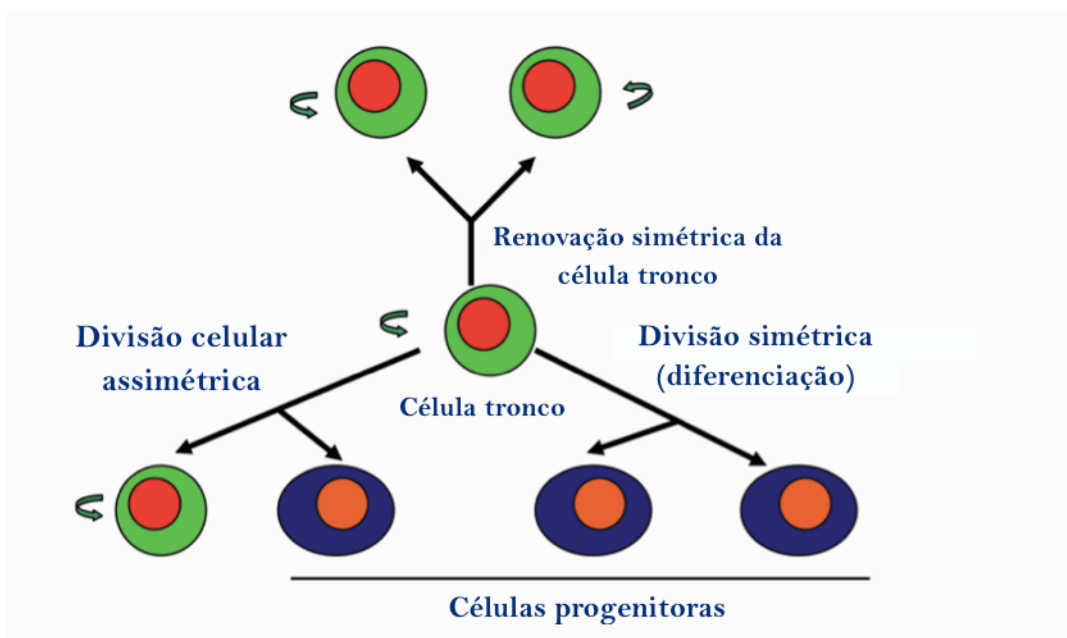


Figura 4: Relação entre células tronco auto-renováveis e diferenciação.

As células tronco auto renováveis são indicadas pelas setas curvas. Somente uma célula progenitora unipotente é descrita na imagem. As células tronco podem ter três modos de divisão: renovação simétrica, divisão celular assimétrica, e células comprometidas com a divisão (diferenciação). A auto-renovação pode ser assimétrica ou simétrica. Entretanto, a divisão celular assimétrica é mais frequentemente usada para auto-renovação em virtude das duas células filhas não somente serem fenotipicamente distintas, mas terem também destinos distintos. Adaptado de Tang, 2012.

Esses dados demonstrados embasam a hipótese formulada sobre a identificação do nicho das células tronco na hipófise. Entretanto, muitas questões ainda permanecem sem resposta, entre elas, quais seriam os marcadores que identificam as células tronco hipofisárias?

Pouco ainda é sabido sobre o processo de diferenciação após a célula deixar o nicho, todavia, a hipótese que células hipofisárias são renovadas por células tronco implica na existência de um mecanismo regulado de morte celular em células diferenciadas que ainda necessita ser elucidado (Garcia-Lavandeira e cols., 2015).

1.3.1. Remodelamento celular na hipófise pós-natal

A glândula hipófise oferece um modelo único para determinar o papel das células tronco na renovação e a formação celular (Garcia-Lavandeira e cols., 2015). Ela responde a complexos sinais, centrais e periféricos por dois mecanismos: primeiro, a secreção hormonal é finamente controlada para regular a homeostase. Segundo, a plasticidade da hipófise pode ser demonstrada por respostas de crescimento hipofisário, através de hipoplasia, hiperplasia ou formação de adenomas (Melmed, 2003).

As evidências iniciais da presença de células hipofisárias multipotentes são baseadas nessa responsividade da hipófise a condições fisiológicas ou patológicas. Essa resposta emprega uma variedade de mecanismos, incluindo a diferenciação de células tronco hipofisárias, auto-renovação através da mitose de células diferenciadas, transdiferenciação, expansão de potenciais precursores ou ainda outro tipo celular desconhecido (Vidal e cols., 2000). Por exemplo, sabe-se que a hipófise adulta se regenera após cirurgia ou doença imune, como a hipofisite (Fu e cols., 2012; Fu e Vankelecom, 2012). Durante a gravidez e lactação, há um aumento da demanda da produção de prolactina, a qual é acompanhada por um aumento do número de células lactotróficas que pode ocorrer, primeiramente por hipertrofia. Ainda, é descrito que o crescimento pós-natal envolve a re-entrada de algumas células produtoras de hormônios no ciclo celular (Taniguchi e cols., 2001a; b). Assim como a maioria dos tecidos, a hipófise contém células proliferativas indiferenciadas durante cada fase da organogênese, e de fato, a hipófise fetal em desenvolvimento requer a expansão de um pool de células progenitoras que posteriormente se diferenciarão (Melmed, 2003). Também sabe-se que a expansão de cada população, dirigida por hormônios hipotalâmicos e demandas fisiológicas, ocorre após o nascimento, à medida que a

glândula se desenvolve (Stahl e cols., 1999; (Ward e cols., 2006). Todavia, apesar desses aspectos descritos, a capacidade de plasticidade e regeneração da glândula hipofisária ainda requer mais estudos (Castinetti e cols., 2011), bem como a compreensão dos mecanismos subjacentes a estas ações.

Nesse sentido, busca-se entender a natureza dos progenitores hipofisários, incluindo células com características de células tronco durante a embriogênese e o órgão adulto. Pouco é conhecido sobre o recrutamento de progenitores, hiperplasia e hipertrofia durante a puberdade, gravidez, cicatrização de feridas e também em casos de demandas fisiológicas não usuais (Davis e cols., 2013). Assim, a extensão na qual a regeneração é possível e os mecanismos subjacentes não estão ainda totalmente esclarecidos.

Evidências apontam que a adaptação hipofisária a demandas fisiológicas poderia ocorrer em três diferentes modos: (1) proliferação das células diferenciadas (células produtoras de hormônios), que entram em mitose; (2) transdiferenciação de células diferenciadas preexistentes, como por exemplo, a conversão dos somatotrófos em lactotrófos e (3) diferenciação e recrutamento de progenitores/células tronco (Davis e cols., 2013). Alguns dados experimentais parecem excluir os dois primeiros mecanismos. De fato, eventos mitóticos observados após adrenalectomia envolvem principalmente células hormonalmente inativas (>90%), que somente após algumas semanas se diferenciam em corticotrófos. Similarmente, linhagens genéticas sugerem que células secretoras de prolactina, desenvolvidas em resposta a estrogênios (por exemplo, durante a gravidez), raramente são derivadas de células somatotróficas (Castrique e cols., 2010), porém são principalmente derivadas da proliferação auto-limitada do pool não hormonal de células hipofisárias (Nolan e Levy, 2009). Essas evidências levantam a hipótese que tanto o *turnover* das células hipofisárias quanto

mudanças celulares ocorrem como uma adaptação dinâmica nas condições fisiológicas ou patológicas e podem ocorrer por recrutamento de subpopulações celulares hipofisárias ainda não identificadas dotadas com características de células tronco/progenitoras (Vankelecom, 2007b; Florio, 2011).

Assim, a hipófise anterior não é um sistema estático, mas exerce considerável remodelamento dos seus componentes celulares endócrinos (Vankelecom, 2012). Nesse sentido, embora a existência de células tronco hipofisárias seja muito provável, o(s) mecanismo(s) que regulam a proliferação e diferenciação durante o desenvolvimento e após o nascimento não estão completamente elucidados (Castinetti e cols., 2011).

1.4. TUMORIGÊNESE HIPOFISÁRIA

O remodelamento com recorrente expansão e regressão de populações celulares torna o tecido hipofisário susceptível a alterações genéticas e formação tumoral (Vankelecom, 2012). Os tumores hipofisários podem se originar de qualquer célula da hipófise e os seus produtos secretados dependem da origem celular (Melmed, 2003). O tipo mais frequente de tumor que ocorre na adenohipófise é o adenoma hipofisário, uma neoplasia benigna responsável por 7 a 25% dos tumores cerebrais, que ocorre tipicamente em adultos (Gold, 1981; Al-Shraim e Asa, 2006; Asa e Ezzat, 2009; (Dworakowska e Grossman, 2009; Ostrom e cols., 2015). Esses tumores apresentam uma ampla gama de manifestações clínicas, atividade hormonal e comportamento proliferativo (Asa e Ezzat, 1998; Al-Shraim e Asa, 2006). Apesar de serem classificados como tumores benignos, pois raramente metastatizam, causam

significativa morbidade devido a expressão dos hormônios hipofisários, ou sintomas neurológicos devido a compressão do nervo óptico (Melmed, 2003; Asa e Ezzat, 2009).

Uma parte dos adenomas secreta hormônios hipofisários e produz uma grande variedade de síndromes endócrinas (Kovacs e cols., 2001). A classificação desses tumores funcionantes é usualmente baseada nos tipos de hormônios que eles produzem, a hipersecreção de prolactina (PRL), origina os prolactinomas, hormônio do crescimento (GH) os somatotropinomas, com características clínicas de acromegalia ou gigantismo, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), a doença de Cushing, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) os gonadotropinomas e hormônio estimulador da tireoide (TSH), os tireotropinomas. Alguns adenomas não secretam hormônios, e são classificados como adenomas não funcionantes. São o fenótipo mais frequente, e o diagnóstico é baseado nas dificuldades visuais e cefaleia devido a compressão do nervo óptico pelo tumor. Os adenomas hipofisários também são classificados pelo tamanho do tumor: macroadenomas são maiores que 10mm de diâmetro, enquanto os microadenomas tem diâmetro inferior a 10mm (Asa e Ezzat, 1998; Melmed, 2003; Levy, 2004; Al-Shraim e Asa, 2006; Asa e Ezzat, 2009).

A importância clínica dos adenomas hipofisários juntamente com suas características biológicas peculiares e a complexa regulação da hipófise anterior tem feito desses tumores objeto de estudo intensivo nos últimos anos. Contudo, sua patogênese continua sendo um enigma na oncologia endócrina, pois poucos genes ou mecanismos moleculares são conhecidos como responsáveis pelo desenvolvimento desses adenomas (Tichomirowa e cols., 2009). Embora sejam reconhecidas anormalidades em diferentes vias na patogênese dos adenomas hipofisários, não há

um consenso a respeito do mecanismo de iniciação dos tumores (Donangelo e cols., 2014).

Os tumores hipofisários são incomuns quando comparados a outros tumores sólidos: são invariavelmente benignos, tem crescimento lento, não apresentam metástases e podem responder a sinais fisiológicos, como no caso dos prolactinomas e somatotropinomas. Ainda, alguns regridem espontaneamente, após anos de quiescência; enquanto que, em outros, os perfis de secreção podem ser cíclicos, com uma hipersecreção precedendo um longo período de secreção normal. Outro fato intrigante é que geralmente microadenomas não se transformam em macroadenomas (Castinetti e cols., 2011). Esses dados sugerem que o modelo clássico de tumorigênese não pode ser completamente aplicado aos tumores de hipófise (Sergeant e cols., 2009).

Supõe-se que os adenomas hipofisários se originam tanto das células diferenciadas como das células progenitoras ou células tronco. O fato de os tumores hipofisários possuírem perfis de secreção distintos comparados com as células hipofisárias normais, favorece a teoria das células tronco/progenitoras ao invés das células pré-diferenciadas. Além disso, a atividade mitótica mínima nos tumores hipofisários e a existência de tipos celulares não secretores e adenomas plurihormonais sustentam a ideia que as células tronco ou progenitoras podem ser uma fonte para a tumorigênese hipofisária (Melmed, 2003).

A hipótese das células tronco tumorais representa uma teoria que postula que a desregulação de uma pequena subpopulação de células determina o desenvolvimento e crescimento do tumor. (Donangelo e cols., 2014). Estudo publicado por Xu e colaboradores (Xu e cols., 2009) foi o primeiro a descrever a presença de possíveis células tronco nos tumores hipofisários. Utilizando métodos de cultura celular, os

autores isolaram células semelhantes a células tronco em dois adenomas obtidos após ressecção cirúrgica: um adenoma somatotrófico e um adenoma não secretor. Quando as células tumorais foram colocadas em cultura, estruturas esferoides, multipotentes e com capacidade de auto-renovação foram isoladas. Os autores demonstraram também que essas células expressam os marcadores de células tronco Nestina e CD133. No entanto, estes resultados ainda precisam ser confirmados por outros estudos.

Embora tenha sido sugerida a presença das células tronco na hipófise (Gleiberman e cols., 2008; (Garcia-Lavandeira e cols., 2009), a habilidade de auto-renovação, um pré-requisito absoluto para um fenótipo de célula tronco, ainda necessita ser estabelecido de forma definitiva.

Outro ponto a ser discutido é o nicho. Apesar dos estudos proporem que a zona marginal hipofisária é um nicho de células tronco, são necessárias ainda evidências experimentais conclusivas. Além destes, a identificação de marcadores celulares definitivos, únicos ou uma combinação desses marcadores, precisa ser estabelecida.

Apesar da existência da plasticidade da hipófise ter sido demonstrada há alguns anos, a caracterização das células tronco hipofisárias permitiria lançar luz aos mecanismos envolvidos na tumorigênese hipofisária (Garcia-Lavandeira e cols., 2015). Além disso, se a hipótese de células tronco estarem envolvidas na tumorigênese hipofisária for válida, as consequências para o tratamento dos adenomas podem ser significativas. A não ser que todas as células tronco hipofisárias sejam removidas, há um risco indefinido para recorrência desses tumores. Assim, as implicações da descoberta das células tronco hipofisárias são consideráveis, possibilitando o aprimoramento no manejo dos adenomas de hipófise (Nassiri e cols., 2013).

1.5. CÉLULAS TRONCO TUMORAIS

As células tronco transformadas são chamadas células tronco tumorais (CTTs), também conhecidas como células iniciadoras do câncer, e são definidas como a fração de células dentro de um tumor que são duradouras e possuem potencial de proliferação indefinido (Ricci-Vitiani e cols., 2009). A teoria das CTTs sugere que as alterações genéticas nas células tronco são a causa direta do câncer (Orciani e cols., 2015).

É sabido que a tumorigênese se assemelha a organogênese e que muitos tumores caracterizam-se por serem heterogêneos, contendo células fenotipicamente e funcionalmente muito diferentes (Tang, 2012) (Figura 5).

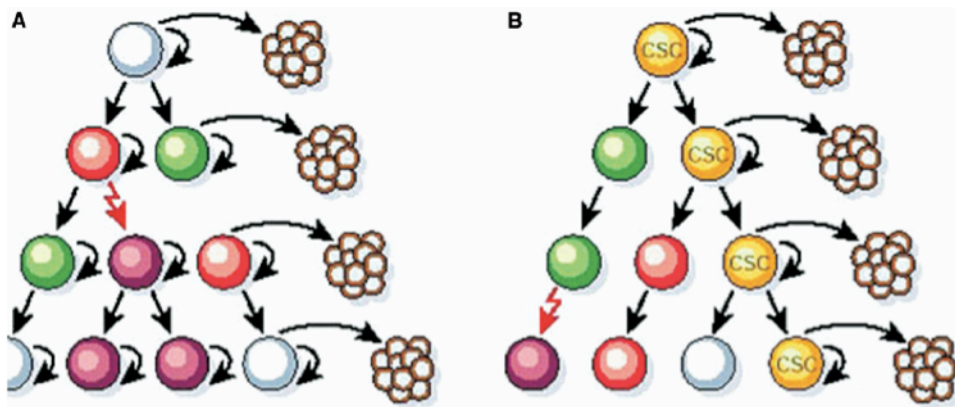


Figura 5: Células tronco tumorais

A. Células tumorais são heterogêneas, porém a maioria das células podem proliferar extensivamente e formar novos tumores. B. Células tumorais são heterogêneas, e somente as células tronco cancerígenas (CSC, amarelo) possuem a habilidade de proliferar extensivamente e formar novos tumores. Adaptado de Huang e cols., 2007.

Especula-se que as CTTs tenham características comumente encontradas em populações de células tronco, como por exemplo: atividade metabólica diferenciada,

sinalização específica e características de regulação do ciclo celular, embora essa regulação seja aberrante (Reya e cols., 2001; Jordan e cols., 2006). A Tabela 1 fornece um comparativo entre as células tronco adultas e células tronco tumorais.

Tabela 1: Comparativo entre as características das células tronco adultas e células tronco tumorais.

<i>Características</i>	<i>Células tronco adultas</i>	<i>Células tronco tumorais</i>
Potencial replicativo	Extensiva capacidade proliferativa, com potencial de exaurir a habilidade regenerativa	Extensiva capacidade proliferativa, com potencial de exaurir a habilidade regenerativa
Habilidade de diferenciação	Todas as linhagens tecido-específicas	Todas linhagens heterogêneas dentro do tumor
Atividade metabólica	Baixa	Desconhecida
Mecanismo de sinalização	Hedghog, Wnt, Notch and BMB	Aberrante regulação do Hedghog, Wnt, Notch, BMB e outros
Regulação do ciclo celular	Lento ciclo, finamente controlado	Potencialmente lento ciclo, desconhecido
Localização	Nicho: compartimentalizado ou associado a camada basal	Desconhecido
Adesão	Firmemente aderido	Desconhecido
Potencial de migração	Não/ Lenta migração	Características epiteliais ou mesenquimais

Adaptado de Moore e Lyle, 2011.

Entretanto, o modelo de CTTs não implica necessariamente que os tumores são gerados através da transformação de células tronco teciduais (Leis e cols., 2012), ou seja, essas células podem ou não serem originadas das células tronco normais (Visvader, 2011). Os alvos da transformação podem ser as células tronco teciduais, uma célula progenitora ou uma célula diferenciada que adquire capacidade de auto-renovação. Assim, a observação que a reprogramação da pluripotência e câncer são relacionados permite a especulação que CTTs podem originar-se a partir de um mecanismo de reprogramação (Leis e cols., 2012). De fato, devido as células progenitoras geralmente representarem o maior pool proliferativo em um órgão, elas

teoricamente representam os maiores alvos de transformação. Nesse contexto, as células progenitoras transformadas adquirem capacidade de auto-renovação, se tornando CTTs e estabelecendo o tumor (Tang, 2012) (Figura 5).

Por outro lado, as células inicialmente transformadas (células tronco tumorais ou células iniciadoras do câncer) não são necessariamente responsáveis pela origem do tumor. A célula transformada pode permanecer dormente por décadas sem gerar um tumor clinicamente detectável (Tang, 2012). A Figura 6 descreve um modelo de origem celular e evolução da célula tronco cancerígena .

Ainda, a quantidade e o número de CTTs varia de acordo com o paciente, o tipo de tumor, grau e status do tratamento. Também, sua abundância não se relaciona com as características clínicas do tumor, entretanto está estritamente relacionada aos níveis de diferenciação e malignidade. É importante destacar que CTTs que sobrevivem ao tratamento podem ser responsáveis pela recorrência do tumor, como resultado da reativação e proliferação das CTTs sobreviventes (Orciani e cols., 2015).

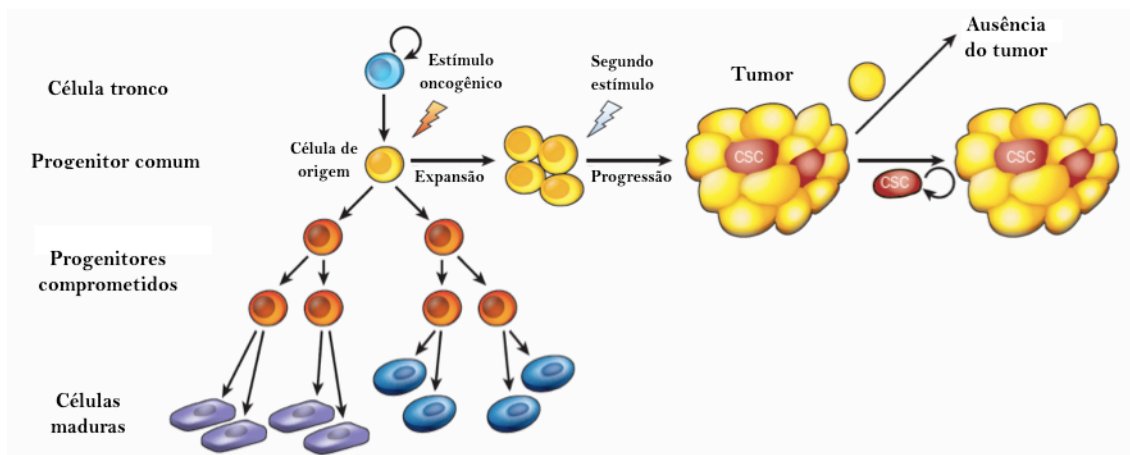


Figura 6: A origem celular e a evolução da célula tronco tumoral.

A hierarquia normal compreende células tronco que progressivamente geram células progenitoras comuns e restritas gerando os tipos celulares maduros que constituem os tecidos em particular. Apesar das células que originam um tumor poderem ser uma célula precursora com progenitores comuns, o acúmulo de mutações epigenéticas pela célula com aberrante população (nesse caso expandida) durante a progressão neoplásica pode resultar no aparecimento de uma célula tronco tumoral. Nesse modelo, somente as células tronco tumorais (e não outras células tumorais) são capazes de sustentar a tumorigênese. Entretanto, a célula de origem na qual a tumorigênese é iniciada, pode ser distinta das células tronco tumorais que propagam o tumor. Adaptado de Visvader, 2011.

Muitos estudos preliminares tem mostrado que esse mecanismo existe em cânceres humanos (Leis e cols., 2012). Descobertas recentes apontam as CTTs como iniciadoras do câncer e levantam uma importante questão: CTTs estão presentes em tumores benignos, como no caso dos tumores hipofisários?

Apesar da publicação desses estudos preliminares, a existência e o papel das CTTs em tumores hipofisários benignos ainda é controversa. A expressão alvo do gene PTTG (*pituitary tumor transforming gene*) em células tronco/progenitoras leva à hiperplasia plurihormonal e adenoma, sugerindo possivelmente que a origem do tumor ocorra através de uma célula tronco transformada. Entretanto, como essas células compartilham as características de células tronco e a maneira que elas poderiam iniciar os adenomas hipofisários são questões que ainda permanecem sem resposta (Xu e cols., 2009). A existência de células hormonalmente inativas bem como adenomas hipofisários plurihormonais podem representar indicações do envolvimento das células tronco na formação de certos tipos de tumores hipofisários (Vankelecom e Chen, 2014). Recentemente Orciani e colaboradores (Orciani e cols., 2015) descreveram que os tumores de hipófise contém uma população de células tronco que pode gerar tipos celulares característicos de células tronco mesenquimais, e expressam CD133, que é associado a CTTs em outros tumores.

Uma mutação somática nas células tronco na hipófise adulta poderia ser a origem da neoplasia hipofisária (Herman e cols., 1990). Células tronco adultas podem ser mais susceptíveis a transformação neoplásica que células maduras diferenciadas, uma vez que elas possuem capacidade de auto-renovação e podem persistir em tecidos por longos períodos, aumentando a probabilidade de mutações tumorigênicas (Barker e cols., 2009; (Zhu e cols., 2009). Todavia, a questão de qual seria o papel potencial

das células tronco/progenitoras na progressão dos tumores benignos em geral, e adenomas hipofisários em particular, permanece incerta (Donangelo e cols., 2014).

1.6. Marcadores de superfície

As evidências da presença de células tronco na hipófise derivam da positividade para marcadores de células tronco em subpopulações de tecidos adultos. Assim, os métodos atuais para isolamento e estudo de CTTs amparam-se em marcadores celulares de superfície, apesar do uso desses marcadores ainda ser controverso. Sabe-se até o momento muito pouco a respeito da função de muitos dos marcadores propostos, e menos ainda é conhecido sobre as suas implicações (Xu e cols., 2009; (Moore e Lyle, 2011; Tang, 2012). Um grande número de marcadores de superfície tem se mostrado útil para o isolamento de CTTs, incluindo CD133 (também conhecido como PROM1), CD44, CD24, molécula de adesão epitelial EpCAM, (também chamada de antígeno epitelial específico ESA ou TACSTD1 - transdutor de sinal de cálcio associado ao tumor 1), TH1 (células T helper) e ABCB5 (membro da subfamília b do cassete de ligação do ATP).

As CTTs frequentemente são isoladas usando marcadores para células tronco normais no mesmo órgão. É evidente que marcadores de superfície mais comuns, em particular CD133 e CD44, tem sido usados para identificar as CTTs em diversos tipos de tumores sólidos, porém ainda não podemos prever que esses marcadores representam ou se podem regular as funções das CTTs. Notavelmente nenhum desses marcadores é expresso exclusivamente em CTTs, destacando a necessidade de marcadores mais específicos ou o uso de uma combinação de marcadores que efetivamente identifique as CTTs (Visvader e Lindeman, 2008).

As evidências que suportam a existência de células tronco hipofisárias adultas normais baseiam-se na expressão de marcadores de células tronco/progenitoras. Estudos recentes tem focado em diferentes marcadores na hipófise, como o CD133, SOX2, SOX9 (SRY-like HMG-box gene), GFRa2 (receptor alfa 2 da família do GDNF), SCA1 (antígeno de células tronco 1), Nestina e S100 β , que são considerados marcadores de células tronco em outros órgãos. Atualmente já foram caracterizadas populações de células hipofisárias positivas para esses marcadores (Castinetti e cols., 2011).

O CD133 é um marcador importante de células tronco em tecido normal como em células tronco tumorais (Yu e cols., 2011). O gene codifica uma glicoproteína transmembrana, e é frequentemente expressa em células tronco adultas, cuja função é manter as propriedades de células tronco pela supressão da diferenciação (Genebank/Ncbi, 2012). A expressão desse gene está associada a diferentes tipos de cânceres e já foi descrita em hipófises (Yunoue e cols., 2011).

O fator de transcrição SOX2 é necessário para a manutenção de diversas populações de células tronco em humanos durante o desenvolvimento do sistema nervoso (Episkopou, 2005). A melhor evidência para células tronco hipofisárias foi descrita por Fauquier e colaboradores (Fauquier e cols., 2008), quando publicaram que populações celulares SOX2⁺ estão localizadas na zona marginal, entre o lobo anterior e intermediário na hipófise de ratos. Em ratos adultos, SOX2⁺ representa 3-5% de toda a população celular da hipófise anterior, o que é consistente com a teoria que afirma que há um limitado numero de células tronco em órgãos adultos (Dontu e cols., 2003).

Recentemente Garcia-Lavandeira e colaboradores (Garcia-Lavandeira e cols., 2009) descreveram GFRa2 como um marcador de células tronco hipofisário. Uma

população celular de GRFa2⁺ está presente em adultos e está restrita a uma única camada na zona marginal da hipófise em ratos. Em adultos, a população representa menos de 1% de toda a população celular hipofisária. De forma interessante, a maioria dessas células expressa SOX2 e SOX9, o que poderia sugerir que essas células são progenitoras, como descrito anteriormente por Fauquier e colaboradores (Fauquier e cols., 2008). Apesar dessas evidências, o papel preciso da GRFa2 ainda necessita ser determinado (Castinetti e cols., 2011).

O SCA1, um marcador de células tronco (Asakura e cols., 2002) em diversos tecidos, tem sido descrito na hipófise (Chen e cols., 2005). No entanto, é necessário ainda melhor definição ou marcadores adicionais para descrever o potencial papel do SCA1 na auto-renovação e na regeneração tecidual (Castinetti e cols., 2011).

Estudos sugerem que células foliculoesteladas poderiam ser células tronco hipofisárias. Essas células não produzem hormônios e são agranulares, em contraste com as células secretoras da hipófise. Constituem aproximadamente 5-10% de toda a população celular (Devnath e Inoue, 2008) e possuem morfologia caracterizada por longos prolongamentos citoplasmáticos (Fauquier e cols., 2001). Possuem muitos papéis na hipófise, incluindo atividade fagocitária e suporte, através de estrutura mecânica e produção de citocinas e fatores de crescimento, e também facilitam a interação do sistema imune e endócrino entre as células hipofisárias. Um dos principais marcadores é o S100 β , detectável logo após o nascimento, na zona marginal da hipófise. Seu uso como marcador no entanto ainda é ambíguo, devido ao fato de não ser específico e nem todas as células foliculoesteladas o expressarem (Devnath e Inoue, 2008). Faz-se necessário ainda marcadores específicos para células foliculoesteladas e experimentos que testem a habilidade de auto-renovação dessas células para uma conclusão definitiva sobre esse assunto (Castinetti e cols., 2011).

Portanto, nos últimos anos, estudos envolvendo populações de células hipofisárias multipotentes foram baseados no potencial de marcadores de células tronco. A aplicação dessa teoria poderia ajudar a explicar como a hipófise responde as mudanças fisiológicas, e também, a importância relativa da hipertrofia, transdiferenciação, a geração de novas células como resposta ao dano ao DNA incluindo a formação tumoral (Castinetti e cols., 2011).

Assim, um grande espectro de marcadores tem sido descritos na última década, e cada um deles tem um efeito distinto sobre as vias moleculares que participam da organogênese e formação tumoral hipofisária. Nesse sentido, o estudo desses marcadores expande o conhecimento acerca da fisiologia e patologia hipofisária. Apesar de vários marcadores estarem sendo objeto de estudos recentes, os papéis de alguns deles serão brevemente detalhados adiante.

1.6.1. Nestina

Nestina é uma proteína de filamento intermediário e é um marcador de células tronco em diversos tipos de tecidos, incluindo adulto e embrionário, entretanto, sua expressão não é restrita as células tronco. É expressa em diversos tecidos adultos (foliculo capilar, próstata e hipófise), e é a proteína mais expressa em células nervosas (Gilyarov, 2008; (Rizzoti, 2010).

Estudo publicado por Krylyshkina e colaboradores (Krylyshkina e cols., 2005) utilizou ratos Wistar para descrever que células imunorreativas para Nestina foram observadas de forma dispersa no lobo anterior, intermediário e posterior desses animais e são mais numerosas em animais imaturos que adultos. Além disso, também postulam que células Nestina⁺ são células hormonalmente inativas. Os autores

concluem o trabalho afirmando que ainda são necessários mais estudos para verificar se a população Nestina⁺ contém células progenitoras. Pesquisa realizada por Gleiberman e colegas (Gleiberman e cols., 2008), utilizando ratos transgênicos que expressaram o gene Nestina, caracterizaram uma potencial população de células progenitoras na hipófise. Esse estudo também mostrou que as células Nestina⁺ foram observadas principalmente na zona marginal da hipófise, o que é consistente com a localização dos progenitores hipofisários descritos em outros estudos (Castinetti e cols., 2011). Assim, os autores sugerem que células Nestina⁺ podem ser células tronco em tecidos adultos, em contraste com outras células tronco que são expressas durante a embriogênese. Posteriormente, artigo publicado por Yoshida e colaboradores (Yoshida e cols., 2013) descreve que células em divisão que expressam Nestina existem na hipófise em todos os estágios de desenvolvimento.

Um estudo (Rotondo e cols., 2006) utilizou a técnica de imunohistoquímica para avaliar a imunoreatividade da Nestina na hipófise normal e em tumores hipofisários. Para isso os autores incluíram 23 hipófises normais e 125 adenomas. Diversos corticotrófos nas hipófises obtidas de autópsias expressaram Nestina. Os autores não encontraram expressão da Nestina nos outros tipos celulares na adenohipófise normal e nas células de vários tipos de adenomas. No entanto, as células Nestina⁺ foram encontradas em uma pequena porção de células endoteliais, nos lobos anterior e posterior da hipófise. Os autores não encontraram correlação estatística entre a imunopositividade da Nestina e idade, gênero, tamanho do tumor, índice mitótico, KI-67 ou tipo tumoral.

Assim, o conceito da Nestina como marcador de células tronco hipofisárias é intrigante, porém requer maiores investigações (Castinetti e cols., 2011). Foi descrito que a expressão da Nestina é aumentada em nódulos hiperplásicos e pode estar

associada ao aumento da vascularização nos adenomas (Castinetti e cols., 2011; (Perez-Millan e cols., 2013). Ela é expressa em capilares e em células endoteliais e fortemente expressa em capilares recentemente formados (Salehi e cols., 2008) Estudo publicado por Perez-Millan e colaboradores (Perez-Millan e cols., 2013) descreveu que um aumento da expressão da Nestina está relacionada com o aumento da angiogênese nesses tumores.

Assim, até o momento, não há evidências concretas que evidenciem que células Nestina⁺ são reconhecidamente de células tronco hipofisárias, e mais estudos são necessários para definitivamente estabelecer seu potencial no desenvolvimento hipofisário (Florio, 2011).

1.6.2. O antígeno de superfície celular CD44

O CD44 é uma glicoproteína transmembrana de superfície celular envolvida na adesão celular migração e manutenção das características de células tronco. Participa de uma grande variedade de funções celulares, e está relacionada ao desenvolvimento do câncer através do aumento da proliferação celular (Zoller, 2011; Genebank/Ncbi, 2012).

Numerosos estudos demonstraram que a expressão do CD44 está relacionada a invasão e metástase nos diferentes tipos de câncer, como colorretal, carcinoma gástrico, pulmão, mama e tumores malignos do sistema urinário e reprodutivo (Naor e cols., 1997; (Ghaffarzadehgan e cols., 2008; Golshani e cols., 2008; Mayer e cols., 2008; Wallach-Dayana e cols., 2008; Huh e cols., 2009; Simon e cols., 2009)

Até o momento, poucos trabalhos publicados focaram no estudo da expressão do CD44 nos adenomas hipofisários. É descrito que o CD44 poderia ser um marcador

de células tronco em tecidos endócrinos (Lloyd e cols., 2013). Frank e colaboradores (Frank e cols., 1996), utilizando técnicas de imunohistoquímica e RT-PCR descreveram que o CD44 foi expresso na maioria dos tumores cerebrais primários e suas metástases. Posteriormente, estudo publicado por Xing e colegas (Xing e cols., 2013), utilizou imunohistoquímica e citometria de fluxo para avaliar a presença do CD44 em 35 adenomas obtidos após ressecção cirúrgica. O estudo não encontrou diferença estatisticamente significativa na expressão do CD44 quando comparou tumores invasivos e não invasivos. Recentemente, um grupo de pesquisadores (Zhou e cols., 2016) utilizou técnica de microarray para descrever que o CD44 pode ter importante papel na progressão dos adenomas hipofisários.

Assim, faz-se necessário mais estudos a respeito da expressão do CD44 e sua relação com os tumores benignos, em particular os adenomas de hipófise.

1.6.3. Marcadores de proliferação celular

Os marcadores de proliferação tem sido utilizados como ferramentas prognósticas e diagnósticas para o melhor entendimento do comportamento biológico em diversos tumores. Apesar de novos marcadores estarem sendo estudados atualmente, o KI-67 é estabelecido como um marcador clássico e utilizado rotineiramente. Assim, para um melhor entendimento do comportamento biológico dos adenomas de hipófise, o estudo dos marcadores de proliferação faz-se necessário.

1.6.3.1. KI-67

Esse gene codifica uma proteína nuclear que é associada e é necessária para a proliferação celular. É um marcador já validado para os adenomas hipofisários, expresso no núcleo das células em todo o ciclo celular G1, G2-M e fase S, exceto na fase G0 (Genebank/Ncbi, 2012; Saeger e cols., 2016). Na classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), o KI-67 representa o prognóstico dos adenomas hipofisários. Enquanto a maioria dos adenomas hipofisários tem índices de KI-67 em torno de 1 – 2%, níveis acima de 3% são incomuns e compreendem diversos fatores (juntamente com pleomorfismo e número de mitoses) utilizados para denotar tumores hipofisários atípicos, de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS. Estudos demonstram que sua expressão é correlacionada com a velocidade de crescimento do tumor (Honegger e cols., 2003).

Desde a publicação do estudo de Landolt e colegas (Landolt e cols., 1987), muitos trabalhos descreveram a relação de altos valores de KI-67 com os adenomas invasivos. Pizarro e colaboradores (Pizarro e cols., 2004) descreveram que a atividade proliferativa é maior nos adenomas invasivos que nos não invasivos. Para isso, os autores avaliaram a expressão do KI-67 em 159 adenomas utilizando a técnica de imunohistoquímica. Não houve diferença estatisticamente significativa entre idade, gênero e grupos tumorais. O estudo mostrou que o índice médio do KI-67 nas amostras pesquisadas foi de $1,22 \pm 2,09\%$. Esses dados corroboram o trabalho publicado por Schreiber e colaboradores (Schreiber e cols., 1999) que utilizaram 160 adenomas não funcionantes para descrever que o KI-67 é um marcador útil para avaliar o comportamento agressivo dos adenomas não funcionantes. Esses dados foram confirmados posteriormente (Paek e cols., 2005; Mahta e cols., 2007; Ma e cols., 2013; Magagna-Poveda e cols., 2013), e postula-se atualmente que as

recorrências dos adenomas de hipófise estão relacionadas a altos índices de expressão do KI-67. Nesse sentido, é descrito na literatura um caso de crescimento hipofisário extremamente rápido, com invasão do seio cavernoso cujo paciente foi submetido a três hipofisectomias em 6 meses, e cujo índice do KI-67 foi de 22% (Prevedello e cols., 2005).

Assim, o KI-67 unicamente não pode ser utilizado para determinar malignidade e não fornece informações que predizem a recorrência do tumor, porém esse marcador tem utilidade na identificação dos tumores que podem ter um curso mais agressivo. Nesse sentido, altos índices de KI-67 sugerem maior atenção no seguimento do paciente e portanto, estratégias terapêuticas apropriadas.

1.6.4. p63 e manutenção da pluripotência

Vinte anos após a descoberta do gene supressor tumoral *TP53*, dois genes relacionados (*TP73* e *TP63*) foram descritos, trazendo a noção de uma família de genes *TP53* (Trink e cols., 1998; Yang e cols., 1998). Considerando a similaridade estrutural desses dois genes com o *TP53*, era de se esperar que suas funções fossem similares ao *TP53* em termos de supressão tumoral, indução da apoptose e controle do ciclo celular. Entretanto, foi demonstrado que a relação entre essa família de genes é muito mais complexa. Esses genes são estruturalmente diferentes: diferentemente do *TP53*, *TP63* e *TP73* tem dois promotores, resultando em diferentes tipos de produtos proteicos: ambos contendo o domínio TA (TAp63 E TAp73) e ambos com ausência do domínio TA (Δ Np63 e Δ Np73). Além disso, de forma similar ao *TP53*, esses dois genes passam por *splicing* alternativo, originando três isotipos (α , β e γ).

Inicialmente os estudos de expressão do *TP63* em cânceres humanos eram confusos e trouxeram resultados contraditórios, gerando dúvidas se a função do *TP63* seria suprimir ou promover a tumorigênese. Essa confusão ocorreu principalmente devido a complexa estrutura do gene *TP63* e dos anticorpos estudados que não distinguem entre as diferentes isoformas do gene (Su e cols., 2013).

Em geral, a isoforma TAp63 tem comportamento similar ao *TP53*, principalmente porque ela age em muitos alvos do *TP53*, induz apoptose e media o controle do ciclo celular, atuando como supressora da tumorigênese e metástase. Contudo, a isoforma Δ Np63 parece ter funções opostas ao TAp63, incluindo a ação como oncoproteína (Ratovitski e cols., 2001; Little e Jochemsen, 2002; Stiewe e cols., 2002; Zaika e cols., 2002; Wu e cols., 2003; Nekulova e cols., 2011; Su e cols., 2013; Costanzo e cols., 2014). Nesse sentido, o *TP63* apresenta duas isoformas com efeitos regulatórios opostos baseados na expressão desses dois principais isotipos, os domínios TA e Δ N. Ambas são susceptíveis a estarem envolvidas em muitos processos celulares, incluindo controle do ciclo celular, apoptose, proliferação e migração celular (Wu e cols., 2003). Porém, a atividade de cada isoforma ainda não está completamente elucidada, e é área de intensa investigação. Desse modo, relativamente pouco é descrito até o momento a respeito dos mecanismos responsáveis pela expressão diferencial das isoformas TA e Δ N nos diferentes tecidos e em condições fisiopatológicas (Costanzo e cols., 2014).

Diferentes hipóteses tem sido propostas relacionando a função do *TP63* e o desenvolvimento do câncer. Sabe-se que as isoformas do *TP63* são caracterizadas por padrões diferenciais de expressão: particularmente assume-se a ideia que o Δ Np63 (a isoforma predominante) mantém não somente a população de células tronco epiteliais, mas também está envolvida na persistência das células tronco cancerígenas,

especialmente em tumores epiteliais. O Δ NPp63 é expresso em células epiteliais basais e é necessário para o desenvolvimento normal de diversos tecidos epiteliais, incluindo bexiga, próstata e epitélio colorretal (Pignon e cols., 2013), porém sua expressão diminui com a diferenciação celular (Yang e cols., 1998; Di Como e cols., 2002). Desse modo, essa isoforma é necessária para a renovação das células tronco (Yang e cols., 1999; Senoo e cols., 2007), bem como para a diferenciação terminal (Koster e cols., 2007; Romano e cols., 2012). Trabalho publicado por Senoo e colaboradores (Senoo e cols., 2007) demonstra que a isoforma Δ Np63 é necessária para a manutenção da “tronicidade” das células tronco de todo o epitélio estratificado, o qual inclui pele, mama e próstata, entre outros, e o fenótipo (ausência de estratificação epitelial) é a consequência da falha tecidual oriunda da depleção do compartimento de células tronco. Esse dado, juntamente com os demais estudos publicados, claramente estabelecem o papel fundamental do *TP63* na biologia das células tronco epiteliais (Pellegrini e cols., 2001; Moll e Slade, 2004).

Por outro lado, o TAp63 é implicado em manutenção das células tronco e quiescência, prevenindo o envelhecimento prematuro e senescência (Su e cols., 2009). A expressão do TAp63 é responsável pela ativação dos genes responsivos ao *TP53*, levando a parada no ciclo celular e apoptose (Yang e cols., 1998). Em virtude dessas implicações no câncer e manutenção das células tronco, o *TP63* pode ter um papel relevante na manutenção dos fenótipos das células tronco tumorais (Graziano e De Laurenzi, 2011; Melino, 2011).

Di Como e colaboradores (Di Como e cols., 2002) avaliaram a expressão do p63 em tecidos normais e em tecidos tumorais utilizando a técnica de imunohistoquímica, e verificaram que a sua expressão é restrita ao núcleo celular. Nesse trabalho, os autores mostraram ainda que a expressão proteica do p63 foi restrita a células epitélio

estratificado, como pele, esôfago, tonsilas, bexiga e também certas subpopulações de células basais em estruturas glandulares como próstata e mama, bem como brônquios. Consistente com o fenótipo encontrado em tecidos normais, os autores verificaram a expressão do p63 predominantemente em células basais e carcinomas escamosos, além de carcinomas transicionais, timomas e linfomas não Hodgkin. Porém não foi verificada expressão em adenocarcinomas, incluindo mama e próstata. O grupo não encontrou, ainda, expressão do p63 em uma variedade de tumores endócrinos, incluindo as 4 amostras testadas de adenomas de hipófise. Não foi avaliada, nesse estudo, a expressão do p63 em hipófises normais, porém em glândulas adrenal e tireóide. Já estudo realizado por Yang (Yang e cols., 1998), utilizando técnica de PCR em modelos animais, verificou expressão dos transcritos TAp63 e Δ Np63 em adrenal, contrariando em parte os resultados obtidos por Di Como e colaboradores.

Assim, pouco se sabe ainda sobre a expressão do p63 e os tumores de hipófise. Não há estudos publicados que verifiquem sua expressão, bem como a expressão das duas isoformas nesses tumores. Ainda, a grande maioria dos estudos que avaliam a expressão do p63 não discriminam entre as isoformas TAp63 e Δ Np63, muitas vezes gerando resultados controversos. Ainda, em virtude da forte evidência morfológica e funcional relacionando o p63 a troncidade (Senoo e cols., 2007), diversos detalhes moleculares ainda precisam ser elucidados. Considerando o papel crucial proposto das CTTs na tumorigênese, o gene *TP63*, especialmente da isoforma *Δ NP63* pode ter relevância na área de oncologia (Melino, 2011).

Muitos dos mecanismos moleculares relacionados com a auto-renovação em células tronco foram elucidados. Esses mecanismos de sinalização estão implicados tanto em auto-renovação e desenvolvimento das células tronco como em cânceres. Entretanto, há diversos mecanismos conectados ao fenótipo das células tronco nos

quais o p63 está envolvido, entre eles a sinalização Notch (Sasaki e cols., 2002; Nekulova e cols., 2011).

A interação do p63 com outros membros da família p53 e seus moduladores (ASPP1/2, HIPK2, mdm2, Pin1, Pirh2) (Patel e cols., 2008; Lazzari e cols., 2011), e também sua habilidade de controlar fatores de transcrição de genes envolvidos com vias de desenvolvimento e tumorigênicas, como IFR6, IKK α e FGFR2 (Botti e cols., 2011; Ramsey e cols., 2013) é melhor exemplificada na Figura 7. O IKK α e IFR6 são fortemente regulados para baixo em CTTs, e sua expressão é correlacionada negativamente com a diferenciação no câncer (Botti e cols., 2011; Ramsey e cols., 2013). O IFR6 age também, em um mecanismo diferente, sendo mediador da atividade anti-cancerígena do Notch1 (Restivo e cols., 2011), mas também repressor da atividade do cMyc e mecanismos FGF. De forma interessante, dados recentes mostram que o FGFR2, é um mediador das funções oncogênicas Δ Np63 em CTTs (Ramsey e cols., 2013).

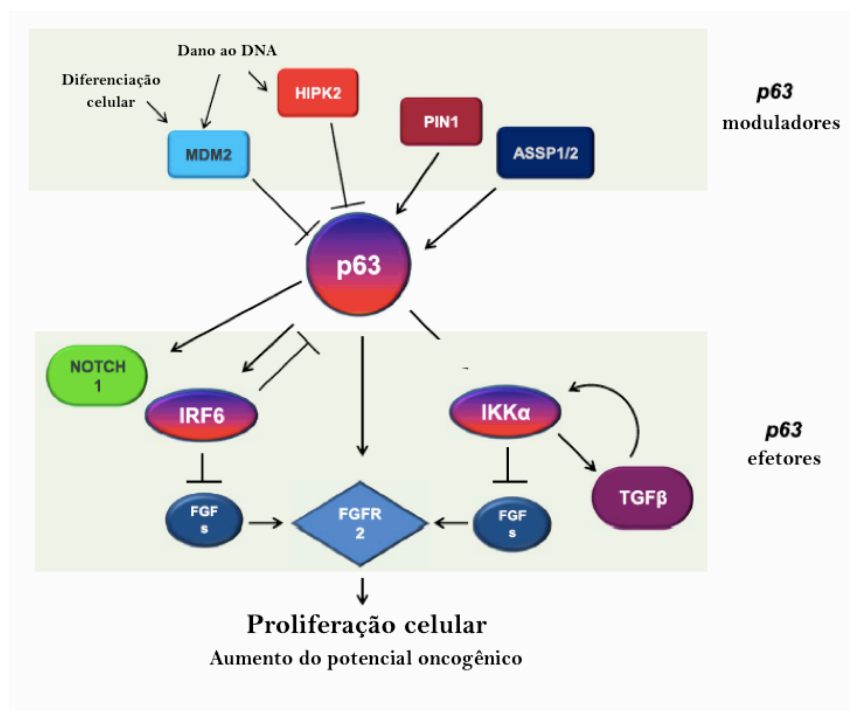


Figura 7: Moduladores e efetores do p63.

Adaptado de Costanzo e cols., 2014.

Assim, a complexidade da família p53 juntamente com o entendimento ainda incompleto da extensão da funcionalidade e hierarquia operacional em diferentes condições fisiológicas e patológicas continuam estimulando os esforços nas pesquisas, porém, ao mesmo tempo limitam a transposição do conhecimento até o manejo clínico dos pacientes com câncer (Costanzo e cols., 2014).

1.6.5. O *TP63* promove quiescência celular via indução e ativação do Notch e seu ligante Jagged.

A via de sinalização do Notch é reguladora da auto-renovação e diferenciação em diversos tecidos e tipos celulares, e sua hiperativação tem sido implicada como oncogênica em vários tipos de tumores sólidos. Similar ao receptor Notch, um de seus ligantes, o Jagged, é uma proteína transmembrana (Lobry e cols., 2014). A expressão desregulada do Notch tem sido relatada em um crescente número de tumores sólidos humanos, como cérebro (Gray e cols., 1999; Cuevas e cols., 2005), cérvix e cólon (Zagouras e cols., 1995), bem como do seu ligante, Jagged, em cânceres humanos cerebrais (Purow e cols., 2005) e em tumores pancreáticos (Santagata e cols., 2004). Estudos relatam que a expressão do *TP63* interfere na habilidade do Notch em restringir o crescimento e promover diferenciação (Yugawa e cols., 2010). De forma contrária, a sinalização do Notch diminui a expressão do *TP63*, especialmente a isoforma $\Delta Np63$. Esses mecanismos demonstram as funções antagônicas entre o *TP63* e a sinalização Notch (Nekulova e cols., 2011).

É descrito que os ligantes do Notch, Jagged1 e Jagged2, são induzidos seletivamente pelo *TP73* e *TP63*, respectivamente, mas não pelo *TP53*. Os mesmos

autores relatam que *TP63* pode ativar a sinalização do Notch para as células vizinhas. Esses achados demonstram um papel potencial do *TP63* e *TP73* no desenvolvimento normal e regulação celular mediada pela sinalização Notch, bem como um importante papel da família *TP53* no desenvolvimento normal (Sasaki e cols., 2002).

Apesar de muitos tumores sólidos exibirem expressão aberrante do Notch, um fator causal entre a sinalização do Notch na patogênese desses tumores tem sido melhor estudada em câncer de mama. Recentemente, Kent e colaboradores (Kent e cols., 2011) apresentaram novas evidências na manutenção da quiescência celular, quando demonstraram que a expressão do $\Delta Np63a$, a isoforma predominante do *TP63* expressa em células epiteliais mamárias, promove quiescência celular. Assim, o grupo demonstrou evidências que a ativação do Notch3, um dos quatro membros da família Notch expresso em células mamárias, é o principal mediador da quiescência induzida pelo *TP63* (Figura 8). Esses achados trouxeram uma nova dimensão da já conhecida e complexa integração da sinalização entre *p63* e Notch no epitélio, e sugerem que a isoforma $\Delta Np63a$ pode ser um dos determinantes da sinalização do Notch.

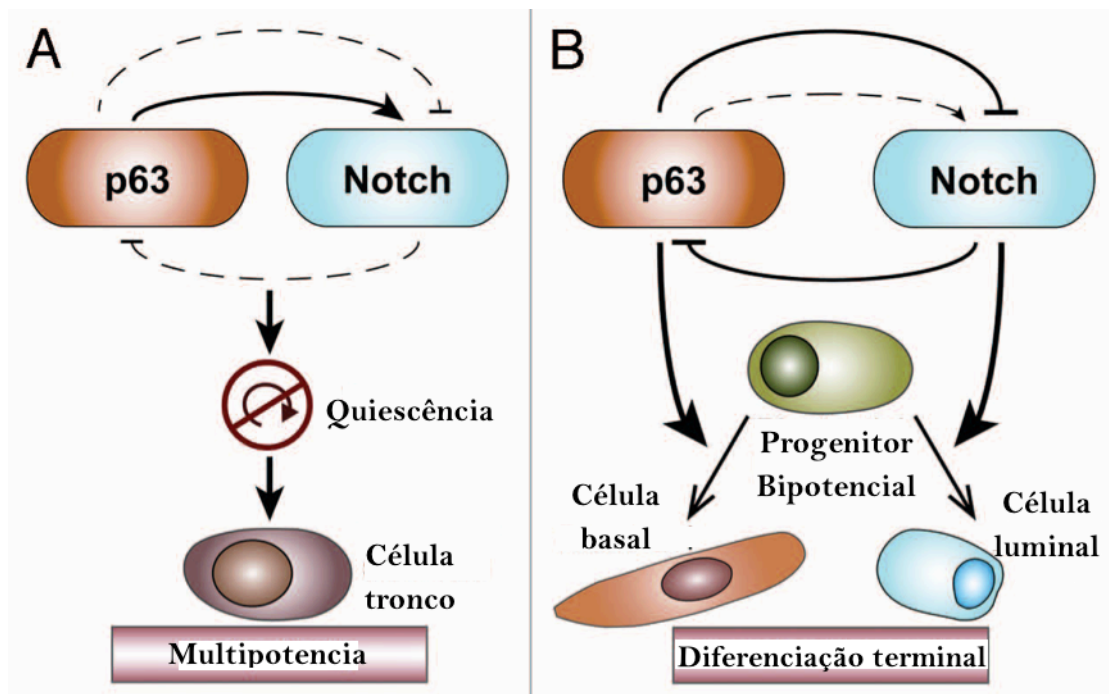


Figura 8: Regulação específica e função do p63 e sinalização Notch na glândula mamária.

(A) Ativação de expressão Notch pelo p63 inibe a progressão do ciclo celular, promovendo assim a quiescência, que está associada com a auto-renovação das células mamárias. (B) Em contraste, a inibição recíproca de *p63* e sinalização Notch controla o destino das sinalização celular de células progenitoras bipotenciais ao longo das linhagens epiteliais basal (associado ao p63) ou luminais (associada com Notch). Adaptado de Forster e Ellisen, 2011.

A relação antagonica entre Notch e $\Delta Np63a$ parece ter consequências na homeostase do tecido epitelial mamário: a sinalização do Notch implica na diminuição da expressão do *TP63*, e como consequência, em carcinogênese. No entanto, o papel desse antagonismo na tumorigênese, ainda necessita maiores esclarecimentos. (Yalcin-Ozuysal e cols., 2010).

Dados recentes demonstram que na hipófise, a sinalização Notch controla a transição entre a proliferação e diferenciação, e potencialmente através de inibição lateral, influencia a diferenciação das células nos cinco tipos de células produtoras de hormônios. Estudos mostram que a expressão persistente do Notch2 interfere no desenvolvimento dos gonadotrófos, e, em menor extensão, dos tireotrófos. Além disso, gonadotrófos extinguem a expressão do Notch2, sugerindo que o Notch2

poderia inibir a diferenciação celular na hipófise da mesma forma que ocorre no sistema nervoso e células endócrinas pancreáticas. Em contraste, a proliferação das células hipofisárias expressam o Notch2 não parece ser afetada. Na hipófise adulta, os componentes da sinalização Notch são expressos em células com a mesma localização, sugerindo como contendo progenitores/células tronco (Chen e cols., 2005; Yavropoulou e cols., 2015).

Um dos primeiros estudos que demonstram o aumento da expressão do Notch3 em adenomas clinicamente não funcionantes foi publicado por Miao e colaboradores (Miao e cols., 2012), sugerindo que esse aumento da expressão poderia facilitar o crescimento dos tumores, e em virtude disso, a via do Notch3 poderia ser um alvo terapêutico. Posteriormente, trabalho publicado por Lu e colegas (Lu e cols., 2013) corrobora os resultados anteriores, mostrando que a expressão do Notch3 e seu ligante Jagged1 está aumentada em adenomas clinicamente não funcionantes, porém essa expressão não é vista na glândula hipófise normal e em adenomas secretores. Esses dados mostraram que tanto Notch3 quanto seu ligante Jagged1 podem ter um papel muito importante na iniciação e proliferação dos adenomas não funcionantes, e ainda, pode haver uma interação entre o Notch3 e o Jagged nesse processo.

Apesar da presença do *TP63* ser estabelecida em alguns tecidos, o papel do *TP63* e sua possível relação com a via Notch e seu ligante Jagged em adenomas de hipófise, ainda não foi completamente elucidado.

1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Al-Shraim M, Asa SL. The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: what is new? **Acta Neuropathol.** 2006 Jan;111(1):1-7.

Allaerts W, Vankelecom H. History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research. **Eur J Endocrinol.** 2005 Jul;153(1):1-12.

Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. **Endocr Rev.** 1998 Dec;19(6):798-827.

_____. The pathogenesis of pituitary tumors. **Annu Rev Pathol.** 2009 4(97-126).

Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. **J Cell Biol.** 2002 Oct 14;159(1):123-34.

Barker N, Ridgway RA, Van Es JH, Van De Wetering M, Begthel H, Van Den Born M *et al.* Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. **Nature.** 2009 Jan 29;457(7229):608-11.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. **Cell.** 2003 Sep 19;114(6):763-76.

Botti E, Spallone G, Moretti F, Marinari B, Pinetti V, Galanti S *et al.* Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinomas. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2011 Aug 16;108(33):13710-5.

Braun KM, Prowse DM. Distinct epidermal stem cell compartments are maintained by independent niche microenvironments. **Stem Cell Rev.** 2006 2(3):221-31.

Carbajo-Perez E, Watanabe YG. Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period. **Cell Tissue Res.** 1990 Aug;261(2):333-8.

Castinetti F, Davis SW, Brue T, Camper SA. Pituitary stem cell update and potential implications for treating hypopituitarism. **Endocr Rev.** 2011 Aug;32(4):453-71.

Castrique E, Fernandez-Fuente M, Le Tissier P, Herman A, Levy A. Use of a prolactin-Cre/ROSA-YFP transgenic mouse provides no evidence for lactotroph transdifferentiation after weaning, or increase in lactotroph/somatotroph proportion in lactation. **J Endocrinol.** 2010 Apr;205(1):49-60.

Chen J, Hersmus N, Van Duppen V, Caesens P, Deneef C, Vankelecom H. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. **Endocrinology.** 2005 Sep;146(9):3985-98.

Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**. 1993 Sep;15(3):532-4, 536-7.

Costanzo A, Pediconi N, Narcisi A, Guerrieri F, Belloni L, Fausti F *et al*. TP63 and TP73 in cancer, an unresolved "family" puzzle of complexity, redundancy and hierarchy. **FEBS Lett**. 2014 Aug 19;588(16):2590-9.

Cuevas IC, Slocum AL, Jun P, Costello JF, Bollen AW, Riggins GJ *et al*. Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway. **Cancer Res**. 2005 Jun 15;65(12):5070-5.

Dallago CM, Barbosa-Coutinho LM, Ferreira NP, Meurer R, Pereira-Lima JF, Oliveira Mda C. Determination of cell proliferation using Mcm2 antigen and evaluation of apoptosis and TGF-beta1 expression in GH-secreting or clinically nonfunctioning pituitary adenomas. **Endocr Pathol**. 2010 Mar;21(1):32-9.

Davis SW, Ellsworth BS, Perez Millan MI, Gergics P, Schade V, Foyouzi N *et al*. Pituitary gland development and disease: from stem cell to hormone production. **Curr Top Dev Biol**. 2013 106(1-47).

Devnath S, Inoue K. An insight to pituitary folliculo-stellate cells. **J Neuroendocrinol**. 2008 Jun;20(6):687-91.

Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J *et al*. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. **Clin Cancer Res**. 2002 Feb;8(2):494-501.

Donangelo I, Ren SG, Eigler T, Svendsen C, Melmed S. Scn1(+) murine pituitary adenoma cells show tumor-growth advantage. **Endocr Relat Cancer**. 2014 Apr;21(2):203-16.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ *et al*. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. **Genes Dev**. 2003 May 15;17(10):1253-70.

Dworakowska D, Grossman AB. The pathophysiology of pituitary adenomas. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. 2009 Oct;23(5):525-41.

Episkopou V. SOX2 functions in adult neural stem cells. **Trends Neurosci**. 2005 May;28(5):219-21.

Fauquier T, Guerineau NC, McKinney RA, Bauer K, Mollard P. Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001 Jul 17;98(15):8891-6.

Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson IC. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008 Feb 26;105(8):2907-12.

Florio T. Adult pituitary stem cells: from pituitary plasticity to adenoma development. **Neuroendocrinology**. 2011 94(4):265-77.

Forster N, Ellisen LW. Notch signaling mediates p63-induced quiescence: a new facet of p63/Notch crosstalk. **Cell Cycle**. 2011 Nov 1;10(21):3632-3.

Frank S, Rihs HP, Stocker W, Muller J, Dumont B, Baur X *et al*. Combined detection of CD44 isoforms by exon-specific RT-PCR and immunohistochemistry in primary human brain tumors and brain metastases. **Biochem Biophys Res Commun**. 1996 May 24;222(3):794-801.

Fu Q, Gremeaux L, Luque RM, Liekens D, Chen J, Buch T *et al*. The adult pituitary shows stem/progenitor cell activation in response to injury and is capable of regeneration. **Endocrinology**. 2012 Jul;153(7):3224-35.

Fu Q, Vankelecom H. Regenerative capacity of the adult pituitary: multiple mechanisms of lactotrope restoration after transgenic ablation. **Stem Cells Dev**. 2012 Dec 10;21(18):3245-57.

Fuchs E, Horsley V. Ferreting out stem cells from their niches. **Nat Cell Biol**. 2011 May;13(5):513-8.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. **Science**. 2000 Feb 25;287(5457):1433-8.

Garcia-Lavandeira M, Diaz-Rodriguez E, Bahar D, Garcia-Rendueles AR, Rodrigues JS, Dieguez C *et al*. Pituitary Cell Turnover: From Adult Stem Cell Recruitment through Differentiation to Death. **Neuroendocrinology**. 2015 Feb 5;

Garcia-Lavandeira M, Quereda V, Flores I, Saez C, Diaz-Rodriguez E, Japon MA *et al*. A GRFα2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary. **PLoS One**. 2009 4(3):e4815.

Genebank/Ncbi. **National Center for Biotechnology Information** 2012.

Ghaffarzadehgan K, Jafarzadeh M, Raziee HR, Sima HR, Esmaili-Shandiz E, Hosseinneshad H *et al*. Expression of cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma and its prognostic importance. **World J Gastroenterol**. 2008 Nov 7;14(41):6376-81.

Gilyarov AV. Nestin in central nervous system cells. **Neurosci Behav Physiol**. 2008 Feb;38(2):165-9.

Gleiberman AS, Michurina T, Encinas JM, Roig JL, Krasnov P, Balordi F *et al*. Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008 Apr 29;105(17):6332-7.

Gold EB. Epidemiology of pituitary adenomas. **Epidemiol Rev**. 1981 3(1):163-83.

Golshani R, Lopez L, Estrella V, Kramer M, Iida N, Lokeshwar VB. Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44. **Cancer Res.** 2008 Jan 15;68(2):483-91.

Gonzales PH, Mezzomo LC, Ferreira NP, Roehe AV, Kohek MB, Oliveira Mda C. Aromatase P450 expression in human pituitary adenomas. **Neuropathology.** 2015 Feb;35(1):16-23.

Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D, Carcangiu ML, Banks A *et al.* Human ligands of the Notch receptor. **Am J Pathol.** 1999 Mar;154(3):785-94.

Graziano V, De Laurenzi V. Role of p63 in cancer development. **Biochim Biophys Acta.** 2011 Aug;1816(1):57-66.

Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. **J Clin Endocrinol Metab.** 1990 Dec;71(6):1427-33.

Honegger J, Prettin C, Feuerhake F, Petrick M, Schulte-Monting J, Reincke M. Expression of Ki-67 antigen in nonfunctioning pituitary adenomas: correlation with growth velocity and invasiveness. **J Neurosurg.** 2003 Oct;99(4):674-9.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem.** 1981 Apr;29(4):577-80.

Huang EH, Heidt DG, Li CW, Simeone DM. Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor progression and therapeutic resistance. **Surgery.** 2007 Apr;141(4):415-9.

Huh JW, Kim HR, Kim YJ, Lee JH, Park YS, Cho SH *et al.* Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: association with prognosis. **Pathol Int.** 2009 Apr;59(4):241-6.

Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. **N Engl J Med.** 2006 Sep 21;355(12):1253-61.

Kent S, Hutchinson J, Balboni A, Decastro A, Cherukuri P, Drenzo J. DeltaNp63alpha promotes cellular quiescence via induction and activation of Notch3. **Cell Cycle.** 2011 Sep 15;10(18):3111-8.

Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. **Cell.** 2008 Feb 22;132(4):583-97.

Koster MI, Dai D, Marinari B, Sano Y, Costanzo A, Karin M *et al.* p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2007 Feb 27;104(9):3255-60.

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

- Krylyshkina O, Chen J, Mebis L, Deneff C, Vankelecom H. Nestin-immunoreactive cells in rat pituitary are neither hormonal nor typical folliculo-stellate cells. **Endocrinology**. 2005 May;146(5):2376-87.
- Landolt AM, Shibata T, Kleihues P. Growth rate of human pituitary adenomas. **J Neurosurg**. 1987 Dec;67(6):803-6.
- Lazzari C, Prodosmo A, Siepi F, Rinaldo C, Galli F, Gentileschi M *et al*. HIPK2 phosphorylates DeltaNp63alpha and promotes its degradation in response to DNA damage. **Oncogene**. 2011 Dec 1;30(48):4802-13.
- Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K *et al*. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. **Oncogene**. 2012 Mar 15;31(11):1354-65.
- Levy A. Pituitary disease: presentation, diagnosis, and management. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2004 Sep;75 Suppl 3(III):47-52.
- Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. **Science**. 2010 Jan 29;327(5965):542-5.
- Little NA, Jochemsen AG. p63. **Int J Biochem Cell Biol**. 2002 Jan;34(1):6-9.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. **Methods**. 2001 Dec;25(4):402-8.
- Lloyd RV, Hardin H, Montemayor-Garcia C, Rotondo F, Syro LV, Horvath E *et al*. Stem cells and cancer stem-like cells in endocrine tissues. **Endocr Pathol**. 2013 Mar;24(1):1-10.
- Lobry C, Oh P, Mansour MR, Look AT, Aifantis I. Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. **Blood**. 2014 Apr 17;123(16):2451-9.
- Lu R, Gao H, Wang H, Cao L, Bai J, Zhang Y. Overexpression of the Notch3 receptor and its ligand Jagged1 in human clinically non-functioning pituitary adenomas. **Oncol Lett**. 2013 Mar;5(3):845-851.
- Ma L, Chen ZM, Li XY, Wang XJ, Shou JX, Fu XD. Nucleostemin and ASP2 expression is correlated with pituitary adenoma proliferation. **Oncol Lett**. 2013 Nov;6(5):1313-1318.
- 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).
- Mahta A, Haghpanah V, Lashkari A, Heshmat R, Larijani B, Tavangar SM. Non-functioning pituitary adenoma: immunohistochemical analysis of 85 cases. **Folia Neuropathol**. 2007 45(2):72-7.

Mayer S, Zur Hausen A, Watermann DO, Stamm S, Jager M, Gitsch G *et al.* Increased soluble CD44 concentrations are associated with larger tumor size and lymph node metastasis in breast cancer patients. **J Cancer Res Clin Oncol.** 2008 Nov;134(11):1229-35.

Medema JP, Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. **Nature.** 2011 Jun 16;474(7351):318-26.

Melino G. p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. **Cell Death Differ.** 2011 Sep;18(9):1487-99.

Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. **J Clin Invest.** 2003 Dec;112(11):1603-18.

Mezzomo LC, Gonzales PH, Pesce FG, Kretzmann Filho N, Ferreira NP, Oliveira MC *et al.* Expression of cell growth negative regulators MEG3 and GADD45gamma is lost in most sporadic human pituitary adenomas. **Pituitary.** 2011 Aug 18;

Miao Z, Miao Y, Lin Y, Lu X. Overexpression of the Notch3 receptor in non-functioning pituitary tumours. **J Clin Neurosci.** 2012 Jan;19(1):107-10.

Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. **Mol Cancer Res.** 2004 Jul;2(7):371-86.

Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. **Science.** 2006 Mar 31;311(5769):1880-5.

Moore N, Lyle S. Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. **J Oncol.** 2011 2011(

Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. **Cell.** 2008 Feb 22;132(4):661-80.

Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. **Adv Cancer Res.** 1997 71(241-319).

Nassiri F, Cusimano M, Zuccato JA, Mohammed S, Rotondo F, Horvath E *et al.* Pituitary stem cells: candidates and implications. **Pituitary.** 2013 Sep;16(3):413-8.

Nekulova M, Holcakova J, Coates P, Vojtesek B. The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells. **Cell Mol Biol Lett.** 2011 Jun;16(2):296-327.

Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. **Nat Rev Cancer.** 2012 Feb;12(2):133-43.

Nolan LA, Levy A. The trophic effects of oestrogen on male rat anterior pituitary lactotrophs. **J Neuroendocrinol.** 2009 May;21(5):457-64.

Oliveira MC, Marroni CP, Pizarro CB, Pereira-Lima JF, Barbosa-Coutinho LM, Ferreira NP. Expression of p53 protein in pituitary adenomas. **Braz J Med Biol Res**. 2002 May;35(5):561-5.

Orciani M, Davis S, Appolloni G, Lazzarini R, Mattioli-Belmonte M, Ricciuti RA *et al*. Isolation and characterization of progenitor mesenchymal cells in human pituitary tumors. **Cancer Gene Ther**. 2015 Jan;22(1):9-16.

Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C *et al*. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. **Neuro Oncol**. 2015 Oct;17 Suppl 4(IV1-IV62).

Paek KI, Kim SH, Song SH, Choi SW, Koh HS, Youm JY *et al*. Clinical significance of Ki-67 labeling index in pituitary macroadenoma. **J Korean Med Sci**. 2005 Jun;20(3):489-94.

Patel S, George R, Autore F, Fraternali F, Ladbury JE, Nikolova PV. Molecular interactions of ASPP1 and ASPP2 with the p53 protein family and the apoptotic promoters PUMA and Bax. **Nucleic Acids Res**. 2008 Sep;36(16):5139-51.

Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S *et al*. p63 identifies keratinocyte stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001 Mar 13;98(6):3156-61.

Perez-Millan MI, Berner SI, Luque GM, De Bonis C, Sevlever G, Becu-Villalobos D *et al*. Enhanced nestin expression and small blood vessels in human pituitary adenomas. **Pituitary**. 2013 Sep;16(3):303-10.

Pignon JC, Grisanzio C, Geng Y, Song J, Shivdasani RA, Signoretti S. p63-expressing cells are the stem cells of developing prostate, bladder, and colorectal epithelia. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2013 May 14;110(20):8105-10.

Pizarro CB, Oliveira MC, Coutinho LB, Ferreira NP. Measurement of Ki-67 antigen in 159 pituitary adenomas using the MIB-1 monoclonal antibody. **Braz J Med Biol Res**. 2004 Feb;37(2):235-43.

Pizarro CB, Oliveira MC, Pereira-Lima JF, Leaes CG, Kramer CK, Schuch T *et al*. Evaluation of angiogenesis in 77 pituitary adenomas using endoglin as a marker. **Neuropathology**. 2009 Feb;29(1):40-4.

Prevedello DM, Jagannathan J, Jane JA, Jr., Lopes MB, Laws ER, Jr. Relevance of high Ki-67 in pituitary adenomas. Case report and review of the literature. **Neurosurg Focus**. 2005 Nov;19(5):E11.

Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J *et al*. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. **Cancer Res**. 2005 Mar 15;65(6):2353-63.

Ramsey MR, Wilson C, Ory B, Rothenberg SM, Faquin W, Mills AA *et al.* FGFR2 signaling underlies p63 oncogenic function in squamous cell carcinoma. **J Clin Invest.** 2013 Aug;123(8):3525-38.

Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. **Nature.** 2006 Jun 29;441(7097):1080-6.

Ratovitski EA, Patturajan M, Hibi K, Trink B, Yamaguchi K, Sidransky D. p53 associates with and targets Delta Np63 into a protein degradation pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001 Feb 13;98(4):1817-22.

Restivo G, Nguyen BC, Dziunycz P, Ristorcelli E, Ryan RJ, Ozuysal OY *et al.* IRF6 is a mediator of Notch pro-differentiation and tumour suppressive function in keratinocytes. **EMBO J.** 2011 Nov 16;30(22):4571-85.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature.** 2001 Nov 1;414(6859):105-11.

Ricci-Vitiani L, Fabrizi E, Palio E, De Maria R. Colon cancer stem cells. **J Mol Med (Berl).** 2009 Nov;87(11):1097-104.

Rinkevich Y, Lindau P, Ueno H, Longaker MT, Weissman IL. Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip. **Nature.** 2011 Aug 25;476(7361):409-13.

Rizzoti K. Adult pituitary progenitors/stem cells: from in vitro characterization to in vivo function. **Eur J Neurosci.** 2010 Dec;32(12):2053-62.

Romano RA, Smalley K, Magraw C, Serna VA, Kurita T, Raghavan S *et al.* DeltaNp63 knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation. **Development.** 2012 Feb;139(4):772-82.

Rotondo F, Kovacs K, Horvath E, Bell CD, Lloyd RV, Scheithauer BW. Immunohistochemical expression of nestin in the non-tumorous hypophysis and in pituitary neoplasms. **Acta Neuropathol.** 2006 Mar;111(3):272-7.

Saeger W, Honegger J, Theodoropoulou M, Knappe UJ, Schofl C, Petersenn S *et al.* Clinical Impact of the Current WHO Classification of Pituitary Adenomas. **Endocr Pathol.** 2016 Jun;27(2):104-14.

Salehi F, Kovacs K, Cusimano MD, Horvath E, Bell CD, Rotondo F *et al.* Immunohistochemical expression of nestin in adenohypophysial vessels during development of pituitary infarction. **J Neurosurg.** 2008 Jan;108(1):118-23.

Santagata S, Demichelis F, Riva A, Varambally S, Hofer MD, Kutok JL *et al.* JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence. **Cancer Res.** 2004 Oct 1;64(19):6854-7.

Sasaki Y, Ishida S, Morimoto I, Yamashita T, Kojima T, Kihara C *et al.* The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway. **J Biol Chem.** 2002 Jan 4;277(1):719-24.

Schreiber S, Saeger W, Ludecke DK. Proliferation markers in different types of clinically non-secreting pituitary adenomas. **Pituitary.** 1999 May;11(3-4):213-20.

Senoo M, Pinto F, Crum CP, McKeon F. p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. **Cell.** 2007 May 4;129(3):523-36.

Sergeant G, Vankelecom H, Gremeaux L, Topal B. Role of cancer stem cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Nat Rev Clin Oncol.** 2009 Oct;6(10):580-6.

Simon RA, Di Sant'agnese PA, Huang LS, Xu H, Yao JL, Yang Q *et al.* CD44 expression is a feature of prostatic small cell carcinoma and distinguishes it from its mimickers. **Hum Pathol.** 2009 Feb;40(2):252-8.

Simons BD, Clevers H. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. **Cell.** 2011 Jun 10;145(6):851-62.

Slack JM. Origin of stem cells in organogenesis. **Science.** 2008 Dec 5;322(5907):1498-501.

Stahl JH, Kendall SK, Brinkmeier ML, Greco TL, Watkins-Chow DE, Campos-Barros A *et al.* Thyroid hormone is essential for pituitary somatotropes and lactotropes. **Endocrinology.** 1999 Apr;140(4):1884-92.

Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A, Esche H, Putzer BM. Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. **Cancer Res.** 2002 Jul 1;62(13):3598-602.

Su X, Chakravarti D, Flores ER. p63 steps into the limelight: crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis. **Nat Rev Cancer.** 2013 Feb;13(2):136-43.

Su X, Paris M, Gi YJ, Tsai KY, Cho MS, Lin YL *et al.* TAp63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance. **Cell Stem Cell.** 2009 Jul 2;5(1):64-75.

Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. **Cell Res.** 2012 Mar;22(3):457-472.

Taniguchi Y, Yasutaka S, Kominami R, Shinohara H. Proliferation and differentiation of pituitary somatotrophs and mammatrophs during late fetal and postnatal periods. **Anat Embryol (Berl).** 2001a Dec;204(6):469-75.

_____. Proliferation and differentiation of thyrotrophs in the pars distalis of the rat pituitary gland during the fetal and postnatal period. **Anat Embryol (Berl).** 2001b Apr;203(4):249-53.

Tichomirowa MA, Daly AF, Beckers A. Familial pituitary adenomas. **J Intern Med.** 2009 Jul;266(1):5-18.

Trink B, Okami K, Wu L, Sriuranpong V, Jen J, Sidransky D. A new human p53 homologue. **Nat Med.** 1998 Jul;4(7):747-8.

Vankelecom H. Non-hormonal cell types in the pituitary candidating for stem cell. **Semin Cell Dev Biol.** 2007a Aug;18(4):559-70.

_____. Pituitary stem cells drop their mask. **Curr Stem Cell Res Ther.** 2012 Jan;7(1):36-71.

_____. Stem cells in the postnatal pituitary? **Neuroendocrinology.** 2007b 85(2):110-30.

Vankelecom H, Chen J. Pituitary stem cells: where do we stand? **Mol Cell Endocrinol.** 2014 Mar 25;385(1-2):2-17.

Vidal S, Horvath E, Kovacs K, Cohen SM, Lloyd RV, Scheithauer BW. Transdifferentiation of somatotrophs to thyrotrophs in the pituitary of patients with protracted primary hypothyroidism. **Virchows Arch.** 2000 Jan;436(1):43-51.

Visvader JE. Cells of origin in cancer. **Nature.** 2011 Jan 20;469(7330):314-22.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nat Rev Cancer.** 2008 Oct;8(10):755-68.

Wallach-Dayana SB, Rubinstein AM, Hand C, Breuer R, Naor D. DNA vaccination with CD44 variant isoform reduces mammary tumor local growth and lung metastasis. **Mol Cancer Ther.** 2008 Jun;7(6):1615-23.

Ward RD, Stone BM, Raetzman LT, Camper SA. Cell proliferation and vascularization in mouse models of pituitary hormone deficiency. **Mol Endocrinol.** 2006 Jun;20(6):1378-90.

Willems C, Vankelecom H. Pituitary cell differentiation from stem cells and other cells: toward restorative therapy for hypopituitarism? **Regen Med.** 2014 9(4):513-34.

Wu G, Nomoto S, Hoque MO, Dracheva T, Osada M, Lee CC *et al.* DeltaNp63alpha and TAp63alpha regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development. **Cancer Res.** 2003 May 15;63(10):2351-7.

Xing B, Kong YG, Yao Y, Lian W, Wang RZ, Ren ZY. Study on the expression levels of CXCR4, CXCL12, CD44, and CD147 and their potential correlation with invasive behaviors of pituitary adenomas. **Biomed Environ Sci.** 2013 Jul;26(7):592-8.

Xu Q, Yuan X, Tunici P, Liu G, Fan X, Xu M *et al.* Isolation of tumour stem-like cells from benign tumours. **Br J Cancer.** 2009 Jul 21;101(2):303-11.

Yalcin-Ozuysal O, Fiche M, Guitierrez M, Wagner KU, Raffoul W, Briskin C. Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. **Cell Death Differ**. 2010 Oct;17(10):1600-12.

Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V *et al*. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. **Mol Cell**. 1998 Sep;2(3):305-16.

Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT *et al*. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. **Nature**. 1999 Apr 22;398(6729):714-8.

Yavropoulou MP, Maladaki A, Yovos JG. The role of Notch and Hedgehog signaling pathways in pituitary development and pathogenesis of pituitary adenomas. **Hormones (Athens)**. 2015 Jan-Mar;14(1):5-18.

Yoshida S, Kato T, Higuchi M, Yako H, Chen M, Kanno N *et al*. Rapid transition of NESTIN-expressing dividing cells from PROP1-positive to PIT1-positive advances prenatal pituitary development. **J Neuroendocrinol**. 2013 Sep;25(9):779-91.

Yoshimura F, Harumiya K, Ishikawa H, Otsuka Y. Differentiation of isolated chromophobes into acidophils or basophils when transplanted into the hypophysiotrophic area of hypothalamus. **Endocrinol Jpn**. 1969 Oct;16(5):531-40.

Yu X, Lin Y, Yan X, Tian Q, Li L, Lin EH. CD133, Stem Cells, and Cancer Stem Cells: Myth or Reality? **Curr Colorectal Cancer Rep**. 2011 Dec;7(4):253-259.

Yugawa T, Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Haga K, Ohno S, Egawa N *et al*. DeltaNp63alpha repression of the Notch1 gene supports the proliferative capacity of normal human keratinocytes and cervical cancer cells. **Cancer Res**. 2010 May 15;70(10):4034-44.

Yunoue S, Arita K, Kawano H, Uchida H, Tokimura H, Hirano H. Identification of CD133+ cells in pituitary adenomas. **Neuroendocrinology**. 2011 94(4):302-12.

Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1995 Jul 3;92(14):6414-8.

Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M *et al*. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. **J Exp Med**. 2002 Sep 16;196(6):765-80.

Zhou W, Ma CX, Xing YZ, Yan ZY. Identification of candidate target genes of pituitary adenomas based on the DNA microarray. **Mol Med Rep**. 2016 Mar;13(3):2182-6.

Zhu L, Gibson P, Currie DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT *et al*. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. **Nature**. 2009 Jan 29;457(7229):603-7.

Zoller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? **Nat Rev Cancer**. 2011 Apr;11(4):254-67.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a expressão quantitativa de marcadores de células troco tumorais em adenomas hipofisários e o papel do p63 na manutenção da proliferação celular.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão proteica dos marcadores CD44, Nestina e p63
- Verificar a proliferação celular através da expressão proteica do KI-67
- Avaliar a expressão gênica do *TP63* em adenomas hipofisários e de seus ligantes Notch3 e Jagged1
- Avaliar a expressão das isoformas do gene *TP63* (TA e Δ N) nos adenomas hipofisários
- Correlacionar a expressão dos marcadores Nestina, CD44, p63, KI-67 em adenomas hipofisários, e associar ao subtipo tumoral.
- Estabelecer correlações clínico-patológicas e a expressão destes marcadores (queixas pré-operatórias, idade, sexo e tamanho tumoral)

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS REDIGIDOS EM INGLÊS

Artigo científico 1: Antagonistic mRNA relative expression among TAp63 and Δ Np63 isoforms and Notch3/Jagged1 pathway in human pituitary adenomas.

Artigo científico 2: Immunohistochemical Expression of Stem Cell Markers CD44, Nestin and p63 in pituitary adenomas.

3.1. Artigo científico 1

ORIGINAL PAPER

Paper submitted to: Endocrine Pathology

Antagonistic mRNA relative expression among TAp63 and Δ Np63 isoforms and Notch3/Jagged1 pathway in human pituitary adenomas.

Lisiane Cervieri Mezzomo^{1,2}, Frederico Giacomoni Pesce^{1,2}, Taiana Haag^{1,2}, Josenel Marçal¹, Nelson Pires Ferreira³, Julia Pereira Lima^{1,3}, Carolina Leães³, Miriam Costa Oliveira^{1,3}, Maria Beatriz da Fonte Kohek¹.

¹Post Graduation Program of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre - RS. Brazil.

²Laboratory of Molecular Biology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre - RS. Brazil.

³Neuroendocrinology Center of Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence and requests for reprint should be addressed to:

Prof Dra. Maria Beatriz da Fonte Kohek. Post Graduation Program of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS CEP90050-170. Brazil.

Phone: +55 5193800906/ Fax: +55 5133038794; 33038796 /+555133038843

E-mail address: kohek@ufcspa.edu.br

ABSTRACT

Background: Despite recent advances in molecular genetics, the pituitary adenomas initiation, development, progress and the molecular basis of their unique features are still poorly understood. In this sense, it is proposed that stem cell could be involved in pituitary adenoma tumorigenesis. It is suggested that *TP63* has important functions in stem cells, and it may have an interplay of *TP63* and Notch and its ligand Jagged in this process.

Objective: This study aimed to evaluate the distinct expression of *TP63* isoforms (TAp63 and Δ Np63), as well as its correlation with Notch3 receptor and its ligand Jagged1 in human pituitary adenomas at the mRNA level.

Materials and methods: We included 77 pituitary adenoma tumor samples from patients who underwent surgical resection. The expression levels of *TP63* isoforms (TAp63 and Δ Np63), Notch3 and its ligand Jagged1 were evaluated by qRT-PCR using isoform-specific primers. We also evaluate proliferation index immunohistochemically using KI-67 antibody. The expression levels were associated with clinical outcomes.

Results: In summary, we found that mRNA expression of both *TP63* isoforms decreased in pituitary adenomas compared with normal pituitary control. On the other hand, there was an increasing of relative Notch3 and Jagged1 mRNA expression in the majority of examined samples. The mRNA expression of tree gene evaluated was correlated positively and statistically significantly. There was no significant association between gene expression and the analyzed clinical data.

Conclusion: The current study has provided the first time evidence that TA and Δ Np63 isoforms are underexpressed in most pituitary adenomas. These results are correlated with Notch3 and its ligand Jagged1 overexpression, corroborating previous studies pointing its antagonistic interactions.

Key words: Pituitary adenoma; immunohistochemistry; stem cell; stem cells markers; tumor suppressor.

INTRODUCTION

Human pituitary adenomas are tumors that occur in the pituitary gland and represent 10 – 15% of intracranial neoplasms[1]. These tumors are often considered benign and non-metastatic, but they are associated with significant morbidity due to local compressive effects on brain structure and cranial nerves, leading to headaches and visual disturbances. Morbidity can also result from tumor-derived hormonal hypersecretion or following treatment that inadvertently damages adjacent normal pituitary-hormone secretion[2]. Despite recent advances in molecular genetics, the pituitary adenomas development, progress and the molecular basis of their unique features are poorly understood. In this sense, we still do not understand the pathogenesis of the majority of pituitary adenomas or why, once formed, their behavior tend to be so benign.

The *TP63* gene shows remarkable structural similarity to the *TP53* and *TP73* genes. Because of two promoters, *TP63* gene generates two types of protein isoforms: TAp63 and Δ Np63. In addition, each type yields three isotypes (α , β , γ) because of differential splicing of the *TP63* COOH terminus. In general, the TAp63 isotypes might behave like *TP53* because they transactivate various *TP53* downstream targets, induce apoptosis, and mediate cell cycle control. However, the Δ Np63 isotypes have displayed opposing functions of TAp63, including acting as oncoproteins[3]. Despite this obvious importance of *TP63*, there are no studies published focusing on its expression in pituitary adenomas. Furthermore, it was suggested that *TP63* has important functions in stem cells. So, its exact roles in these processes, and in particular in pituitary tumorigenesis, are largely unknown and still need more clarification. Altered levels of *TP63* were demonstrated in different epithelial tumors, such as in breast, head, neck and lung by the use of targeted detection techniques, such as PCR (Polimerase chain reaction) or by using antibodies, which could not discriminate among TAP63 and Δ Np63, sometimes giving controversial results[4].

Thus, it is suggested that there is a functional interplay of *TP63* and Notch3 signaling in pituitary adenomas, since Notch pathway also demonstrates to play an important role in embryonic pituitary development and its renewal and fate decisions of putative stem/progenitor cell function[5]. In this sense, the expression of the Notch signaling component in postnatal stem cells has been shown previously[6,7,8]. It was

described that Notch signaling system is significantly expressed in the adult pituitary, and cells expressing the Notch pathway genes accumulate predominantly in side population[7], which correlates with the localization of adult pituitary progenitors[8]. Previous studies have demonstrated that Notch3 pathway has an important role in the progression of non-functioning pituitary adenomas, since Notch3 mRNA is significantly upregulated in these subtype of pituitary adenomas[9]. These data was further corroborated by another study that showed the upregulation of Notch3 and its ligand Jagged1 in human non-functioning pituitary adenomas, but not in hormone-secreting adenomas. Furthermore, Notch3 was positively correlated with Jagged1 at the mRNA and protein levels[10]. These data can indicate that Notch3 and Jagged1 may play an important role in the initiation and proliferation of human non-functioning adenomas, and there may be an interaction between Notch3 and Jagged1 in this process.

The antagonistic relation between *TP63* and Notch pathways was demonstrated earlier[11]. Sasaki and cols[12] were the first to show the physical and functional involvement of *TP63* in the Notch/Jagged signaling pathways. These authors described that *TP63* can trigger the Notch signal pathway in the neighboring cells and, therefore, raise the possibility that the members of the *TP53* family play a role in normal development through modulating Notch signal pathway. At the same time, two Notch ligands, Jagged1 e Jagged2, were identified as upregulated by TAp63, while Δ Np63 down-regulates Jagged2[13].

In order to understand better the targets of the *TP63* gene transcriptional regulation, Notch3 and its ligand Jagged1, and the functional differences between the TA and Δ Np63 isoforms and its relation in pituitary tumorigenesis, we have performed a relative expression by qRT-PCR technique. Our results provide the first description of the differential expression of *TP63* isoforms and its correlation with Notch3 and its ligand Jagged1 in pituitary adenomas.

MATERIALS AND METHODS

1. Human pituitary tumor specimens

One hundred forty (140) patients with pituitary adenomas, based on clinical evaluation, biochemical workup and radiological findings, who underwent transphenoidal pituitary tumor resection at the Department of Neuroendocrinology,

São José Hospital, Santa Casa de Misericórdia, in Porto Alegre, were enrolled in the present study. Due to RNA preservation, after surgery, each sample was immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C until analysis. All patients were negative for pituitary tumors within their family and therefore considered as sporadic. Data regarding age, gender, tumor size, presentation and clinical data before the surgery were obtained from the clinical charts. Written informed consent was obtained from all patients and the study was approved by local ethics committees and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

2. Pathology samples and immunohistochemistry

Pathology samples included resection specimens. Histopathological diagnosis was performed by the current neuropathologists in the Department of Pathology, in accordance to the World Health Organization (WHO) guidelines. Haematoxylin and eosin-stained slides (HE) were available for all cases to confirm the presence of tumors. The HE slides were used to guide sampling of the tissue of interest. Each adenoma was immunohistochemically stained for six pituitary hormones (GH, PRL, ACTH, FSH, LH and TSH) using commercial antibodies. Immunohistochemical analysis was performed using chromogranin A antibody for all cases, in order to characterize the pituitary tissue. The aim of the immunohistochemical and ultrastructural investigation was to accurately classify the neoplasms and reveal their hormone content and apparent endocrine activity. Both methods were employed for routine diagnostic purposes; thus, these results will not be described in detail. We also performed immunohistochemistry for KI-67 antibody to evaluate proliferation index status (clone MIB-1, dilution 1:100, Dako).

3. Data processing

Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from frozen pituitary adenomas using Trizol reagent (Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS) as previously described[14]. All samples and a commercially available RNA/cDNA pool of 88 normal human pituitary glands (Clontech Laboratories, Inc) were reversely transcribed using the RT System from Promega Corp (Madison, WI) according to the manufacturer's protocol. The final volume of each reaction was $20\mu\text{L}$.

Nucleic acid quantification was carried out using spectrophotometry (BioSpec-Nano; Shimadzu Corp.; Kyoto, Japan) at 260nm and the concentrations and purity ratios were recorded. Newly prepared cDNA was subjected to quality assessment before qRT-PCR analysis. The sample concentration was normalized to obtain a total quantity of cDNA from each sample. Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) was used as endogenous control to perform normalization. PGK1 was amplified by qRT-PCR for each sample and also for each RT-negative control, with the same specified conditions for gene analysis. A cycle threshold (C_T) of <40 was classified as showing good quality cDNA.

The PCR products were run in a 3% agarose gel (Lonza, Rockland, ME, USA). Only well definite bands were regarded as evidence of positivity (data not shown). We performed a standard curve of different dilutions for all primers used in this study. Two primers (*TAp63* and $\Delta Np63$) were designed to recognize the two N-terminal isoform (ΔN and TA). Positive controls tested on human breast adenocarcinoma cells (MCF7 cell line) and human prostate tissues (prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia), as previously reported[15,16,17] for the primers of *TP63* isoforms, were available to verify if the primers were effective at amplifying the target isoforms of *TP63* when some were never detected (data not shown).

Pituitary mRNA expression by qRT-PCR

The qRT-PCR reactions were performed using Power SYBR Green[®] (Applied Biosystems, Foster City, US). As an endogenous control, the reference gene PGK1 was amplified to normalize results and allow relative quantitative analysis of *TP63*, *Notch3* and *Jagged1* gene expression (Table 1 shows the sequence of the primers used in real-time PCR). cDNA obtained from a pool of 88 normal pituitary glands was used as a calibrator. Samples without cDNA were used as a negative control. After amplification, melting curves were acquired. Direct detection of PCR products was monitored by measuring the fluorescence produced by SYBR Green[®] and these measurements were then plotted against cycle numbers. The reactions were performed, at least, in duplicate using a PCR thermocycler (Step One Plus[™] Real Time PCR System; Applied Biosystems). In this method, results were obtained by the number of PCR cycles necessary to achieve the initial level of fluorescence emission, with values expressed as threshold cycle (C_T). In this sense, the parameter C_T was

defined as the cycle number when the first increase above the threshold in fluorescence was detected.

Data were converted to normalize expression ratios using the Applied Biosystem recommended method ($2^{-\Delta\Delta CT}$). cDNA relative expression (normalized concentration of target gene in relation to the reference gene) was given by the formula: $2^{-\Delta\Delta CT}$, where $\Delta\Delta CT = (C_T \text{ target gene} - C_T \text{ PGK1 gene in samples}) - (C_T \text{ normal pituitary target gene} - \text{PGK1 normal pituitary gland pool})$.

Data from tumor tissues are expressed equal to 1 (reference level). The expression values for the genes of interest are reported as the mean \pm standard deviation (SD).

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using SPSS software package (version 21.0; SPSS Inc., IBM Company, Chicago, IL, USA) and GraphPad prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Quantitative variables were described as mean \pm standard deviation (SD), or medians, according to their distribution. Normality test Shapiro-Wilk was performed to determine distribution of the data. Nonparametric tests were employed since the distribution of the genes expression data was not normal. To detect the correlations between the continuous variables, the Spearman's rank correlation test and Mann-Whitney's U test were applied, and for qualitative variables, Chi-square and Fisher exact tests were used. When P was less than 0.05, the differences were considered as being statistically significant.

RESULTS

1. RNA and cDNA quantification and quality

Quantification (absorbance at 260nm), purity (260/280 and 260/230nm) and integrity (sighting shot experiment) for each sample were made. RNA purity is poorer in those samples with lower quantity. However, once reverse transcribed to cDNA, the purity of the samples was improved.

After optimization and validation of the primers, a standard curve plate was also included in the trial and consisted of variable concentrations of two samples. In the sequence, its amplification efficiency and R^2 values were calculated. An optimized qRT-PCR assay should have an efficiency of between 90 and 105% and an

R^2 of >0.98 . Absolute quantification was used in this calculation (data not shown). The final cDNA concentration used in all experiments was 150ng/ μ l.

Following these initial RNA and cDNA analyses, samples were used in large scale. As a C_T of <35 is traditionally thought of as optimal, samples that had a C_T of >35 were excluded of the study[18]. Data in triplicate were not obtained in all samples due to insufficient amount of sample in some cases. Duplicate PGK expression was then used as a measure of cDNA quality. A PGK $C_t < 40$ was taken as an index of cDNA quality. If no amplification was detectable within 40 cycles, it was assumed that there was insufficient starting material.

2. Clinical and pathological features:

Initial examination of qRT-PCR data for reference gene expression, plus the absence of clinical data and/or the insufficient amount of RNA for all gene expression analysis, showed that only 77 of the initial 140 pituitary adenomas could be included. Of these, there were 41 (53.2%) male and 36 (46.8%) female patients. The age at the initial diagnosis ranged from 23 to 79 years old, and the average age of the included patients was 53.74 ± 13.41 (mean \pm SD) years old. In non-functioning pituitary adenomas (NFPAs), it was 57.62 ± 11.36 years old, while in functioning pituitary adenomas (FPAs) it was 45.68 ± 13.98 years old, and its difference was statistically significant ($P < 0.05$).

The spectrum of adenomas studied was presented as follows: 52 (67.5%) NFPAs, while 25 (32.5%) were classified as FPAs. Of these, 13 (16.9%) were GH-producing, 8 (10.4%) ACTH-producing and 4 (5.2%) PRL-producing. Significant association ($P = 0.001$) between tumor size and tumor subtype was found. All microadenomas (≤ 1 cm; $n = 2$) were ACTH-secreting, while all other adenomas subtypes were classified as macroadenomas (≥ 1 cm; $n = 75$). There was no statistically significant difference in relation to gender ($P = 0.170$) between NFPAs and FPAs. These data are shown in table 2.

The immunohistochemical analysis for all tumors showed that 23 (44%) NFPAs were not positive with anterior hormone immunohistochemistry and were designed immunohistochemically negative tumors (NFPAs⁻). IHC available also revealed that almost 13 (25%) of their tumors stained for gonadotropins or their subunits. Concerning clinical data before surgery, headache and visual defects were the main symptoms in NFPAs.

1. qRT-PCR analysis

There was a positive expression of constitutive gene in all samples included, and in a pool of normal human pituitary gland. The quantified relative gene expression in the pool of normal pituitary tissue received the arbitrary value of 1.0. Overall, when we compared the tested samples with the pool of normal pituitary tissue mRNA, examined samples showed some loss of both *TP63* isoforms mRNA relative expression, while *Notch3* and *Jagged1* were overexpressed in almost all pituitary adenomas (Table 3). No significant association was found between gene expression and clinical data.

***TP63* isoforms, TAp63 and Δ Np63 expression status**

We evaluated *TP63* isoforms, TAp63 and Δ Np63 mRNA expression status by qRT-PCR analysis in 77 human pituitary adenomas and in a pool of normal pituitary glands. Both isoforms mRNA expression decreased in almost all pituitary adenomas compared with normal pituitary control, with a median of gene relative expression of 0.017 for both genes. The same was observed in ACTH-secreting and GH-secreting, but not in PRL-secreting adenomas, where Δ Np63 and TAp63 isoforms had increased of relative expression compared to normal pituitary pool. Considering all 77 adenomas analyzed, just one GH-secreting expressed TAp63 isotype. It appeared in a 39 year old female patient with a functioning macroadenoma, GH-secreting, with immunopositivity just for GH hormone. Non-functioning pituitary adenomas have decreased of relative expression in both isoforms. We observed that 15.09% (8 of 53 non-functioning samples) expressed Δ Np63, while no expression of TAp63 was detected in any sample. There was no statistical significant difference between these groups (TAp63 P=0.324; Δ Np63 P=0.097). These data are shown in Figure 1 (a and b) and Table 3.

Notch3 and its ligand Jagged1 expression levels are upregulated in human pituitary adenomas

We also determined *Notch3* mRNA expression status in the same samples, as described above. Overall *Notch3* transcript is increased in almost all adenomas subtypes (median 13.00 fold). In a subset of 77 adenomas included, 65 (84.41%)

expressed Notch3 levels. Additionally, non-functioning adenomas demonstrated increased expression of Notch3 in 91.50% (or 45 of 53 samples) as well in functioning adenomas, in which we found the presence of the transcript in 20 of 24 samples (or 91.66%). However, this data was not statistically significant ($P=0.291$). We also did not find statistical significance between Notch3 expression and functioning adenomas subtypes ($P=0.366$) (Figure 1c and Table 3).

Jagged1 mRNA expression was also markedly increased in pituitary adenomas compared with normal pituitary control (median 12.22 fold). Detectable *Jagged1* relative expression was found in 66 of 77 samples (85.71%). As the same as Notch3, qRT-PCR showed that *Jagged1* was also prominently detectable in functioning adenomas with 91.66% (20 of 24 samples) of positivity. Non-functioning pituitary adenomas showed the presence of *Jagged1* transcript in 46 of 53 or 91.32% of the samples examined. There was no significant difference between functioning and non-functioning pituitary adenomas ($P=0.602$) or between non-functioning adenomas subtypes group ($P=0.394$) and *Jagged1* mRNA expression. The presence of PGK1 amplicon confirmed the integrity in all samples examined. These data are shown in Figure 1d and Table 3.

Correlation between *TP63*, Notch3 and *Jagged1* mRNA expression levels

The expression of Notch3 mRNA was positively correlated with *Jagged1* mRNA expression with a Spearman's correlation coefficient of 0.592 ($P<0.001$). Similarly, a positive correlation was observed between the expression of *p63* isoforms and Notch3 (TAp63 and Notch3 $r_s=0.367$ $P=0.001$; Δ Np63 and Notch3 $r_s=0.422$ $P<0.001$) as the same as *Jagged1* (TAp63 and *Jagged1* $r_s=0.339$ $P=0.003$; Δ Np63 and *Jagged1* $r_s=0.544$ $P<0.001$) with a Spearman's correlation test.

2. Pituitary adenomas displayed low proliferative capacity

Due to the absence of paraffin blocks available for all cases, we could perform KI-67 analysis in 60 of 77 adenomas studied. The proliferative labeling index (positivity for Ki-67) ranged from 1-10% of positive nuclei in different cases. Median of KI-67 expression in all adenomas subtypes was detailed in Table 3. Figure 2 shows immunopositivity for KI-67 in one pituitary adenoma sample.

DISCUSSION

In the present study, we have provided, to our knowledge, the first description of the distinct expression of *TP63* isoforms, as well as its correlation with Notch3 receptor and its ligand Jagged1 in various types of human pituitary adenomas at the mRNA level. We have shown that, in general, the expression pattern of *TP63* isoforms is lost in pituitary tumors, while Notch3 and its ligand Jagged1 gene expression are upregulated in these benign tumors.

p63 is well studied in malignant tumors, and to the best of our knowledge, it has never been mentioned in regard to pituitary adenomas. In the present study, TAp63 and ΔNp63 expression profiles were absent in respectively 76 and 63 samples of all 77 adenomas of different histological subtypes. Aberrant *p63* expression[19] has been reported in pre-cancerous conditions[20] and in many other cancers[21], such as in epithelial tumors[22], breast (specially ΔNp63 isoform)[23], bladder[24], head and neck[25], lung[26], prostate[16] and squamous cell cancer[27]. ΔNp63 overexpression in MCF7 breast cancer cell lines results in the increased cancer cell proliferation, clonogenicity, anchorage-independent growth, and more drug resistant, suggesting that ΔNp63 might serve as a tumor initiating transcription factor in breast cancer[17]. Nonetheless, in some aggressive metastatic epithelial tumors, the expression of ΔNp63 is reduced and often lost, suggesting potential roles as metastasis suppressor[19,28]. On the other hand, its suggested that TAp63 is downmodulated in various types of cancer[29], and this isoform can suppress metastasis via induction of some targets.

Therefore, in particular, these studies showed that the TA isoforms are not expressed or weakly expressed, whereas the ΔN isoforms are expressed at higher levels. The expression pattern showed by the different isoforms observed in cancer is consistent with the concept that TAp63 may function as tumor suppressor, while ΔNp63 may act as an oncogene, antagonizing *p53* and TAp63 and TAp73, by affecting the expression of those target genes, which are generally under their control[4,30]. Our results contrast, in part, the ones published focusing on differential expression of *TP63* isoforms in other tumors. We showed that two isoforms of *TP63* are under expressed in almost all pituitary tumors, except in PRL-secreting adenomas, in which both TAp63 and ΔNp63 was upregulated. So, unlike previous publications, we did not find antagonist expression between two *TP63* isoforms. According to previous publications, the same is observed with *TP53* gene in pituitary adenomas,

once most pituitary adenomas have lack of *TP53* expression[31]. Taken together, these data suggest that the expression of *p53* family members is absent in most pituitary adenomas. However, the role of *p73* gene in human pituitary adenomas has not yet been described and needs more clarification. In addition, the predictive importance of *p63* has been analyzed only in a limited number of studies and relatively little is known regarding the responsible mechanism for the distinct expressions of TA and DN isoforms in the different tissues and physio-pathological conditions. However, the potential differences affecting the functional roles of TAp63 and Δ Np63 isoform types make the possible contribution of these proteins a complex issue.

There are several pathways in which *p63* is involved. Interestingly, Ma and cols[32] recently demonstrated that *p63* activates Notch signaling through the stimulation of *Jagged1* gene expression. This study confirmed that Δ Np63 α could directly bind the Notch1 and activate the Notch pathway. These data suggest that *p63* functions as a selective modulator of Notch1-dependent transcription and function. Our results, regarding the Notch3 expression in pituitary adenomas, are in line with previous studies. They broaden them by providing evidence of Notch3 as upregulated in 84.41% of all pituitary adenomas analyzed, while both *TP63* isoforms are underexpressed. Our findings are in consonance with a model through antagonistic interaction of *p63* isoforms and Notch3. Overexpression of Notch3 had been observed in 16 human NFPAs in the study published by Miao and cols[9]. In this investigation, additional immunohistochemical analyses were performed, demonstrating that the Notch3 receptor is primarily expressed in the cytoplasm of the NFAs. Posteriorly, Lu and cols[10] used 17 pituitary tumor samples to describe that upregulated Notch3 was observed in humans NFPAs, but not in normal human pituitary gland or in hormone-secreting adenomas at neither the mRNA nor protein levels. These results suggest that Notch3 may play a significant role in the development of pituitary adenomas, particularly in NFPAs. However, the exact mechanism of Notch3 in pituitary tumorigenesis still needs to be elucidated.

This study confirms and expands previous investigations showing that Notch3 and its ligand *Jagged1* are upregulated in almost all pituitary adenomas. As the same as Notch3, *Jagged1* overexpression was found in 85.71% of all adenomas subtypes. Sasaki and cols[12] described that *Jagged1* gene is up-regulated by *p63*, suggesting an association between the *p53* family genes and Notch signaling. Beyond that, it was

suggested that *p63* and Notch pathway have important functions in stem cells, one hypothesis currently raised for pituitary tumorigenesis. Further work will also be required in order to understand the fascinating association of *p63* and Notch signaling pathways with quiescence and preservation of early stem/progenitor cells.

Additionally, this study showed no significant relationship between the tumor prevalence and the patients' gender, in agreement with previous publications[33]. Our data agreed with others published by Central Brain Tumor Registry of United States (CBTRUS)[1], pointing that these tumors are not common in children until 19 years old, representing 2% of all diagnosed brain tumors. In our work, the patients' ages ranged from 23 to 79 years old. Our data are corroborated by some publishing by CBTRUS, in which the incidence of these tumors is low until 55-65 years old, and increases progressively with age, with a highest incidence among 65-74 years old. Among the tumors in the FPAs group, 90.83% were classified as macroadenomas and 9,17% as microadenomas, whereas in the NFPAs group 100% of the tumors were macroadenomas. The ACTH-secreting adenomas presented statistically significant variance in tumor size compared with the other samples included in this study. These data are in agreement with previous publications[34] that show high frequency among corticotropinomas as microadenomas. In some cases, the small tumor size can even hamper its location through radiological exams. Careful immunohistochemical analysis of NFPAs reveals that a significant proportion of these tumors, in fact, synthesize pituitary hormones despite the absence of a clinically apparent endocrine hypersecretion syndrome. IHC available in a subset of our patients revealed that almost 25% of their tumors stained for gonadotropins or their subunits, whereas a little over 44% were categorized as null cell adenomas.

Study of human pituitary tissue is challenging due to several limitations, including the anatomic inaccessibility of the pituitary gland, small size of tumors, and unique differentiated tumor behaviors. The small sample of functioning adenomas subtype (specially PRL-secreting, due to randomly) and no samples of thyrotroph and gonadotroph tumors are also limitations of our study. It is due to rarity of these tumors subtype and the small size of these tumors in general, which can make it difficult to obtain workable amount of material in some cases. Limitations of our study also include the technical procedure, once mRNA extraction and conservation need carefully handling.

Pituitary adenomas are typically benign, slow-growing neoplasms, more often expansive as infiltrative in nature[2]. Thus, it is no surprise that adenomas demonstrated no oncogenic genes expression, as *TP63*, especially Δ Np63 isoform. Some studies, focusing on the individual cell analysis, as flow cytometry, will give more details about this gene expression. We suppose that contaminating benign tissue in “mixed tumor tissue samples” (a limitation of molecular biology technique, due to tumor margins) can confound the measurement of *TP63* gene expression, suggesting that the mixing *TP63* expression in benign tissue in those samples precludes the correct identification of *TP63* expressing tumor cells.

The origin of pituitary adenomas and molecular and cellular events involved in their initiation and maintenance are still understood incompletely. The current study analyzed 77 pituitary adenomas of different subtypes and has provided the first time evidence that TAp63 and Δ Np63 isoforms are underexpressed in most pituitary adenomas. These results are correlated with Notch3 and its ligand Jagged1 overexpression, confirming its antagonistic interactions. Because the relations of signaling pathways can occur at several levels, further studies are necessary to elucidate the relevance of its interacting signaling pathways in tumor initiation and progression.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Acknowledgments

We wish to thank Neuroendocrinology Center of Hospital São José, Irmandade Santa Casa de Misericórdia from Porto Alegre, Brazil, for providing the human pituitary tissues and the access to clinical data. We also thank the many young scientists who were involved in the early stage of this study. We are very grateful to Nupesc, UFCSPA, for helping with the statistical analysis. This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Ministry of Education - Brazil, and Post Graduation Program of Pathology - UFCSPA (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - Porto Alegre, Brazil).

REFERENCES

- 1 Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology* 17 Suppl 4: iv1-iv62, 2015.
- 2 Melmed S Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest* 112: 1603-1618, 2003.
- 3 Ratovitski EA, Patturajan M, Hibi K, Trink B, Yamaguchi K, Sidransky D p53 associates with and targets Delta Np63 into a protein degradation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1817-1822, 2001; Patturajan M, Nomoto S, Sommer M et al. DeltaNp63 induces beta-catenin nuclear accumulation and signaling. *Cancer cell* 1: 369-379, 2002.
- 4 Graziano V, De Laurenzi V Role of p63 in cancer development. *Biochim Biophys Acta* 1816: 57-66, 2011.
- 5 Zhu X, Zhang J, Tollkuhn J et al. Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. *Genes & development* 20: 2739-2753, 2006; Raetzman LT, Ross SA, Cook S, Dunwoodie SL, Camper SA, Thomas PQ Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: Prop1 deficiency affects Notch2 expression. *Developmental biology* 265: 329-340, 2004; Moreno CS, Evans CO, Zhan X, Okor M, Desiderio DM, Oyesiku NM Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer research* 65: 10214-10222, 2005.
- 6 Chen J, Hersmus N, Van Duppen V, Caesens P, Denef C, Vankelecom H The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology* 146: 3985-3998, 2005; Chen J, Gremeaux L, Fu Q, Liekens D, Van Laere S, Vankelecom H Pituitary progenitor cells tracked down by side population dissection. *Stem cells* 27: 1182-1195, 2009; Nantie LB, Himes AD, Getz DR, Raetzman LT Notch signaling in postnatal pituitary expansion: proliferation, progenitors, and cell specification. *Molecular endocrinology* 28: 731-744, 2014; Vankelecom H, Gremeaux L Stem cells in the pituitary gland: A burgeoning field. *General and comparative endocrinology* 166: 478-488, 2010.
- 7 Chen J, Crabbe A, Van Duppen V, Vankelecom H The notch signaling system is present in the postnatal pituitary: marked expression and regulatory activity in the newly discovered side population. *Molecular endocrinology* 20: 3293-3307, 2006.
- 8 Tando Y, Fujiwara K, Yashiro T, Kikuchi M Localization of Notch signaling molecules and their effect on cellular proliferation in adult rat pituitary. *Cell and tissue research* 351: 511-519, 2013.
- 9 Miao Z, Miao Y, Lin Y, Lu X Overexpression of the Notch3 receptor in non-functioning pituitary tumours. *J Clin Neurosci* 19: 107-110, 2012.
- 10 Lu R, Gao H, Wang H, Cao L, Bai J, Zhang Y Overexpression of the Notch3 receptor and its ligand Jagged1 in human clinically non-functioning pituitary adenomas. *Oncology letters* 5: 845-851, 2013.
- 11 Yalcin-Ozuyal O, Fiche M, Guitierrez M, Wagner KU, Raffoul W, Brisken C Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. *Cell Death Differ* 17: 1600-1612, 2010.

- 12 Sasaki Y, Ishida S, Morimoto I et al. The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway. *J Biol Chem* 277: 719-724, 2002.
- 13 Wu G, Nomoto S, Hoque MO et al. DeltaNp63alpha and TAp63alpha regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development. *Cancer Res* 63: 2351-2357, 2003.
- 14 Chomczynski P A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15: 532-534, 536-537, 1993.
- 15 de Biase D, Morandi L, Degli Esposti R et al. p63 short isoforms are found in invasive carcinomas only and not in benign breast conditions. *Virchows Arch* 456: 395-401, 2010; Baig MK, Hassan U, Mansoor S Role of p63 in differentiating morphologically ambiguous lesions of prostate. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP* 22: 773-777, 2012.
- 16 Uchida K, Ross H, Lotan T et al. DeltaNp63 (p40) expression in prostatic adenocarcinoma with diffuse p63 positivity. *Hum Pathol* 46: 384-389, 2015.
- 17 Du Z, Li J, Wang L et al. Overexpression of DeltaNp63alpha induces a stem cell phenotype in MCF7 breast carcinoma cell line through the Notch pathway. *Cancer Sci* 101: 2417-2424, 2010.
- 18 Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55: 611-622, 2009; Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 34: 597-601, 2005; Bustin SA Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-193, 2000.
- 19 Melino G p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. *Cell Death Differ* 18: 1487-1499, 2011.
- 20 Das RK, Pal M, Barui A et al. Assessment of malignant potential of oral submucous fibrosis through evaluation of p63, E-cadherin and CD105 expression. *J Clin Pathol* 63: 894-899, 2010.
- 21 Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* 8: 494-501, 2002.
- 22 Barbieri CE, Pietenpol JA p63 and epithelial biology. *Exp Cell Res* 312: 695-706, 2006.
- 23 Amin R, Morita-Fujimura Y, Tawarayama H et al. DeltaNp63alpha induces quiescence and downregulates the BRCA1 pathway in estrogen receptor-positive luminal breast cancer cell line MCF7 but not in other breast cancer cell lines. *Mol Oncol* 10: 575-593, 2016.
- 24 Barbieri CE, Tang LJ, Brown KA, Pietenpol JA Loss of p63 leads to increased cell migration and up-regulation of genes involved in invasion and metastasis. *Cancer Res* 66: 7589-7597, 2006.
- 25 Lo Muzio L, Santarelli A, Caltabiano R et al. p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 36: 187-194, 2005; Sniezek JC, Matheny KE, Westfall MD, Pietenpol JA Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 114: 2063-2072, 2004.
- 26 Shimada Y, Ishii G, Nagai K et al. Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Sci* 100: 2054-2059, 2009.
- 27 Si H, Lu H, Yang X et al. TNF-alpha modulates genome-wide redistribution of DeltaNp63alpha/TAp73 and NF-kappaB cREL interactive binding on TP53

- and AP-1 motifs to promote an oncogenic gene program in squamous cancer. *Oncogene*, 2016.
- 28 Bornachea O, Lopez-Calderon FF, Duenas Met al. The downregulation of DeltaNp63 in p53-deficient mouse epidermal tumors favors metastatic behavior. *Oncotarget* 6: 24230-24245, 2015.
- 29 Lo Iacono M, Monica V, Saviozzi Set al. p63 and p73 isoform expression in non-small cell lung cancer and corresponding morphological normal lung tissue. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6: 473-481, 2011.
- 30 Su X, Chakravarti D, Flores ER p63 steps into the limelight: crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis. *Nat Rev Cancer* 13: 136-143, 2013.
- 31 Hadzhiyanev A, Ivanova R, Nachev Eet al. Evaluation of prognostic utility of MIB-1 and p53 expression in pituitary adenomas: correlations with clinical behaviour and follow-up results. *Biotechnology, biotechnological equipment* 28: 502-507, 2014; Gejman R, Swearingen B, Hedley-Whyte ET Role of Ki-67 proliferation index and p53 expression in predicting progression of pituitary adenomas. *Hum Pathol* 39: 758-766, 2008.
- 32 Ma J, Meng Y, Kwiatkowski DJet al. Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through STAT3/p63/Jagged/Notch cascade. *J Clin Invest* 120: 103-114, 2010.
- 33 Beckers A, Daly AF The clinical, pathological, and genetic features of familial isolated pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 157: 371-382, 2007; Mezzomo LC, Gonzales PH, Pesce FGet al. Expression of cell growth negative regulators MEG3 and GADD45gamma is lost in most sporadic human pituitary adenomas. *Pituitary* 15: 420-427, 2012.
- 34 Stratakis CA, Tichomirowa MA, Boikos Set al. The role of germline AIP, MEN1, PRKAR1A, CDKN1B and CDKN2C mutations in causing pituitary adenomas in a large cohort of children, adolescents, and patients with genetic syndromes. *Clinical genetics* 78: 457-463, 2010; Aulinas A, Colom C, Ybarra Jet al. Immediate and delayed postoperative morbidity in functional and non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary* 15: 380-385, 2012.

Table 1. Primers used for RT-PCR in this study.

Gene name	Forward sequence (5'to 3')	Reverse sequence (5'to 3')
<i>ΔNp63</i>	CTGGAAAACAATGCCCAGAC	GAGGAGCCGTTCTGAATCTG
<i>TAp63</i>	CAGGACTCGGACCTGAGTGA	GAGGAGCCGTTCTGAATCTG
<i>Notch3</i>	TGGCGACCTCACTTACGACT	CACTGGCAGTTATAGGTGTTGAC
<i>Jagged1</i>	GGGGCAACACCTTCAACCTC	CCAGGCGAAACTGAAAGGC
<i>PGK1</i>	GAACAAGGTTAAAGCCGAGCC	GTGGCAGATTGACTCCTACCA

Table 2. Clinical and pathological characteristics of the pituitary tumors

Tumor Subtype	Number of cases (%)	Gender M/F*	Mean age \pm SD (years)**	Tumor size (Mac/Mic)***#
Non-Functioning adenomas	52 (67.5%)	31/21	57.62 \pm 11.36	52/0
Functioning adenomas	25 (32.5%)	10/15	45.68 \pm 13.98	23/2
ACTH - secreting	8 (10.4%)	2/6	41.00 \pm 14.98	6/2
GH - secreting	13 (16.9%)	7/6	48.31 \pm 11.48	13/0
PRL - secreting	4 (5.2%)	1/3	46.50 \pm 20.56	4/0
Total	77	41/36	53.74 \pm 13.41	75/2

M: male; F: female; Mac: macroadenomas (≥ 1 cm), Mic: microadenomas (≤ 1 cm); Non-functioning: no clinical evidence of hormone secretion; GH: growth hormone producing; ACTH: Adrenocorticotroph-hormone producing; PRL: prolactin-hormone producing.

*Chi-Square test (P=0.170); **t de Student: (Functioning x Non functioning P<0.001); **Anova followed by Tukey B test (all pituitary adenomas subtypes P=0.001);

***Fisher Exact test: (Functioning x Non functioning P=0.103); #Chi-Square test (all pituitary adenomas subtypes P=0.001).

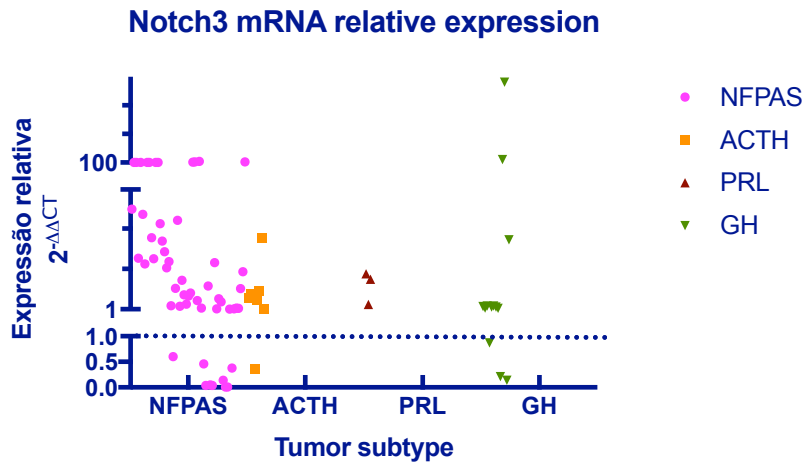
Table 3. Median of relative gene expression and proliferation index in all pituitary adenomas.

Tumor subtype	Number of cases (%)	TAp63_a	ΔNp63_a	Notch3_a	Jagged1^a	KI-67 index^b
Non functioning pituitary adenomas	52 (67.5%)	0.136	0.047	19.310	10.811	1.0%
Functioning adenomas	25 (32.5%)	0.203	0.911	4.950	15.897	1.5%
ACTH - secreting	13 (10.4%)	0.017	0.064	10.880	9.608	1.0%
GH - secreting	8 (16.9%)	0.037	0.091	2.780	15.898	1.0%
PRL - secreting	4 (5.2%)	0.016	1.607	28.045	280.22	2.0%
Total	77 (100%)	0.017	0.017	13.000	12.226	1.0%

^a Real Time qRT-PCR method (normalized by constitutive gene *PGKI*, determined by the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$); Kruskal-Wallis test; P>0.05.

^b Immunohistochemically determined. Mann-Whitney test; P=0.942.

c)



d)

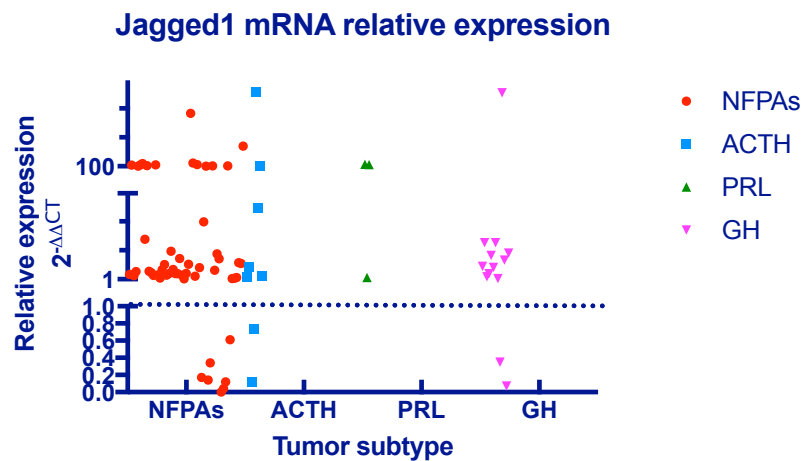


Figure 1. a) and b) mRNA expression of *p63* isoforms (TAp63 and Δ Np63). c) *Notch3* mRNA expression. d) *Jagged1* mRNA expression. NFPAs: Non-functioning pituitary adenomas, ACTH: ACTH-secreting; GH: GH-secreting; PRL: PRL-secreting. Each point indicates the relative gene expression in each tumor sample analyzed, normalized by reference gene *PGK1* comparing with the average of gene expression in the pool of human pituitary glands (endogenous control), which is designed as 1.0. These data were obtained by the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$

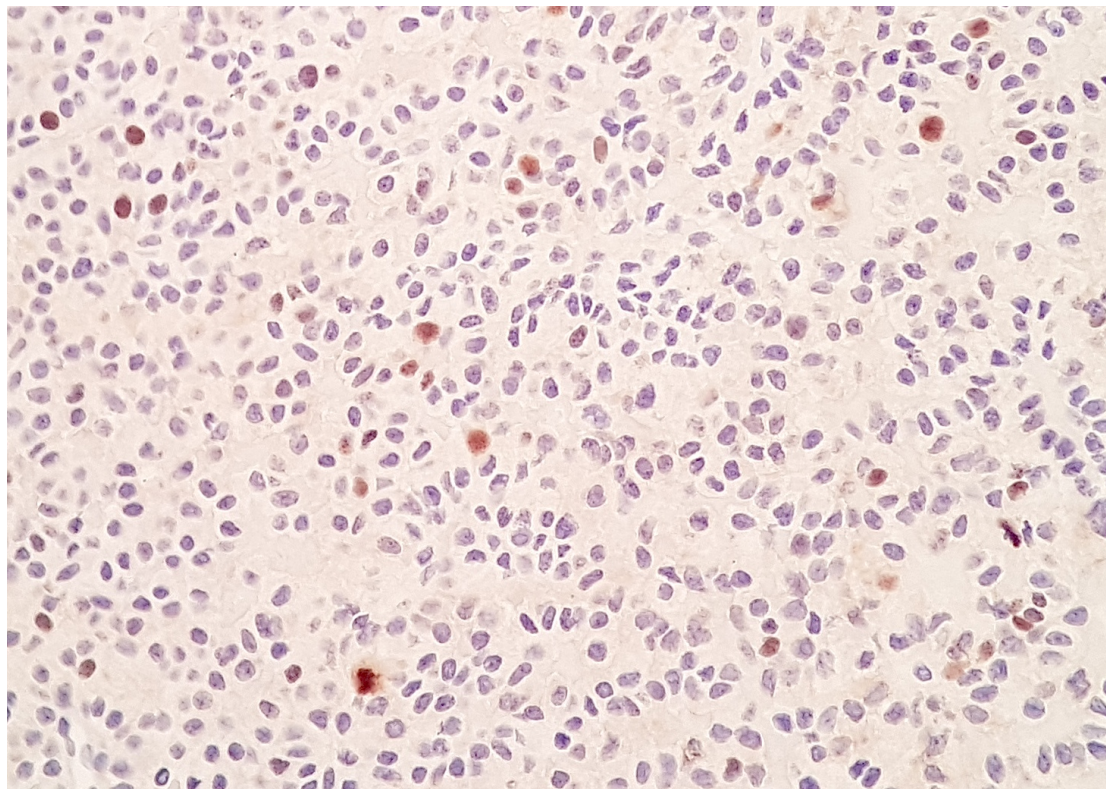


Figure 2: Image shows immunohistochemical staining of paraffin-embedded human pituitary adenoma stained with KI-67 antibody. Only the dark brown stained nuclei were considered immunopositive. (Original magnification: 400x).

3.2. Artigo científico 2

ORIGINAL PAPER

Paper submitted to: Human Pathology

Immunohistochemical Expression of Stem Cell Markers CD44, Nestin and p63 in pituitary adenomas

Lisiane Cervieri Mezzomo^{1,2}, Frederico Giacomoni Pesce^{1,2}, Taiana Haag^{1,2}, Rosalva Meurer², Josenel Marçal^{1,2}, Nelson Pires Ferreira³, Carolina Leães³, Julia Pereira Lima^{1,3}, Miriam Costa Oliveira^{1,3}, *Maria Beatriz da Fonte Kohek¹.

¹Post Graduation Program of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre - RS CEP90050-170. Brazil.

²Laboratory of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre - RS CEP90050-170. Brazil.

³Neuroendocrinology Center of Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, RS, CEP:90020-090. Brazil.

*Corresponding author:

Prof Dra. Maria Beatriz da Fonte Kohek

Post Graduation Program of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS CEP90050-170. Brazil.

Phone: +55 5193800906/ Fax: +55 5133038794; 33038796/+55 5133038803

ABSTRACT

Background: Tumor stem cell markers have already been identified in several tumors. It is believed that these cells are involved in tumor initiation, resistance and propagation. Identification of these cells in pituitary adenomas can help better understanding this tumorigenesis, which is still incompletely understood.

Objective: The aim of the present study was to investigate whether the stem cell markers CD44, nestin and P63 are immunohistochemically expressed in pituitary adenomas of different subtypes.

Materials and methods: Fresh pituitary adenoma specimens were collected from 105 patients who underwent surgical tumor resection. The neoplasms were identified on hematoxylin-eosin stained sections and were classified by immunohistochemistry. The expression levels of CD44, nestin and P63, were evaluated by using immunohistochemical staining of paraffin tissue sections, and the streptavidin-biotin-peroxidase complex method was applied using appropriate controls. We also evaluated the relation of these expression proteins with Ki-67 labeling index.

Results: Just a few samples showed immunopositivity for p63 and nestin. In contrast, there was no staining for CD44 in any pituitary tumor sample. The number of patients with p63 and Nestin immunopositivity in our study was too small to allow definite conclusions about a possible correlation between protein expression and clinical data available.

Conclusion: The presence of small amount of nestin⁺ and p63⁺ cells suggests the existence of immature subpopulations in pituitary tumors, but the biological significance of these cells population particularly in terms of a stem/progenitor cell function or a supportive role, remains to be explored.

Key words: Pituitary adenoma; immunohistochemistry; stem cell, progenitor cells; cancer stem cells

INTRODUCTION

Human pituitary adenomas are tumors that occur in the pituitary gland and represent 10-15% of all intracranial neoplasms. They are often considered to be benign(1). How pituitary adenomas are originated and the molecular and cellular events involved in their initiation and maintenance are not completely understood until now. Recently, several groups have described the existence of a subpopulation of brain tumor stem cells with the capacity for proliferation, self-renewal, and differentiation in human brain malignant tumors in both children and adults(2, 3). However, as far as we know, there were only a few works about cancer stem cells focusing on pituitary adenomas.

Important insights into pituitary adenoma tumorigenesis may come from studies of pituitary development and cell differentiation(4, 5). In 2005, it was reported that somatic stem cells exist in the adenohypophysis(6), and since then there has been much debate about their functions in pituitary tumorigenesis(7, 8). In addition, there have been many studies on embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. Consequently, they have attracted attention as a cell source for differentiated tissues in clinical applications. So, in this sense, we hypothesize that pituitary stem cells may also exist in adult tissues(9).

Tumor stem cells have been implicated as cancer-initiating cells in malignant tumors(9). However, whether benign tumors also contain tumor stem cells are largely unexplored. Besides some evidence, the existence and the role of these cells in benign pituitary adenomas is controversial and the evidence for a stem cell population that result in pituitary tumors is poor. The question of what potential role tumor progenitor/stem cells play in progression of benign tumors in general, and pituitary adenomas in particular, remains unclear(9-11).

The isolated stem cells were then characterized by the expression of differentially activated genes and proteins that characterize them. Despite the lack of universal stem cell markers, certain cellular molecules have been found in at least part of the stem cells isolated, such as Nestin, Prominin 1(CD133/AC133), Nanog, Bmi-1(12-16). These factors can be considered prospective identifiers of candidate stem/progenitor cells. In addition to these cellular markers, the signaling pathway of

Notch, Wnt and sonic hedgehog (Shh) have recently been implicated in stem cell renewal and fate determination in a variety of tissues (brain, intestine, bone marrow, mammary gland)(17-20). Numerous studies have reported that CD44, as well as CD133, nestin and so forth are some well accepted cancer stem cells surface markers (21), but the prognostic value of these markers is still under investigation. Thus, it demands urgent need of specific markers that can distinguish and target these cells. Several stem cell surface markers and biomarkers are being exploited in various cancers to determine a principal pattern of cancer stem cells markers. Proper screening and profiling of each marker with respect to each tumor type and tumor subtype is very vital in this process.

CD44 and nestin have been used in combination or with other putative markers to isolate cancer stem cells from solid tumors. Moreover, very little is known about the role played by p63 in cancer stem cells. However, the lack of their universal expression limits their usage to few designated cancer types.

The identification and characterization of stem cells in pituitary tumors might lead to new insights into the pathogenesis of pituitary adenomas. To achieve this goal, it will be necessary to determine if pituitary adenomas follow a cancer stem cell model, to address technical issues related to tumorigenesis assays, and to test the extent to which cancer cell heterogeneity arises from genetic versus epigenetic differences. Therefore, it is necessary to accumulate scientific knowledge concerning pituitary stem cells before achieving a conclusion in this field.

In this study, we searched for potential stem/progenitor cells markers in pituitary adenomas. The expression levels of CD44, p63 and nestin, as well as proliferative marker KI-67 were observed using immunohistochemical methods.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Specimen collection

A total of 105 patients who underwent pituitary tumor resection at the Department of Neuroendocrinology, São José Hospital, Santa Casa de Misericórdia, in Porto Alegre were recruited for this study. Tumors were characterized based on their clinical, radiological, histological, and immunohistochemical features. Based on the secreting features, all tumors were classified as functional or nonfunctional. All slides were

immunostained for growth hormone (GH), prolactin (PRL), adrenocorticotrophic (ACTH), luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH) and thyrotropin (TSH). Immunohistochemical analysis was performed using chromgranin A antibody for all cases for characterization of pituitary tissue. Haematoxylin and eosin-stained slides (HE) were available for all cases to confirm the presence of tumors, which were used to identify regions of the tumor, and these regions were marked. The aim of the immunohistochemical and ultrastructural investigation was accurately classify the neoplasms and reveal their hormone content and apparent endocrine activity. Both methods were employed for routine diagnostic purposes; thus, the results will not be described in detail. Tumor invasiveness was defined on the basis of preoperative radiological investigation, and confirmed during surgery. Patient data regarding gender, age, and secreting status are summarized in Table 1. Cases without complete data and/or sufficient material were excluded from the study. None of patients had received any treatment before the biopsy procedure. The study protocol was in accordance to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by the local Ethics Committee.

Immunohistochemistry

The immunohistochemistry was performed under the same conditions for all samples. Tumor samples obtained at surgery were routinely fixed in formalin, embedded in paraffin, sectioned at 3 μ m thickness, and mounted in organosilan slides for immunohistochemical analysis. The immunohistochemical staining was performed by the avidin-biotin complex method as the standard procedure. Then, the material was sent for immunohistochemical analysis for antibodies: CD44, nestin, p63 and KI-67. Slides were examined by two different observers using an optical microscope with a gradual increase up to magnification of 400x. One normal human pituitary obtained from autopsy was used as an internal control, as well as tonsil. Negative controls for immunostaining were prepared by omission of the primary antibody. The specificity of the immunohistochemical stains in each case was confirmed by a concomitant run with a negative control. The consistency and quality of staining were confirmed by the presence of positive internal controls and uniform reactivity with a known positive external control matched both methods of fixation.

Antibodies

CD44⁺ cells were identified as brown membrane staining. We used a CD44 antibody (1:100, clone VFF7, Novocastra) to determine the protein expression.

For the immunohistochemical demonstration of nestin, a Mouse Anti-Nestin (1:100, Milipore) was used. Nestin immunoreactivity was quantified by counting the number of tumor cells exhibiting any degree of cytoplasmic immunopositivity in 100 consecutive high-power (x400) fields.

p63 staining was considered positive by ascertaining only nuclear expression. Any cytoplasmic staining was considered background artifact. For the immunohistochemical demonstration of p63, a Monoclonal Mouse anti-human P63 antibody (1:300; Clone 4A4, Dako) was used. Immunopositivity criterion for proteins was defined as the presence of at least one stained cell with clearly outlined cytoplasm

In order to correlate protein expression with cell proliferation, nuclear labeling indices using KI-67 (1:100; clone MIB-1) antibody was determined. By both methods, 100 nuclei were counted and the results are expressed in percentage. Details of these procedures were described in previous papers(22, 23).

Statistical analysis

Normally test Shapiro-Wilk was done to determine distribution of the data. The results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) or median, according to the distribution of the data. The Pearson's Chi-Square test was used to assess the relationship between protein expression and each clinicopathological factor. Since the results are ordinal variable data, the Kruskal-Wallis test was used to analyze them. Computations were performed using the SPSS software (version 21.0; SPSS Inc., IBM Company, Chicago, IL, USA). $P < 0.05$ is considered statistically significant.

RESULTS

Patient's clinical diagnosis

The spectrum of adenomas studied was as follows: based on the secreting group classification, 41 (33%) patients were functional and 64 (52%) were nonfunctional adenomas. Among 64 patients with functional adenomas, there are 25 (20.3%) of GH-secreting tumors, 11 (8.9%) of ACTH-secreting tumors and 5 (4.1%) cases of PRL-secreting tumors. Of the 105 patients, 50 (40.7%) were females and 55 (44.7%) were

males. The tumor size was ≤ 1 cm in 3 patients ACTH-secreting. We only found a statistical significance between patient age and tumor subtype: patients with functioning adenomas are significantly younger than those with non-functioning adenomas (these data are shown in Table 1).

CD44 immunoreactivity

In order to extend our knowledge on the expression and significance of CD44 in cells of the pituitary tumors, we investigated immunohistochemically 105 samples of human pituitary adenomas of different subtypes. The expression of CD44 in normal tissue was evaluated in paraffin-embedded tonsils as a positive control. The immunostaining occurred in the membrane, with strong intensity (data not shown). With regard to our samples, we did not observe expression of CD44 in any of the pituitary adenomas investigated.

Nestin immunoreactivity

Pituitary adenoma cells were immunopositive for nestin in only 7 (6.66%) of all 105 samples examined. We also found a small number of endothelial cells with a few randomly distributed capillaries showed slight nestin immunopositivity (Figure 3). The spectrum of patients nestin⁺ was described in Table 2. The number of patients nestin⁺ was too small to allow definite conclusions about a possible correlation between nestin immunoreactivity and patient's gender, age, clinical presentation, tumor size, hormonal profile and KI-67 nuclear immunolabeling indices.

P63 expression status

Immunohistochemical analysis for p63 expression was performed in 105 cases. In 100 cases, there was no p63 gene expression (representing 95.23%). The spectrum of patients p63⁺ was described in Table 3. It is important to mention that all patients p63⁺ were distinct from patients nestin⁺. Figure 3 shows photomicrographs of positive pituitary adenomas cells for p63 expression. As the same as nestin, the number of patients p63⁺ was too small to correlate p63 immunoreactivity and clinical data available.

Proliferation status

In order to correlate nestin, CD44 e p63 expression with cell proliferation, nuclear labeling indices using KI-67 antibody were determined. It was considered as positive the whole cell with any color gradation, even if slight, since this marker has a short half-life, since the antigen is degraded within an hour after mitosis(24). As the previous reports(25), we found a low index of KI-67, with a median of 1% (range > 1% - 10%), and with no significant difference between tumor subtypes (Table 1). We did not find any correlation between stem cell markers expression and KI-67 labeling index.

DISCUSSION

Up to now, few studies have focused on CD44, nestin and p63 in pituitary adenomas, and this issue worthy of further study. In this paper, we chose an integrated analysis approach of these three cancer stem cell markers expressions in pituitary adenomas of different subtypes. As far as we know, there were only a few works about cancer stem cell in pituitary adenomas. One famous work was conducted by Xu and cols(9), which indicated, for the first time, that stem-like cells are present in benign tumors. The authors isolated sphere-forming, self-renewable, and multipotent stem-like cells from pituitary adenomas, which expressed increased levels of stem cell-associated progenitor cell markers, as nestin and CD133. Despite its relevance in the field of endocrine oncology, this study focused on tumor cells from just two pituitary tumor samples (one from GH-positive somatotroph tumor and one hormone negative null-cell macroadenoma), thus, further studies are necessary to validate these findings.

Nestin, an intermediate filament protein detected in many stem or stem-like cells(12, 26) is an important, although not exclusive, biomarker of stem cell. Recently, Gleiberman and cols(10) built on the discovery of nestin in the pituitary and used a transgenic approach to trace the progeny of the nestin-expressing cells, eventually advancing (some of) them as “stem” cells in the postnatal gland. This paper shows that nestin-expressing stem cells, in the anterior pituitary, are the only cell type in the organ that possess a self-renewal potential, and that cells nestin⁺ do not contain hormones (of the stem cell characteristics) also in accord with previous observations for nestin(27). Also in human pituitary, Weiss and cols(28) reported the presence of a putative nestin⁺ stem/progenitor cell population. This study also shown

that nestin-immunoreactive cells do not colocalize nor with hormone-producing neither with folliculoestelate cells. Taken together, these papers provide indications that the human pituitary may also contain putative stem/progenitor cells, which expresses nestin. However, data remain limited and circumstantial.

Rotondo e cols(29) used immunohistochemistry to demonstrate that tumor cells of all 125 adenoma types were immunonegative for nestin, but immunopositive in several tumor capillaries. It is of note that not all capillaries were reactive for nestin; some are completely immunonegative, or featured only a few positive endothelial cells. No major differences were found in nestin immunopositivity between endothelial cells of the non-tumorous and adenomatous pituitaries. Our data corroborate in part the study published by Rotondo and cols(29). Using immunohistochemistry we can see nestin immunopositivity for capillaries. Besides that, our results conclusively show that nestin cannot be detected in non tumorous adenohipophysial cells and in those of various adenoma types but, differently from these authors, we found nestin expression in some adenomas subtypes. Our findings indicate that in the human pituitary adenomas, only a few amount of samples express nestin, and this expression rate is variable among samples, and not statistically significant among adenomas subtypes. Although the presence of nestin has been immunohistochemically demonstrated in various extrapituitary tumors(2, 30-34), it appears that pituitary neoplasms are among them.

A wide variation in staining existed between individual neoplasms, even among ones belonging to the same immunotype and morphologic class. There were neoplasms in which practically all capillaries were nestin immunopositive, whereas in others only a few capillaries with labeled endothelial cells were seen. As the same as nestin expression cells: we found a great variation between nestin expression cells in those adenomas tested, and we assign these findings to the great variation intra and intertumoral, even in benign tumors.

CD44, a hyaluronic acid receptor, is one of the most commonly studied surface marker, which is expressed by almost every tumor cell. It is involved in cell migration and cell adhesion and is widely expressed in normal tissues. CD44 has recently received attention as a marker of cancer stem cells in various epithelial tumors. Komminoth and cols(35) described the expression status of CD44 in pituitary adenomas. The authors used only seven samples to show that four samples expressed CD44 (isoforms CD44v6 and CD44 v9). The authors did not describe the subtype of

pituitary adenoma tested. Therefore, the number of patients in this study was too small to allow definite conclusions about a possible correlation between CD44 expression and prognosis. Besides this, a study published by Xing and cols(36) used immunohistochemical technique and flow cytometry to evaluate CD44 expression in 35 pituitary adenomas. The authors did not find statistical differences between functioning and non-functioning adenomas and CD44 expression.

Our work offers original findings on this field, when we used an amount of 105 samples to show that immunohistochemically there was no CD44 expression in all tumor subtypes analyzed, contrasting in part, the results of CD44 expression levels in pituitary adenomas in earlier studies. Nevertheless, this preliminary observation needs to be further confirmed in future studies, because it is different from the two other studies published. Future research that examines the interplay between these cell types may reveal important mechanisms of pituitary cancer progression.

Boldrup and cols have shown that p63 isoforms induce expression of CD44. Δ Np63 isoforms specifically upregulate a CD44 splice variant lacking exon 2, indication that p63 may play a role in regulating CD44 mRNA splicing in addition to up-regulating mRNA levels. p63, a nuclear transcription factor, is down-regulated in terminally differentiated cells(37). Δ Np63 is expressed in basal epithelial cell and is required for normal development of several epithelial tissues, including the bladder, prostate glands and colorectal epithelia(38). This isoform is necessary for stem cell renewal(39) as well for terminal differentiation, whereas TAp63 is implicated in maintaining stem cells in quiescence and preventing premature aging and senescence. Because of its implication in both cancer and stemness, p63 may also play a relevant role in maintaining the cancer stem cell phenotypes. We performed, for the first time, p63 protein expression study in pituitary adenomas. We only found a small percentage of pituitary adenomas with p63⁺ expressing cells, and these expressions levels are low in all samples tested. Our results offer a preliminary study showing that a little percentage of cells p63⁺ are present in some pituitary adenomas.

Immunohistochemical methods mainly reflect the expressing location of markers in tumor cells. Although we can acquire the expression strength of the markers, the bias is evident. It should be taken into account that most of the pituitary stem cell markers may not only be expressed in the stem cells which make purification before clinical applicability not straightforward. Still, it is known that pituitary adenomas are typically benign, slow growing neoplasms, more often

expansive as infiltrative in nature. Thus, is no surprise that adenomas exhibited no CD44 immunopositivity, as well as low nestin and p63 immunopositivity index.

It is known that stem cells are unspecialized cells with the ability to self-renew (ability to go through numerous cycles of cell division while maintaining the undifferentiated state), and differentiate into specialized cell types. The cancer stem cell theory posits that neoplasms, like physiologic tissues, contain a small population of self-sustaining cells with the exclusive ability to self-renew and maintain the tumor. Pituitary adenomas are almost always histologically benign, although they may be locally invasive. Invasive adenomas may invade the dura mater, cranial bone, or sphenoid bone and were considered relative high proliferation activities. Although abnormalities in several pathways have been recognized in the pathogenesis of pituitary adenomas, no current general mechanism for pituitary tumor initiation is tenable. The tumor stem cell hypothesis represents an attractive unifying theory, and postulates that deregulation of a small subpopulation of tumor cells determines tumor development and growth, and the wide range of mutations noted in the differentiated tumor cell bulk may be subsequent genetic defects that accumulate as the tumor progresses.

Elucidation of the molecular characteristics and role of these cells in pituitary tumor initiation and treatment require further study that will lead to unraveling of incompletely understood mechanisms for pituitary tumor adenoma development and progression.

In conclusion, we have demonstrated that the stem cells may exist in pituitary adenomas in a low percentage. These findings facilitate the understanding of pituitary adenomas biology and the identification of a clinically distinct pituitary adenomas subpopulation of cells. Additional elaborated studies should provide insight into the potential of these cells, or at least some of them, and further support to such a stem/progenitor cell phenotype. This could collaborate towards explaining still little understood mechanisms involved in pituitary tumorigenesis.

CONFLITS OF INTERESTS: None

REFERENCES

1. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology*. 2015;17 Suppl 4:iv1-iv62.
2. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*. 2004;23(43):7267-73.
3. Dirks PB. Brain tumor stem cells: the cancer stem cell hypothesis writ large. *Mol Oncol*. 2010;4(5):420-30.
4. Heaney AP, Melmed S. Molecular targets in pituitary tumours. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):285-95.
5. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiological reviews*. 2007;87(3):933-63.
6. Chen J, Hersmus N, Van Duppen V, Caesens P, Deneff C, Vankelecom H. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology*. 2005;146(9):3985-98.
7. Gaston-Massuet C, Andoniadou CL, Signore M, Jayakody SA, Charolidi N, Kyeyune R, et al. Increased Wingless (Wnt) signaling in pituitary progenitor/stem cells gives rise to pituitary tumors in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(28):11482-7.
8. Garcia-Lavandeira M, Saez C, Diaz-Rodriguez E, Perez-Romero S, Senra A, Dieguez C, et al. Craniopharyngiomas express embryonic stem cell markers (SOX2, OCT4, KLF4, and SOX9) as pituitary stem cells but do not coexpress RET/GFRA3 receptors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(1):E80-7.
9. Xu Q, Yuan X, Tunici P, Liu G, Fan X, Xu M, et al. Isolation of tumour stem-like cells from benign tumours. *Br J Cancer*. 2009;101(2):303-11.
10. Gleiberman AS, Michurina T, Encinas JM, Roig JL, Krasnov P, Balordi F, et al. Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(17):6332-7.
11. Yunoue S, Arita K, Kawano H, Uchida H, Tokimura H, Hirano H. Identification of CD133+ cells in pituitary adenomas. *Neuroendocrinology*. 2011;94(4):302-12.
12. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990;60(4):585-95.
13. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000;24(4):372-6.
14. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003;113(5):631-42.

15. Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature*. 2003;425(6961):962-7.
16. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. *Science*. 2002;298(5593):601-4.
17. Gaiano N, Fishell G. The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annual review of neuroscience*. 2002;25:471-90.
18. Ho KS, Scott MP. Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Current opinion in neurobiology*. 2002;12(1):57-63.
19. Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, et al. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev*. 2002;16(7):846-58.
20. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423(6938):409-14.
21. Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:708036.
22. Kovacs K, Lloyd R, Horvath E, Asa SL, Stefanescu L, Killinger DW, et al. Silent somatotroph adenomas of the human pituitary. A morphologic study of three cases including immunocytochemistry, electron microscopy, in vitro examination, and in situ hybridization. *Am J Pathol*. 1989;134(2):345-53.
23. Rotondo F, Vidal S, Bell D, Horvath E, Kovacs K, Scheithauer BW, et al. Immunohistochemical localization of amylin in human pancreas, thyroid, pituitary and their tumors. *Acta histochemica*. 2003;105(4):303-7.
24. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif*. 1992;25(1):31-40.
25. Mastronardi L, Guiducci A, Spera C, Puzzilli F, Liberati F, Maira G. Ki-67 labelling index and invasiveness among anterior pituitary adenomas: analysis of 103 cases using the MIB-1 monoclonal antibody. *J Clin Pathol*. 1999;52(2):107-11.
26. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001;3(9):778-84.
27. Krylyshkina O, Chen J, Mebis L, Deneff C, Vankelecom H. Nestin-immunoreactive cells in rat pituitary are neither hormonal nor typical folliculo-stellate cells. *Endocrinology*. 2005;146(5):2376-87.
28. Weiss S, Siebzehnrubl FA, Kreutzer J, Blumcke I, Buslei R. Evidence for a progenitor cell population in the human pituitary. *Clinical neuropathology*. 2009;28(4):309-18.
29. Rotondo F, Kovacs K, Horvath E, Bell CD, Lloyd RV, Scheithauer BW. Immunohistochemical expression of nestin in the non-tumorous hypophysis and in pituitary neoplasms. *Acta Neuropathol*. 2006;111(3):272-7.
30. Almqvist PM, Mah R, Lendahl U, Jacobsson B, Hendson G. Immunohistochemical detection of nestin in pediatric brain tumors. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(2):147-58.
31. Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res*. 1992;52(19):5334-41.

32. Rutka JT, Ivanchuk S, Mondal S, Taylor M, Sakai K, Dirks P, et al. Co-expression of nestin and vimentin intermediate filaments in invasive human astrocytoma cells. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 1999;17(5-6):503-15.
33. Sugawara K, Kurihara H, Negishi M, Saito N, Nakazato Y, Sasaki T, et al. Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Lab Invest*. 2002;82(3):345-51.
34. Sarlomo-Rikala M, Tsujimura T, Lendahl U, Miettinen M. Patterns of nestin and other intermediate filament expression distinguish between gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2002;110(6):499-507.
35. Komminoth P, Seelentag WK, Saremaslani P, Heitz PU, Roth J. CD44 isoform expression in the diffuse neuroendocrine system. II. Benign and malignant tumors. *Histochemistry and cell biology*. 1996;106(6):551-62.
36. Xing B, Kong YG, Yao Y, Lian W, Wang RZ, Ren ZY. Study on the expression levels of CXCR4, CXCL12, CD44, and CD147 and their potential correlation with invasive behaviors of pituitary adenomas. *Biomedical and environmental sciences : BES*. 2013;26(7):592-8.
37. Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 10):1661-70.
38. Pignon JC, Grisanzio C, Geng Y, Song J, Shivdasani RA, Signoretti S. p63-expressing cells are the stem cells of developing prostate, bladder, and colorectal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(20):8105-10.
39. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. 1999;398(6729):714-8.

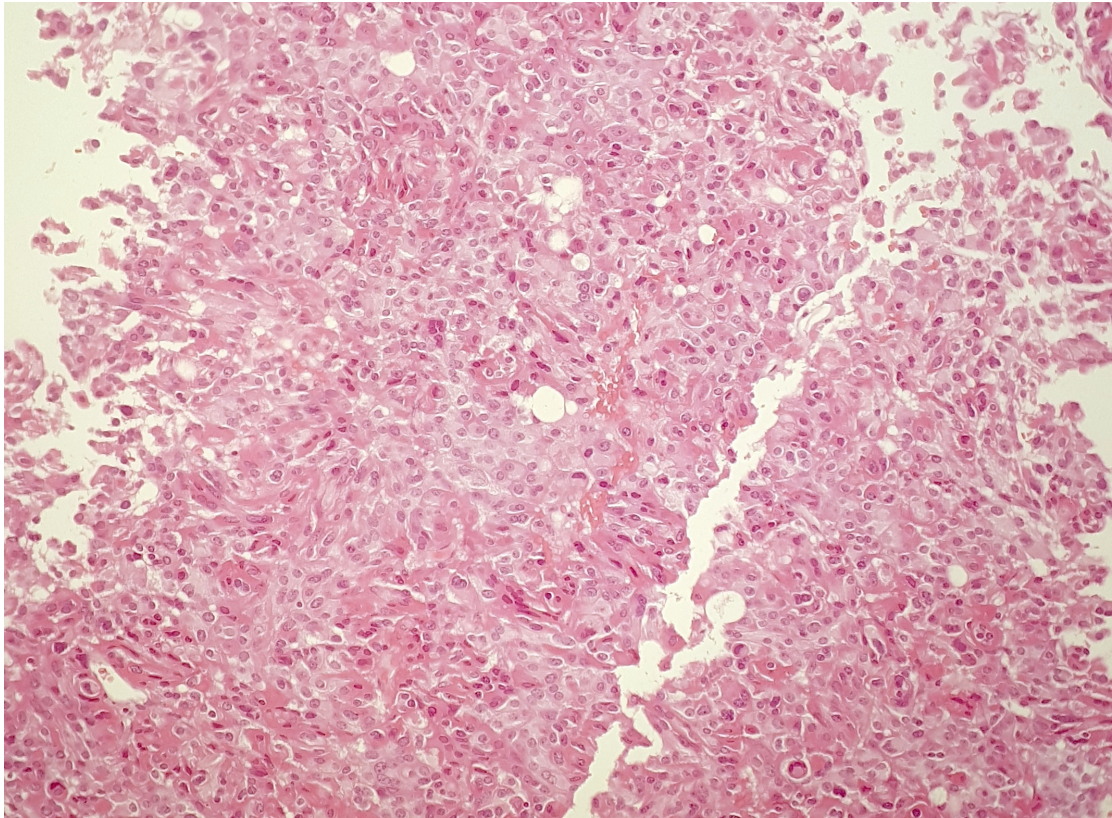


Figure 1: Photomicrographs of the pituitary adenoma . Hematoxylin-eosin (HE) staining. (Original magnification: 400x).

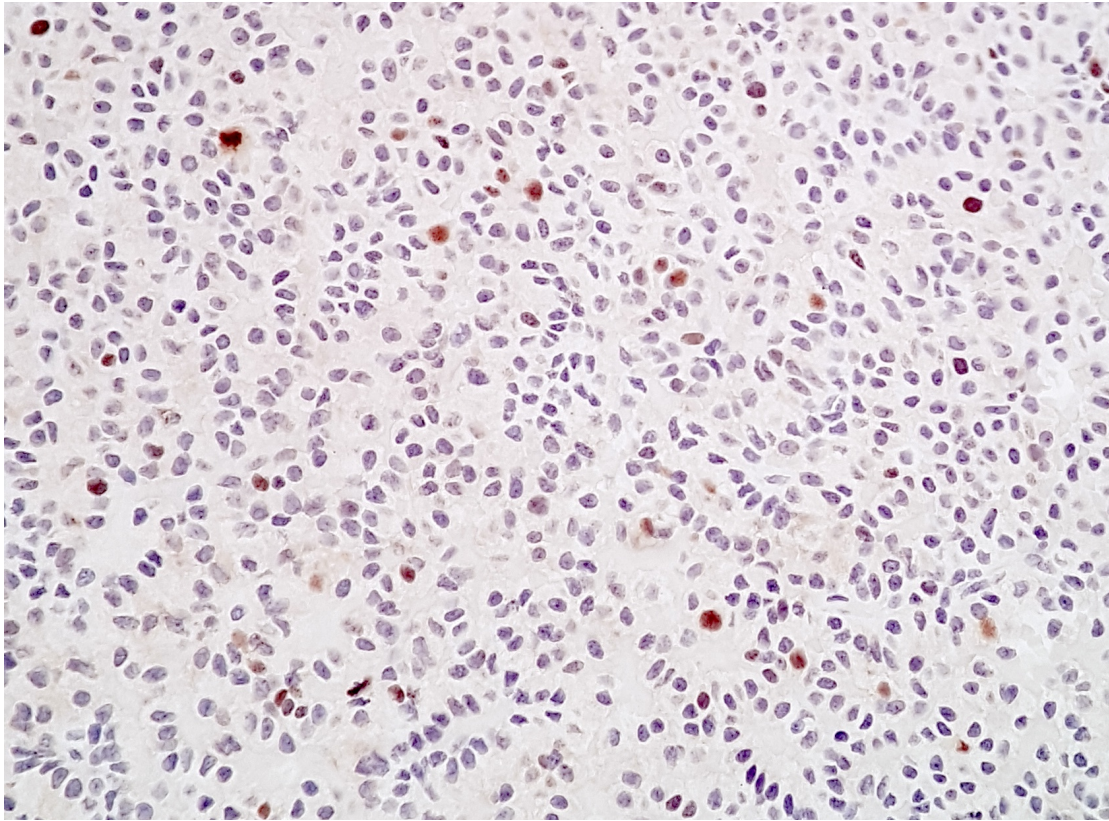


Figure 2: Immunohistochemistry for KI-67 protein. Only the dark brown stained nuclei were considered as immunopositive. (Original magnification: 400X).

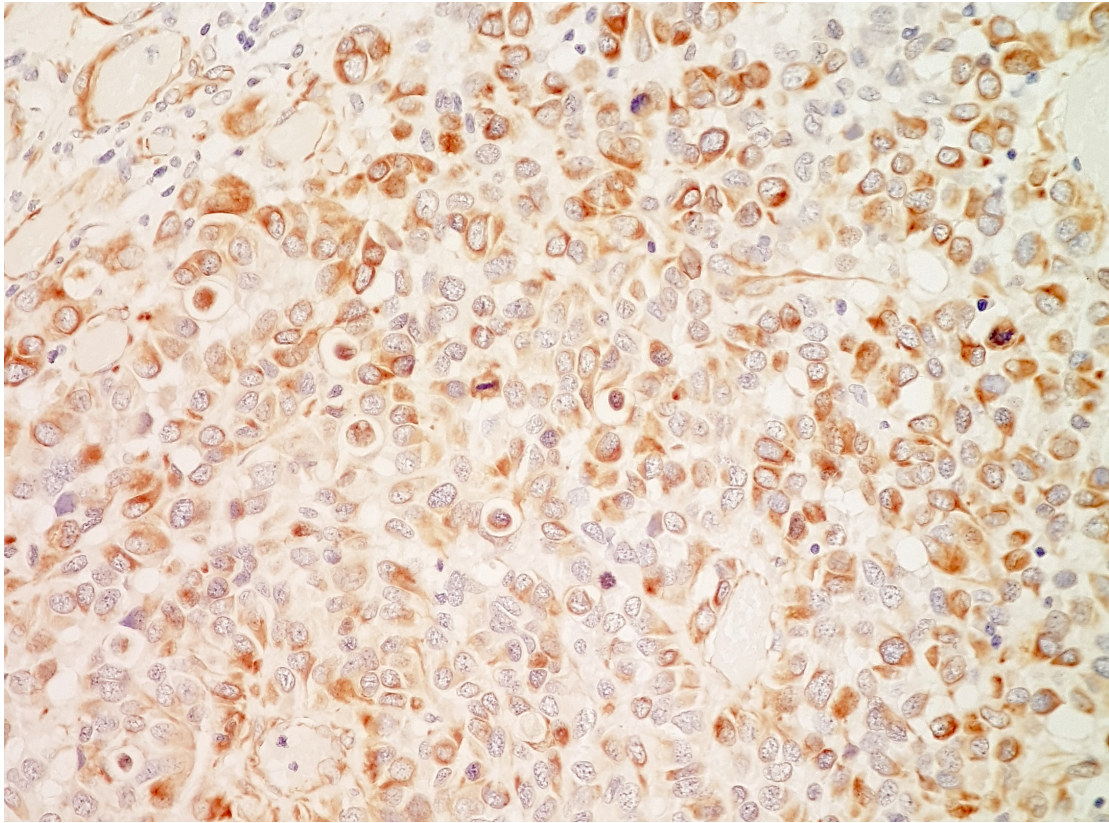


Figure 3: Immunohistochemical cytoplasmatic (brown) expression of nestin in pituitary adenomas. In one area, some small capillaries are noted, all showing immunopositivity for nestin (Original magnification: 400X).

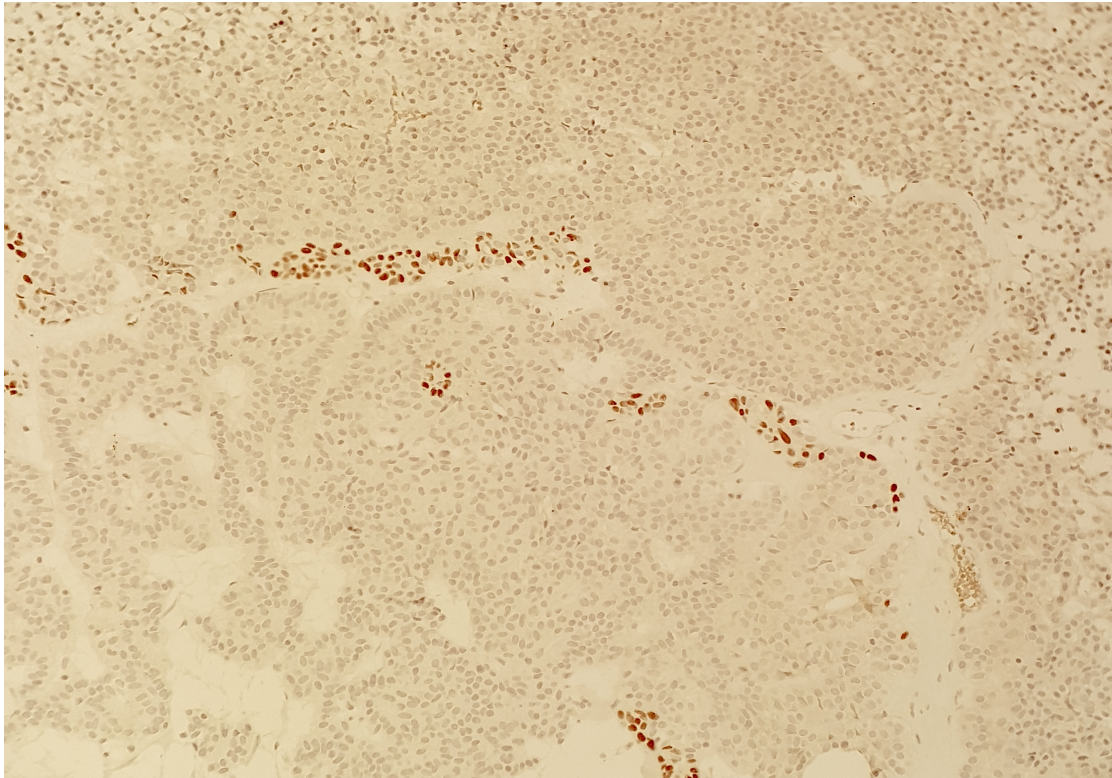


Figure 4: Photomicrograph of pituitary adenoma showing nuclear immunopositivity to p63 (Original magnification 400x).

Table 1: Clinical data of all 105 pituitary adenoma samples.

Tumor subtype	Number of cases (%)	Mean age \pm SD	Age range	Gender*** M:F ratio	KI-67**** median
Non-functioning	64 (52%)	54.20 (13.06)	24-79	37:27	1%
Functioning	41 (33.3%)	43.49 (13.98)*	20-74	18:23	1%
GH-secreting	25 (20.3%)	48.56 (12.93)**	27-74	12:13	1%
PRL-secreting	5 (4.1%)	34.80 (11.54)	22-48	3:2	2%
ACTH- secreting	11 (8.9%)	35.91 (12.74)	22-63	3:8	1%
Total	105 (100%)	50.01 (14.36)	20-79	55: 50	1%

*Student t test: $P < 0.05$; **Anova: $P < 0.05$; ***Chi-square test: $P = 0.279$; ****Kruskal-Wallis test: $P > 0.05$.

M: male; F: female; Non-functioning: no clinical evidence of hormone secretion; GH: growth hormone producing; ACTH: Adrenocorticotroph-hormone producing; PRL: prolactin-hormone producing, Negative: null cell.

Table 2: Characteristics of patients immunohistochemically p63⁺

Case	Gender	Age	Tumor subtype	Size	Clinical outcomes	Hormonal IHQ	P63⁺ cells*	KI-67 index*
1	F	22	FA/ Cushing	Mic	Cushing disease	ACTH	2%	< 1%
2	F	62	FA/ Acromegaly	Mac	Visual disturbances/ headaches	Null cell	<1%	1%
3	F	36	NFA	Mac	Pan-hipopituitarismo	LH/FSH	<1%	1%
4	M	79	NFA	Mac	Visual disturbances/ headaches	Null cell	<1%	1%
5	F	57	NFA	Mac	Headaches	Null cell	5%	2%

*(% of positivity); M: male; F: female FA: functioning adenomas, NFA: non-functioning adenomas. Macro: macroadenomas (≥ 1 cm), Micro: microadenomas (≤ 1 cm); GH: growth hormone producing; ACTH: Adrenocorticotroph-hormone producing; PRL: prolactin-hormone producing, Negative: null cell. Non-functioning: no clinical evidence of hormone secretion.

Table 3: Characteristics of patients immunohistochemically nestin⁺.

Cas e	Gender	Age	Tumor subtype	Size	Clinical outcomes	Hormonal IHQ	nestin⁺ cells*	KI-67 Index*
1	F	43	FA/Cushing	Mac	Cushing disease	Null cell	5%	1%
2	F	40	FA/Cushing	Mic	Cushing disease	ACTH, TSH, PRL, FSH, LH, GH	5%	1%
3	M	74	NFA	Mac	Headaches	Null cell	5%	1%
4	F	55	NFA	Mac	Headaches	Null cell	3%	1%
5	F	48	FA/ Acromegaly	Mac	Headaches/hands, feet and face enlargement	GH/PRL	2%	< 1%
6	F	40	NFA	Mac	Visual disturbances	ACTH	20%	1%
7	F	43	FA/Cushing	Mac	Cushing disease	ACTH	2%	< 1%

*(% of positivity); M: male; F: female; FA: Functioning adenomas. NFA: Non-functioning: no clinical evidence of hormone secretion; GH: growth hormone producing; ACTH: Adrenocorticotroph-hormone producing; PRL: prolactin-hormone producing, Negative: null cell. Macro: macroadenomas (≥ 1 cm), Micro: microadenomas (≤ 1 cm);

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O adenoma hipofisário é uma doença heterogênea, assim como cada um dos pacientes que desenvolvem essa doença. Assim, faz-se necessário avaliar individualmente cada subtipo tumoral, uma vez que há variação entre as expressões genicas e proteicas nos mesmos.
- As técnicas de biologia molecular associadas a imunohistoquímica permitem uma análise inicial do papel desses possíveis marcadores nos tumores de hipófise, porém estudos utilizando técnicas mais específicas, que possibilitam o estudo da célula individualmente são necessários para complementar a investigação e futuramente transferir esses achados para a prática clínica.
- Não houve expressão proteica do CD44 e em praticamente todas as amostras testadas para o p63. De forma contrária, encontramos expressão da Nestina nos adenomas de hipófise. O conjunto desses resultados, entretanto, sugere a existência de células imaturas nos tumores hipofisários.
- O Notch3 e o Jagged1 tem sido implicados na patogênese dos adenomas hipofisários, especialmente os não funcionantes, sendo, talvez, no futuro, um possível alvo terapêutico para o tratamento desses tumores.
- Encontramos correlação positiva entre o *TP63/Notch* e Jagged, o que está de acordo com os dados descritos na literatura. Estudos adicionais, que focam nos mecanismos envolvidos nesse processo, ainda são necessários.
- O estudo da expressão genica e proteica do p63 mostrou que a expressão desse marcador (considerando ambas as isoformas) está praticamente ausente nos adenomas de hipófise. Estudos adicionais são necessários para estabelecer os mecanismos envolvidos nesse processo.
- De forma geral, não houve relação entre as expressões gênicas e proteica com os aspectos clínicos analisados.
- Ainda é indispensável estabelecer métodos diferenciais para a identificação de células tronco hipofisárias bem como os marcadores e/ou painel de marcadores. Os estudos nessa área ainda são iniciais e portanto controversos e demandam investigações adicionais.

5. ANEXOS

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Perfil de expressão de marcadores de pluripotência e o envolvimento na proliferação celular em adenomas hipofisários.

(Nome completo do paciente – preencher em letra de forma) - RG/Estado

1° - O adenoma de hipófise é o mais comum dos tumores cerebrais, porém, as causas do seu desenvolvimento ainda não estão bem definidas. A presença de alguns genes é diferente entre hipófises humanas normais e adenomas. Esses dados indicam que eles podem estar envolvidos no desenvolvimento dos tumores na hipófise. Neste estudo, pesquisaremos a presença de alguns genes nos adenomas hipofisários de pacientes submetidos a cirurgia.

2° - O procedimento utilizado será a análise do adenoma de hipófise, obtido após cirurgia. O procedimento não traz riscos ao paciente, visto que o material será proveniente de cirurgia prévia.

3° - Os benefícios esperados com os resultados desta pesquisa são para o paciente, para outros pacientes com o mesmo tipo de lesão, e para o desenvolvimento da ciência, o que poderá conferir mudanças no tratamento deste tipo de tumor no futuro.

4° - É garantido ao paciente o recebimento de resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca do estudo.

5° - Caso existirem novas perguntas sobre este estudo, sobre os direitos como participante do mesmo ou prejuízo de qualquer natureza pela participação, deve ser contatada a Dra. *Maria Beatriz da Fonte Kohek* (investigadora principal) pelo telefone (51) 3303-8819 ou entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, pelo telefone: (51) 3303-8804

6° - É dada a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do Estudo, sem que isso traga prejuízo. Ressaltamos também que a concordância em participar do estudo não implica em qualquer modificação no tratamento que já está sendo feito. Da mesma forma, a não concordância em participar do estudo não irá alterar de nenhuma maneira o tratamento já estabelecido.

7° - É dada a garantia de não ser identificado e de ser mantido o caráter confidencial de informação em relação à privacidade do paciente, bem como a não divulgação de qualquer dado que possa produzir a identificação do mesmo durante toda a pesquisa, em respeito a sua privacidade.

8° - É assumido o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade em continuar participando.

9° - É garantido que todos os gastos de realização de exames do protocolo da pesquisa serão absorvidos pelo orçamento do estudo, não havendo qualquer gasto para o paciente.

10° - A equipe se compromete em utilizar apenas parte do material proveniente da cirurgia para a realização de tal pesquisa, ficando o material restante adequadamente preservado na Instituição depositária (Laboratório de Patologia da ISCMPA) e a disposição do paciente.

Estou ciente e de acordo com a realização de estudos complementares por uma equipe multidisciplinar e, autorizo a utilização do material proveniente da cirurgia para aplicação das técnicas necessárias ao presente estudo. Estou ciente de que não serão violados os segredos profissionais obtidos pelo exames aos quais me submeterei. Assino o presente documento, em duas vias de igual teor, ficando uma em minha posse, ciente de todos os benefícios e riscos descritos acima.

A minha assinatura neste *Consentimento Livre e Esclarecido* dará autorização ao coordenador do estudo e ao Comitê de Ética da UFCSPA de utilizarem os dados obtidos quando for necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha privacidade.

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

Assinatura do Voluntário:

Assinatura do Responsável pelo projeto:

_____ (Maria Beatriz da Fonte Kohek)

Assinatura da testemunha:

ANEXO 2 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFCSPA

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Perfil de Marcadores de pluripotência e o envolvimento na proliferação celular em adenomas hipofisários
--

Pesquisador Responsável Maria Beatriz da Fonte Kohek	Parecer 1797/12
--	-----------------

Data da Versão 13/07/2012

Cadastro 010/12

Data do Parecer 16/08/2012

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais
--

Objetivos do Projeto

Identificar e avaliar a expressão quantitativa de marcadores de pluripotência em adenomas hipofisários e o papel do gene p63 na manutenção da proliferação celular.

1. Avaliar a expressão proteica de Nestina, CD44 e CD133
2. Correlacionar a expressão dos marcadores com a expressão do p63
3. Verificar o perfil de proliferação celular através da expressão do Ki67 e PCNA
4. Avaliar a expressão gênica do gene p63 em adenomas hipofisários
5. Avaliar a presença de isoformas do p63 (TA e deltaN) nos adenomas
6. Correlacionar a expressão dos marcadores Nestina, CD44, CD133, Ki67 e PCNA em adenomas hipofisários e associar ao subtipo tumoral
7. Comparar a expressão gênica e proteica do p63 nesses adenomas
8. Caracterizar a presença de células tronco tumorais em linhagens celulares derivadas de tumor e correlacionar com tumores hipofisários
9. Estabelecer correlações clínico-patológicas e a expressão destes genes (idade, sexo, tamanho tumoral, dosagens bioquímicas, remissão da doença e IHQ) I

Sumário do Projeto

Apesar dos adenomas hipofisários serem a neoplasia intracraniana mais comum, sua tumorigênese não está claramente definida. A presença de células tronco na hipófise e sua associação com a patofisiologia da glândula e ainda com a carcinogênese são aspectos que devem ser melhor investigados. Este projeto irá investigar a presença de células tronco tumorais e verificar o papel do p63 na manutenção da pluripotência em adenomas hipofisários humanos.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Outro (citar no comentário)
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

As metodologias serão realizadas nos laboratórios da UFCSPA: Lab de Patologia, Lab de Biologia Molecular e Lab de Genética Toxicológica

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delimitação	Adequado
Tamanho de amostra	Total 100 Local 100

Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os Itens de Pacientes e Métodos

Há previsão que serão obtidas amostras de 100 pacientes no período do projeto.

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	julho-2012
Data de término prevista	dez-2015
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Outras fontes

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Com relação ao financiamento há material já obtido pelos pesquisadores e consta que o projeto será submetido a editais de agências de fomento para captação de recursos.

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Todas as sugestões foram analisadas pelos autores e quando pertinentes incorporadas ou adequadamente respondidas pelos autores.

ANEXO 3 – METODOLOGIA

Delineamento:

Trata-se de um estudo de prevalência, tipo transversal.

Local de Realização:

As análises foram realizadas nos laboratórios de Biologia Molecular e Patologia da UFCSPA.

Sujeitos de Pesquisa:

O estudo foi realizado com amostras de adenomas hipofisários de pacientes submetidos a cirurgia transfenoidal no Hospital São José da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), instituição conveniada UFCSPA.

Critérios de Inclusão: Foram incluídos, mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, pacientes submetidos à ressecção tumoral no Hospital São José da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre com diagnóstico pré-operatório de adenoma de hipófise confirmado no material anatomopatológico pela técnica imuno-histoquímica.

Critérios de exclusão:

- Pacientes submetidos à ressecção tumoral com diagnóstico anatomopatológico que não contemple os critérios de inclusão.
- Dados clínicos insuficientes.
- Não consentimento em participar do estudo.

Amostras:

Fora incluídas amostras de adenomas hipofisários humanos esporádicos funcionantes e não-funcionantes, obtidas após cirurgia transfenoidal realizada entre 2006 e 2015. O diagnóstico é estabelecido rotineiramente através da análise clínica, bioquímica e radiológica. As informações clinicopatológicas foram obtidas dos prontuários dos pacientes (idade, sexo, tamanho tumoral e marcadores imunohistoquímicos hormonais), localizados nos arquivos do Hospital São José (ISCMPA). Na avaliação dos prontuários médicos dos pacientes, foram obtidas informações sobre história

pregressa da lesão, idade, gênero, localização tumoral, tamanho do tumor e classificação histológica.

Análise histológica

Parte do material proveniente das ressecções tumorais é fixado em formalina e incluído em blocos de parafina, sendo a caracterização morfológica feita por análise histológica (coloração de hematoxilina-eosina) e imunohistoquímica (testados anticorpos para ACTH, FSH, GH, LH, PRL e TSH) após a cirurgia.

Análise molecular

Os tumores foram coletados em condições estéreis, congelados imediatamente em nitrogênio líquido após a ressecção cirúrgica e estocados em ultrafreezer a -80°C até o momento das análises.

Utilizamos um pool comercial de hipófises normais para calibração das técnicas de RT-PCR quantitativo (Clontech Laboratories, Inc.), em virtude da dificuldade de obtenção de amostra a fresco para o estudo. A técnica é padronizada em nosso grupo de pesquisa (Mezzomo e cols., 2011).

Técnicas:

1. Análise da expressão Proteica

Estudo anátomo-patológico pela técnica de Imuno-histoquímica (IHQ)

Da casuística total encontrada, foram selecionadas amostras de 140 pacientes, que possuíam blocos de parafina disponíveis para o estudo. A seleção dos pacientes foi feita através da revisão das laminas coradas por hematoxilina e eosina.

As amostras provenientes das hipofisectomias incluídas em blocos de parafina, fixadas em formalina 10%, foram seccionadas na espessura de 3µm. Posteriormente foram montadas lâminas de vidro preparadas com organosilano antes das amostras serem submetidas à técnica de IHQ conforme protocolo padronizado pelo Laboratório de Patologia da UFCSPA (técnica tradicional de biotina avidina imunoperoxidase (Hsu e cols., 1981)). Após a coloração, as laminas foram cobertas com lamínula, com

o auxílio de Entellan[®] (Merck Millipore). Um painel combinado de marcadores de superfície foi utilizado para caracterizar a presença de células imaturas (CD44, NESTINA e p63) e o perfil de proliferação celular (KI67) nos adenomas hipofisários humanos.

Tabela1: Anticorpos primários utilizados nesse estudo.

<i>Nome do gene</i>	<i>Principal característica</i>
NESTINA	Filamento intermediário de células imaturas ou em rápida proliferação.
CD44	Proteína relacionada a progressão do câncer através da proliferação celular.
P63	Fator de transcrição relacionado a manutenção da proliferação celular
KI67	Proteína nuclear associada à proliferação. Marca todas as fases exceto G0.

Em todas as marcações estudadas utilizamos controles positivos (tonsilas). Como controles, utilizamos também hipófises humanas normais provenientes de autópsias.

As lâminas foram rastreadas por 2 observadores separadamente, em microscópio óptico Olympus BX40 (Olympus America Inc), com aumento progressivo de até 400 vezes e lente reticulada acoplada ao microscópio. As imagens foram analisadas no programa Image Pro Plus, version 6.3 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). O critério de positividade foi a presença de células claramente marcadas.

2. Análise da expressão gênica

A técnica de RT-PCR quantitativo foi utilizada para verificar a expressão das isoformas do *p63* está mais expressa nos adenomas hipofisários (Δ Np63 ou TAp63), e se estão relacionadas com a atividade proliferativa no tumor.

Extração do RNA total:

Para a extração de RNA, aproximadamente 50mg de tecido foi fragmentado e o RNA total extraído após homogeneização, usando Trizol[®] como reagente (Invitrogen, Carlsbad, USA) de acordo com descrição prévia (Chomczynski, 1993). Após a extração, o RNA foi redissolvido em água ultrapura tratada com DEPC (10 a 30 μ L) e incubado por 10 min a 60°C, seguido de banho de gelo por 1 min para quantificação

das amostras e estocagem a -80°C . A concentração, integridade e pureza do RNA foi medida por espectrofotometria UV a 260nm utilizando o BioSpec Nano (Shmadzu corp), nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. As amostras com concentrações de RNA consideradas adequadas foram aquelas cuja relação de leitura da absorbância a 260nm/280nm foi superior a 1,7, que foram calculadas através da fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \mu\text{g/mL}$$

Onde: A= absorbância e D= diluição da alíquota usada para a quantificação. Por exemplo, para 1 μL da solução de RNA em 500 μL de água. $D = 1: 499 = 500$ vezes. O RNA extraído ficou estocado a -80°C até o processamento das amostras.

Síntese de cDNA:

1 μg de RNA total foi reversamente transcrito utilizando o kit ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega Corp), de acordo com as recomendações do fabricante. O volume final de cDNA foi 20 μL . A quantidade de cDNA foi mensurada em espectrofotômetro (BioSpec Nano, Shimadzu Corp) para o ajuste da concentração, antes da realização da técnica de RT-PCR quantitativo. As amostras foram armazenadas a -20°C até a amplificação por PCR em tempo real (qPCR).

Desenho dos primers

Os oligonucleotídeos iniciadores para avaliar a expressão gênica foram desenhados utilizando o programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e sintetizados pela Invitrogen (Carlsbad, USA).

Genes constitutivos e curva de normalização

Para minimizar possíveis variações entre as amostras, utilizamos 1 gene constitutivo (PGK1, cuja utilização como gene constitutivo é padronizada pelo nosso grupo de pesquisa) para a normalização da concentração de RNA nas análises por PCR Real Time, que foram amplificados simultaneamente ao gene de interesse. O gene normalizador ou constitutivo é um gene expresso em níveis constantes entre os diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do desenvolvimento não sofrendo alteração pelos tratamentos experimentais. Em cada reação realizada para a amplificação do gene de interesse foi feita a amplificação do gene constitutivo,

minimizando assim as variações de pipetagem. Os resultados foram expressos como a relação gene de interesse/gene normalizador, em unidades arbitrárias.

Expressão quantitativa (RT-PCR Real Time)

As condições da reação de PCR para cada gene foram padronizadas, antes de proceder-se à quantificação das amostras. Foram testados: concentração e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos e duração de cada etapa do ciclo.

A análise da expressão foi feita por SYBR Green[®] Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com o protocolo específico.

O reagente Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG é fornecido a uma concentração de 2X. A *mix* é otimizada para reações com o reagente SYBR Green[®], e contém: corante SYBR Green[®] I; Platinum[®] Taq DNA Polimerase; dNTPS; solução tampão com concentrações otimizadas de seus componentes (Tris-HCl, KCl e MgCl₂). As amostras foram amplificadas no equipamento Applied Biosystems StepOne Plus[™] Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

As leituras de fluorescência emitidas por cada amostra nas reações foram feitas ao final de cada ciclo. As reações foram realizadas com 40 ciclos, mas a quantificação das amostras foi realizada durante o início do aumento exponencial da fluorescência. Os níveis de expressão foram mensurados utilizando o método $\Delta\Delta C_t$, normalizado pelo gene constitutivo (Livak e Schmittgen, 2001). A variação da expressão foi calculada através dos níveis de expressão dos tecidos tumorais/células e tecidos normais/células. A eficiência foi determinada pela avaliação do ΔC_t em uma diluição seriada do gene referencia.

Técnica de imunohistoquímica (avidina biotina-peroxidase)

Todo o procedimento foi realizado no laboratório de Patologia da UFCSPA, pela mesma profissional técnica, visando minimizar possíveis variações no processo. A técnica descrita é padronizada pelo Laboratório de Patologia da UFCSPA.

1. Colocar o corte do tecido a ser estudado na lâmina preparada com organossilano.

2. Desparafinar o tecido

- Deixar as lâminas na estufa a aproximadamente 70°C por 60 minutos.
- Colocar as lâminas em xilol, 2 vezes, de 5 minutos.
- Colocar as lâminas em etanol absoluto, 3 vezes de 3 minutos, deixando 5 minutos no último álcool.
- Lavar em água corrente por 5 minutos.

3. Recuperação do antígeno

- Aquecer a solução de citrato de sódio (pH 6,0) em banho-maria a 95°C; colocar as lâminas submersas nessa solução por 40 minutos,
- Retirar do banho-maria e deixar esfriar à temperatura ambiente por 20 minutos.
- Lavar em água destilada.

4. Bloqueio da peroxidase endógena

- Deixar as lâminas em solução de água oxigenada (5ml) com metanol (95ml) por 10 minutos, protegido da luz. Repetir o procedimento 3 vezes.
- Lavar as lâminas em água destilada.
- Lavar as lâminas com PBS (pH 7,4) por 5 minutos sob agitação.

5. Bloqueio das proteínas inespecíficas

- Pingar soro de bloqueio (DAKO código X0909) diretamente sobre as lâminas, cobrindo todo o tecido, e deixar por 30 minutos.
- Retirar o excesso sem lavar.

6. Aplicar o anticorpo primário

- Pingar o 50µL anticorpo primário diluído em albumina bovina a 1% em cada lâmina.
- Deixar 60 minutos a temperatura ambiente.
- Incubar em câmara úmida coberta durante a noite, em geladeira, a 4°C.
- No dia seguinte, lavar com PBS (pH 7,4) 2 vezes por 5 minutos.

7. Aplicar o anticorpo secundário

- Aplicar o anticorpo secundário biotinizado sobre cada lamina por 40 minutos (DAKO kit LSAB + SYSTEM, HRP) cobrindo todo o tecido.
- Lavar com PBS (pH 7,4) 2 vezes por 5 minutos.

8. Incubar com anticorpo 3/polímero

- Aplicar o complexo avidina-biotina-peroxidase (kit LSAB +SYTEM, HRP_DAKO) sobre cada lamina e por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar com PBS (pH 7,4) 2 vezes por 5 minutos.

9. Revelação do substrato cromógeno (DAB)

- Preparar o cromógeno DAB (3-3 diamino-benzidine-tetracloro) e aplicar sobre todo o tecido. Deixar por 5 minutos.
- Lavar em água destilada por 5 minutos.

10. Contra-corar com hematoxilina

- Deixar 30 segundos no corante hematoxilina.
- Lavar em água corrente até clarificar a água.

11. Desidratar

- Passar as lâminas em álcool absoluto por 4 vezes, deixando por 5 minutos no último recipiente com álcool absoluto.
- Passar as lâminas no xilol (por 2 vezes, 5 minutos cada vez).

12. Montar as lâminas com lamínula utilizando o “Entellan”.

ANEXO 4 – ARTIGOS DESENVOLVIDOS DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO

Pituitary
DOI 10.1007/s11102-011-0340-1

Expression of cell growth negative regulators *MEG3* and *GADD45γ* is lost in most sporadic human pituitary adenomas

Lisiane Cervieri Mezzomo · Paulo Henrique Gonzales · Frederico Giacconi Pesce ·
Nelson Kretzmann Filho · Nelson Pires Ferreira · Miriam Costa Oliveira ·
Maria Beatriz Fonte Kohek

NEUROPATHOLOGY

Neuropathology 2015; 35, 16–23

doi:10.1111/neup.12145

Original Article

Aromatase P450 expression in human pituitary adenomas

Paulo Henrique Gonzales,¹ Lisiane Cervieri Mezzomo,^{1,2} Nelson Pires Ferreira,³
Adriana Vial Roehle,¹ Maria Beatriz Fonte Kohek^{1,2} and Miriam da Costa Oliveira^{1,3}

¹Post-Graduation Program of Pathology, ²Laboratory of Molecular Biology, UFCSPA, and ³Neuroendocrinology Center, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), Porto Alegre, RS, Brazil

Decreased of CDK inhibitor *p18^{INK4C}* mRNA expression in sporadic Clinically Non-functioning Pituitary Adenomas.

Frederico Giacomoni Pesce^{1,2}, Lisiane Cervieri Mezzomo^{1,2}, Paulo Henrique Gonzales^{1,2}, Néelson Kretzmann Filho², Nelson Pires Ferreira³, Carolina Garcia Soares Leães³, Julia Pereira Lima^{2,3}, Miriam Costa Oliveira^{2,3}, Maria Beatriz Fonte Kohek^{1,2}.

1 Laboratory of Molecular Biology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre – RS, CEP: 90050-170. Brazil.

2 Post-graduation Program of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre – RS, CEP: 90050-170. Brazil.

3 Neuroendocrinology Center of Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, RS, CEP: 90020-090, Brazil.

Up and down regulators differential gene expression in non-functioning pituitary adenomas (NFPA).

Frederico Giacomoni Pesce^{1,2}, Lisiane Cervieri Mezzomo^{1,2}, Nelson Pires Ferreira³, Carolina Garcia Soares Leães³, Julia Pereira Lima^{2,3}, Miriam da Costa Oliveira^{2,3}, Maria Beatriz Fonte Kohek^{1,2}.

1 Laboratory of Molecular Biology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre – RS, CEP: 90050-170. Brazil.

2 Post-graduation Program of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre – RS, CEP: 90050-170. Brazil.

3 Neuroendocrinology Center of Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, RS, CEP: 90020-090, Brazil.