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

Geraldine Trott

Pesquisa de marcadores preditores de recidiva e recrescimento em adenomas hipofisários não funcionantes

Porto Alegre
2018

Geraldine Trott

Pesquisa de marcadores preditores de recidiva e recrescimento em adenomas hipofisários não funcionantes.

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

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima
Co-orientadoras: Prof.ª Dr.ª Miriam da Costa Oliveira
Prof.ª Dr.ª Taiana Haag

Porto Alegre
2018

Catalogação na Publicação

Trott, Geraldine
Pesquisa de marcadores preditores de recidiva e recrescimento em adenomas hipofisários não funcionantes / Geraldine Trott. -- 2018.
97 f. : il., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2018.

Orientador(a): Julia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima ; coorientador(a): Miriam da Costa Oliveira, Taiana Haag.

1. Representação anatômica da glândula hipófise. 2. Representação esquemática da classificação de Hardy para os adenomas hipofisários. 3. Classificação clínico-patológica dos adenomas de hipófise. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“A persistência é o menor caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

Agradecimentos

À minha orientadora, **Drª Julia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima**, pela confiança depositada em mim ao longo de quase 10 anos de trabalho, somados desde a iniciação científica, mestrado e doutorado. Agradeço o apoio incondicional e incontáveis horas de dedicação, conhecimentos transmitidos, amizade e por ter se tornado um exemplo acadêmico e pessoal para mim.

À minha co-orientadora, **Drª Miriam da Costa Oliveira**, pela confiança e oportunidade de evolução dentro do Centro de Neuroendocrinologia da Santa Casa.

Á minha co-orientadora, **Drª Taiana Haag**, pelo compartilhamento de conhecimentos e amizade.

Às minhas queridas colegas e amigas, **Bárbara Ongaratti e Camila Batista de Oliveira,** que estiveram ao meu lado em todas as etapas deste trabalho. Agradeço pela dedicação, comprometimento e conhecimentos que adquirimos juntas, mas principalmente pela lealdade e amizade que formamos.

Aos colegas do laboratório de Pesquisa em Patologia, em especial aos técnicos **Teresinha Stein**, **Rosalva Meurer**, **Drª. Keli Reiter** e **Giuliano Rizotto**, pela competência e contribuição na técnica de imuno-histoquímica, além de momentos de descontração e conhecimentos compartilhados.

À **Drª. Lígia Barbosa Coutinho** pela inestimável e valiosa contribuição como patologista e ensinamentos transmitidos.

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

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

Aos **alunos de iniciação científica** do Centro de Neuroendocrinologia, pela valiosa contribuição e troca de conhecimentos.

Ao meu marido, **Fernando Jakoboski de Souza**, meu amor e meu porto seguro. Agradeço por toda a paciência e compreensão diante dos momentos mais difíceis desta jornada, pelo apoio incondicional na vida acadêmica e pessoal.

À minha irmã, **Roberta Trott**, por ser minha grande amiga, trazendo palavras de consolo e alegria nos momentos que mais precisei.

Aos meus pais, **Carlos Eduardo Trott** e **Lisiane Maria Trott,** agradeço a todas as oportunidades e apoio e incentivo que ambos me proporcionaram para que eu trilhasse o caminho acadêmico.

Finalmente, agradeço a todos os **amigos** e **familiares** que se fizeram presentes ao longo desta jornada, trazendo-me alegria.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS VI
LISTA DE FIGURAS VIII
LISTA DE TABELAS IX
RESUMO X

1. Embasamento teórico
1.1. Introdução 12
1.2. Glândula hipófise 13
1.3. Adenomas hipofisários 16
1.2.1. Classificação dos adenomas hipofisários 18
1.2.2. Adenomas hipofisários funcionantes 23
1.2.3 Adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes 26
1.3 Marcadores preditores de recidiva e recrescimento em adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes 31
1.3.1. *Pituitary tumor transforming gene* (PTTG) 32
1.3.2. Densidade microvascular (DMV) 33
1.3.3. Ki-67 35
1.4. Referências bibliográficas 38
2. Objetivos 50
3. Artigo científico redigido em inglês 51
4. Considerações finais 79
5. Anexos 81

Lista de abreviaturas utilizadas

α-LH: Subunidade Alfa do Hormônio Luteinizante

α-FSH: Subunidade Alfa do Hormônio Folículo Estimulante

β-FSH: Subunidade Beta do Hormônio Folículo Estimulante

β-LH: Subunidade Beta do Hormônio Luteinizante

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico

ADH: Hormônio Antidiurético

AHNF: Adenoma Hipofisário Não Funcionante

bFGF: Fator Básico de Crescimento dos Fibroblastos

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico Complementar

CD105: *Cluster of Differentiation Number* 105

CD34: *Cluster of Differentiation Number* 34

DMV: Densidade Microvascular

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

GH: Hormônio do Crescimento

Ki-67: Marcador de Proliferação

IH: Imuno-histoquímica

LH: Hormônio Luteinizante

MAPK: Proteínas Quinase Ativadas por Mitógeno

Mcm2: Proteína Mantenedora de Microssomo 2

MIB-1: Marcador de Proliferação

OMS: Organização Mundial da Saúde

PIT-1: Fator de Transcrição Hipófise-específico 1

PRL: Prolactina

PTTG: Gene Transformador de Tumores Hipofisários

p53: Gene Supressor Tumoral

SF-1: Fator Estereidogênico 1

SSTR: Receptores de Somatostatina

TPIT: Gene T-box 19

TSH: Hormônio Tireotrófico

Lista de Figuras

Figura 1: Representação anatômica da glândula hipófise 16

Figura 2: Representação esquemática da classificação de Hardy para os adenomas hipofisários..... 19

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação clínico-patológica dos adenomas de hipófise.....22

Resumo da Dissertação

Introdução: Adenomas hipofisários não funcionantes (AHNF) são as neoplasias hipofisárias mais prevalentes, podendo levar a complicações por efeito de massa. Por não apresentarem hipersecreção hormonal, não existe marcador único que possa indicar recrescimento ou recidiva, como nos demais adenomas.

Objetivo: Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores PTTG, CD105 e Ki-67 e suas relações com idade, gênero, invasividade, expressão hormonal e recrescimento ou recidiva no seguimento de AHNF operados não submetidos à radioterapia.

Material e Métodos: Foram incluídos 56 pacientes submetidos à cirurgia transesfenoidal. Dados como idade, gênero, tamanho, extensão, invasão, recidiva ou recrescimento foram obtidos dos prontuários. O grau de invasão foi determinado pela classificação de Hardy.

Resultados: A média de idade foi 55,±13,6 anos, sendo 62,5% homens e 68% invasivos. Dos 45 pacientes sob acompanhamento mínimo de 6 meses, 62,2% apresentaram persistência da lesão pós cirúrgica, com recrescimento em 35,7%, (mediana de 17 meses). A taxa de sobrevida livre de recorrência foi de 94,5% (1 ano), 75,4% (2 anos) e 69,1% (3 anos). Nenhum paciente apresentou recidiva. O PTTG foi positivo em 55,3%, com relação estatisticamente significativa com invasividade (p=0,022), idade (p=0,03) e gênero feminino (p=0,002), sem relação com recrescimento. A DMV apresentou relação estatisticamente significativa com gênero masculino (p=0,019), correlação negativa com PTTG (r=0,434; p=0,001), sem relação

com invasividade e recrescimento. O Ki-67 apresentou mediana de 0,7%, (0,1 a 7,6%), com relação estatisticamente significativa com idade (p=0,001) e tendência em relação a recrescimento (p=0,054), sem relação com invasividade.

Conclusão: Em AHNF, encontramos índices maiores de PTTG nos invasivos e mulheres jovens, sem relação com recrescimento. A DMV não se mostrou relacionada à invasividade ou recrescimento. O Ki-67 foi maior nos mais jovens, com tendência em relação a recrescimento. Evidenciamos correlação negativa entre PTTG e DMV. Sugere-se que o PTTG posssa ser utilizado como marcador prognóstico nos AHNF.

Palavras-chave: Adenomas hipofisários não funcionantes, PTTG, densidade microvascular, CD105, Ki-67, imuno-histoquímica

1. Introdução

Os adenomas hipofisários são neoplasias benignas, de crescimento lento, mas um terço deles apresenta potencial invasivo. Os adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes (AHNF) são os mais prevalentes, podendo levar a complicações pelos efeitos de massa tumoral (Asa & Ezzat, 1998; Ntali & Wass, 2018). O tratamento de escolha para AHNF é a cirurgia. Por não apresentarem hipersecreção hormonal, assim como ocorre com os demais adenomas, até o momento, não dispomos de marcadores que possam predizer o recrescimento ou recidiva, apesar de muitos candidatos a marcador (Zhang e cols., 1999a; Fillipella e cols., 2006; Jaffe, 2006; Pizarro e cols., 2009; Dallago e cols., 2010; Raverot e cols., 2018).

O PTTG (gene transformador de tumores hipofisários) é um oncogene cuja superexpressão leva à transformação celular e ao desenvolvimento de tumores (Pei & Melmed, 1997; Zhang e cols., 1999b). Estudos mostram que os adenomas hipofisários apresentam expressão de PTTG aumentada em relação ao tecido hipofisário normal (Minematsu e cols., 2006; Grupetta e cols., 2017; Liu e cols., 2018) e em associação com maior capacidade de invasão (Li e cols., 2014; Xião e cols., 2014).

O CD105 (*cluster of differentiation number 5*) é um antígeno associado à proliferação de células endoteliais, presente nas células de novos vasos formados, sendo o antígeno mais específico para a avaliação da densidade microvascular (DMV) dos mesmos (Vermeulen e cols., 1996; Di Ieva e cols., 2013). Poucos estudos avaliaram a DMV através do CD105 em adenomas hipofisários. Miao e cols. (2016) descreveram que os adenomas possuem

maior DMV que o tecido hipofisário normal, enquanto Rotondo e cols. (2010) acharam menor DMV nos adenomas hipofisários.

O Ki-67 é um antígeno nuclear expresso em células em proliferação, associado com potencial proliferativo e invasividade de neoplasias (Gerdes e cols., 1983). De acordo com dados da OMS, índices de Ki-67 iguais ou maiores que 3% estão associados a adenomas com comportamento agressivo e potencial invasivo (DeLellis e cols., 2004). Em AHNF, alguns estudos associam maiores índices de Ki-67 com recrescimento e invasividade (Ekramullah, 1996; Noh, 2009; Liu, 2016), enquanto outros não (Honegger e cols., 2003; Tanaka e cols., 2003; Dallago e cols., 2010; Pinho e cols., 2011; Steno e cols., 2014; Yao e cols., 2017).

1.1. Glândula hipófise

A hipófise está localizada no osso esfenoide, mais precisamente na cavidade óssea chamada de sela turca. Dentre as glândulas endócrinas, a hipófise possui importância fundamental, pois está envolvida no controle de diversos processos, como o crescimento, desenvolvimento e reprodução do indivíduo, equilíbrio do metabolismo, entre outras funções (Guyton & Hall, 2017). Esta glândula tem a forma de feijão, é simétrica bilateralmente e mede cerca de 13mm transversalmente, pesando em torno de 0,6 g. A hipófise de mulheres é levemente maior do que a de homens, sendo a de multíparas mais pesada do que a de nulíparas. Com a idade há uma redução de tamanho da hipófise de leve a moderada (Asa, 1998).

A hipófise é composta por dois componentes distintos morfológica e funcionalmente: o lobo anterior (adeno-hipófise) e o lobo posterior (neuro-hipófise) (ver Figura 1). A adeno-hipófise constitui 80% da glândula e é composta de três partes: a *pars distalis*, a *pars intermedia* e a *pars tuberalis*. As três porções da adeno-hipófise são embriologicamente derivadas da bolsa de Rathke, uma invaginação endodérmica da cavidade oral primitiva. Esta fração da glândula possui diversos tipos celulares altamente característicos com respeito à estrutura e função e responsáveis pelo controle da liberação de hormônios hipofisários. Os somatotrofos correspondem a aproximadamente 50% das células da adeno-hipófise e produzem hormônio do crescimento (GH). Os lactotrofos, ou células produtoras de prolactina (PRL), representam 15% das células da adeno-hipófise; no entanto, o número destas células mostra ampla variação relacionada com idade, sexo e paridade em mulheres, variando de 9 a 31% (Asa e cols.,1982). Os mamosomatotrofos são células bi-hormonais contendo GH e PRL. Este tipo celular foi incialmente indentificado em tumores hipofisários (Kovacs & Horvath, 1986) e após, descobriu-se ser a célula de origem da PRL na hipófise fetal durante a primeira metade da gestação (Asa e cols., 1988). Os corticotrofos compreendem de 15 a 20% da população celular da adeno-hipófise e são responsáveis por produzir e secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), sendo o primeiro tipo celular a diferenciar-se na hipófise fetal. Seu número não varia com a idade ou alterações no estado hormonal (Asa e cols., 1986; Asa e cols, 1988). Os tireotrofos são o tipo celular menos comum da adeno-hipófise, compreendem a aproximadamente 5% da população celular, sendo responsáveis pela produção do hormônio tireotrófico (TSH). Os gonadotrofos são as células que produzem gonadotrofinas, FSH

(hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) e representam aproximadamente 10% da população celular da adeno-hipófise (Kovacs & Horvath, 1986). Outros tipos celulares incluem: células foliculares, que podem derivar de somatotrofos, lactotrofos ou corticotrofos; células folículo esteladas, com papel de sustentação; *null cells*, células com diferenciação incompleta sem semelhança com os demais tipos celulares da adeno-hipófise e oncócitos, células ricas em mitocôndrias, cujo número parece aumentar com a idade (Horvath & Kovacs, 1988).

A neuro-hipófise ou hipófise posterior compreende o infundíbulo, o talo e o lobo posterior da glândula, que, diferentemente da adeno-hipófise, possui origem neural, a partir do diencéfalo. Esta fração é constituída por células gliais modificadas com função de sustentação (pituícitos) e processos axonais de neurônios cujos corpos celulares estão no hipotálamo, sendo responsável por armazenar e secretar a ocitocina e o hormônio anti-diurético ou vasopressina (ADH), hormônios peptídicos sintetizados pelo hipotálamo e armazenados dentro dos terminais axonais da neuro-hipófise (Maitra, 2010). Em relação à arquitetura celular da neuro-hipófise foram descritos 5 tipos de pituícitos: *light, dark*, granular, ependimal e oncocítico (Takei e cols., 1980; Asa & Ezzat, 2009). Na neuro-hipófise, o sistema de sinalização funciona através de projeções neuronais do hipotálamo, as quais secretam diretamente neurotransmissores e hormônios. A comunicação entre o hipotálamo e a adeno-hipófise acontece de forma mais sofisticada, por meio de um plexo vascular, o sistema porta hipotálamo-hipófise (Guyton & Hall, 2017).

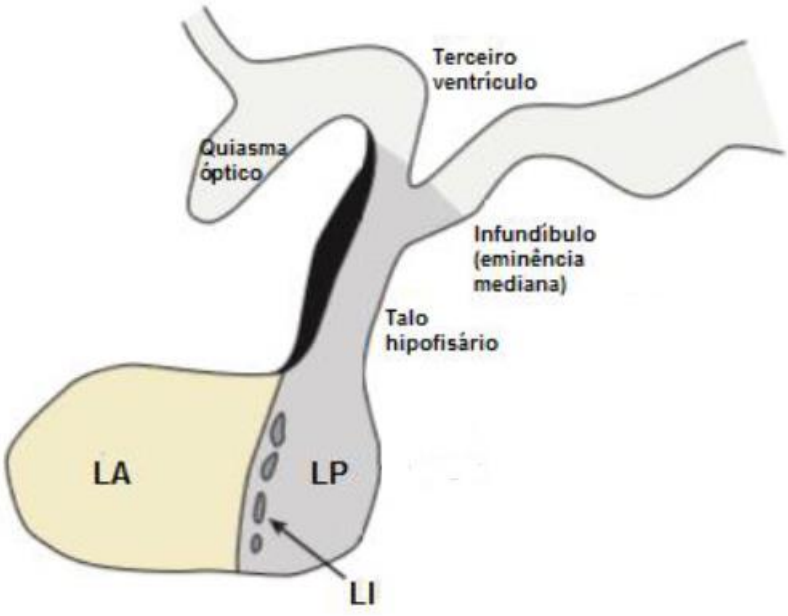


Figura 1: Representação anatômica da glândula hipófise. LA: lobo anterior; LI: lobo intermediário; LP: lobo posterior. Adaptado de Asa & Ezzat, 2009.

1.2. Adenomas hipofisários

Os adenomas hipofisários são os tumores mais comuns da adeno-hipófise, correspondendo a 25% de todas as neoplasias intracranianas (Asa & Ezzat, 2009). Estudos mostram que essas neoplasias constituem proliferações clonais com origem de uma única célula e, atualmente, se aceita que seu desenvolvimento é caracterizado por dois estágios: primeiramente, surgem mutações espontâneas ou induzidas nas células hipofisárias; a seguir, fatores de ativação endógenos ou exógenos promovem extenso crescimento tumoral (Babichev e cols., 2001).

Embora apresentem crescimento lento e sejam consideradas benignas pelo seu baixo potencial metastático, estas lesões exibem uma ampla margem de comportamento funcional e proliferativo, podendo ser altamente invasivas ou letais pela sua capacidade infiltrativa de estruturas adjacentes, ou por complicações metabólicas pelo excesso hormonal (Asa & Ezzat, 2009). Contudo, casos malignos desses tumores são raros e, por não apresentarem um padrão histológico capaz de indicar malignidade, são diagnosticados pela presença de metástases (Kovacs e cols., 2001).

A incidência dos adenomas hipofisários é difícil de ser estabelecida; todavia, dados epidemiológicos recentes indicam que a prevalência dessas neoplasias é cerca de 3/100.000, sendo ambos os sexos igualmente afetados (Asa & Ezzat, 2009; Ostrom e cols., 2013). Com métodos modernos de imagem e análises bioquímicas de atividade hormonal, dados sugerem que os adenomas de hipófise são comuns, ocorrendo em aproximadamente 17% da população geral, sendo sua prevalência aumentada conforme o avanço da idade (Asa & Ezzat, 2009). A incidência dos adenomas hipofisários em autópsias é um achado frequente, podendo alcançar até 30% em indivíduos entre 50 e 60 anos. A grande maioria (mais de 95%) dos adenomas hipofisários não está associada a síndromes familiares (Asa & Ezzat, 1998). A idade média do diagnóstico dos tumores esporádicos é de 30-40 anos, enquanto casos com histórico familiar tendem a desenvolver tumores mais precocemente, ou seja, antes dos 30 anos de idade (Daly e cols., 2006).

1.2.1 Classificação dos adenomas hipofisários

Existem diversas classificações para os adenomas de hipófise:

- **Classificação anatômica/radiológica:** Jules Hardy elaborou a primeira classificação dos adenomas hipofisários em 1969, baseada nas imagens radiológicas, que é utilizada até os dias atuais, validada pela tomografia computadorizada e ressonância magnética. Segundo Hardy, no que diz respeito à extensão e invasão, a classificação dos adenomas inclui quatro graus: grau I ou microadenoma: lesões intra-hipofisárias que medem menos de 1 cm de diâmetro; grau II: adenomas com 1 cm ou mais de diâmetro, mas que são intrasselares ou exibem extensão suprasselar sem causar destruição óssea; grau III: tumores localmente invasivos que podem estar associados a um aumento difuso da sela turca, podendo causar erosão óssea; grau IV: são grandes e invasivos e envolvem estruturas extrasselares incluindo osso, hipotálamo e seio cavernoso (Hardy, 1973). Ver Figura 2. Estes dados são de importância crítica para o cirurgião, quando do planejamento da ressecção tumoral (Asa & Ezzat, 1998).

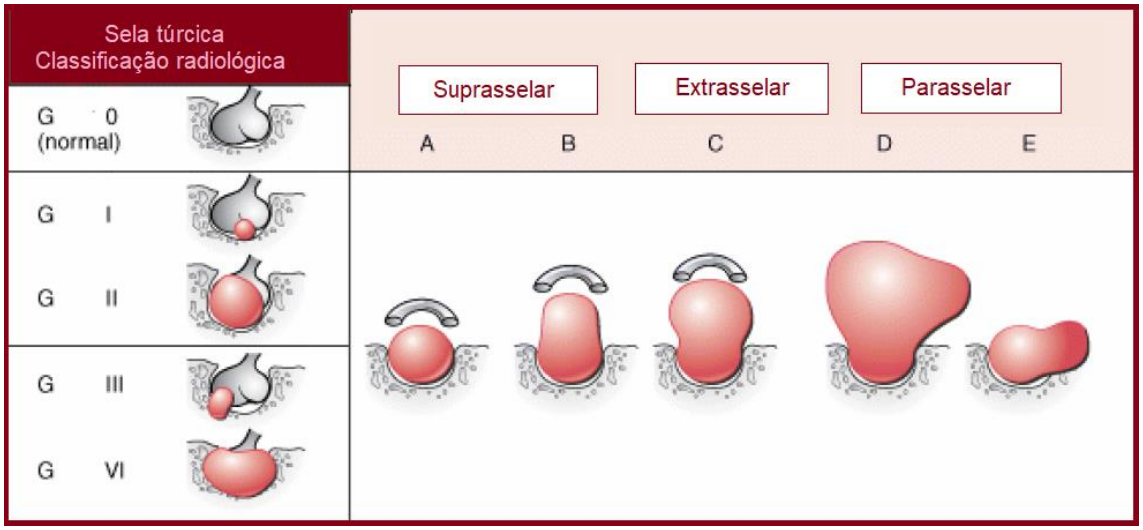


Figura 2: Representação esquemática da classificação de Hardy para os adenomas hipofisários: Graus I e II restritos à sela (não invasivos). Graus III e IV invasivos. Adaptado de Gandhi & Post (2003).

- **Classificação funcional**: Essa abordagem clínica divide os adenomas de acordo com a sua atividade hormonal *in vivo* e os classifica em categorias (Asa & Ezzat, 2009):
    - adenomas produtores de ACTH, associados à síndrome de Cushing ou de Nelson,
    - os produtores de GH, com acromegalia e/ou gigantismo,
    - os produtores de prolactina, com síndrome hiperprolactinêmica,
    - os produtores de TSH, responsáveis por disfunção da tireoide,
    - os raros adenomas detectáveis clinicamente produtores de gonadotrofinas, associados com hipogonadismo, devido à regulação negativa de função e os adenomas clinicamente não-funcionantes .

- **Classificação imuno-histoquímica:** o desenvolvimento desta técnica para a detecção imunológica de antígenos em tecidos revolucionou a patologia geral (Horvath e cols., 1997). Essa classificação se baseia no conteúdo hormonal expresso com informações adicionais de imunorreatividade de fatores de transcrição e queratinas (Asa & Ezzat, 2009).

- **Classificação histológica:** O diagnóstico histológico dos adenomas de hipófise anterior à era da imuno-histoquímica (IH) e microscopia eletrônica era um exercício frustante e infrutífero. Os tumores eram classificados como acidófilos, basófilos e cromófobos usando corantes convencionais. Adenomas acidófilos eram associados com acromegalia ou gigantismo, adenomas basófilos com doença de Cushing e os tumores cromófobos eram considerados não funcionantes do ponto de vista endocrinológico. Entretanto, o valor desta classificação foi questionado quando se mostrou óbvio que alguns adenomas cromófobos estavam associados com a sintomatologia clínica do excesso hormonal e alguns adenomas basófilos ou acidófilos eram clinicamente inativos. A aplicação de técnicas histoquímicas, mais sofisticadas em termos de coloração, levou à melhora da classificação destes adenomas, mas esta técnica mostrou-se ainda relativamente pouco sensível, inespecífica e, portanto, incerta (Asa & Ezzat, 1998).

- **Classificação ultra estrutural:** A microscopia eletrônica é útil para caracterizar a diferenciação citológica das células tumorais. A aplicação desta tecnologia, combinada com a imunolocalização dos hormônios com microscopia óptica e eletrônica, permite correlação de função e estrutura que

fornece a base para a classificação morfológica. Este tipo de análise pemite o reconhecimento de características subcelulares específicas de somatotrofos, mamosomatotrofos, lactotrofos, tireotrofos, corticotrofos e gonadotrofos (Kovacs & Horvath, 1986).

- **Classificação clínico-patológica:** É o esquema que permite uma melhor identificação entre estrutura e função e utiliza tanto características clínicas quanto morfológicas. Ver Tabela 1. Geralmente, o comportamento agressivo é um fenômeno de adenomas silenciosos e adenomas pluri-hormonais não usuais, assim como os raros adenomas lactotróficos com imunorreatividade para o GH conhecidos como adenomas de células tronco acidófilos (Asa & Ezzat, 1998).

Tabela 1: Classificação clínico-patológica dos adenomas de hipófise

Funcionantes	Não funcionantes
Família GH-PRL-TSH	
Adenomas que causam excesso de GH	
Adenomas somatotróficos densamente granulados	
Adenomas somatotróficos esparsamente granulados	Adenomas somatotróficos silenciosos
Adenomas mamossomatotróficos	
Adenomas causadores de hiperprolactinemia	
Adenomas lactotróficos	Adenomas lactototróficos silenciosos
Adenoma acidófilo de células tronco	
Adenomas causadores de excesso de TSH	
Adenomas tireotróficos	Adenomas tireotróficos silenciosos
Família ACTH	
Adenomas causadores de excesso de ACTH	
Adenomas corticotróficos densamente granulados	Adenomas corticotróficos silenciosos (tipo I)
Adenomas corticotróficos esparsamente granulados	Adenomas corticotróficos silenciosos (tipo II)
Família das Gonadotrofinas	
Adenomas causadores de excesso de gonadotrofinas	
Adenomas gonadotróficos	Adenomas gonadotróficos silenciosos (*null cell* adenomas, oncocitomas)
Adenomas não classificados	
Adenomas plurihormonais incomuns	Adenomas imunonegativos

Adaptado de Asa & Ezzat (2009)

1.2.2 Adenomas hipofisários funcionantes

- **Adenomas somatotróficos:** São tumores que derivam de células produtoras de GH e somam em torno de 10-15% de todos os adenomas hipofisários. O excesso deste hormônio em adultos se manifesta como acromegalia ou gigantismo, quando ocorre antes do fechamento das epífises ósseas. Em alguns pacientes com macroadenomas pode haver hiperprolactinemia, resultante da compressão da haste; todavia, é mais frequente pela cossecreção de PRL pelo tumor. Existem vários subtipos morfológicos de adenomas somatotróficos, que refletem mecanismos patogênicos distintos. Os adenomas somatotróficos densamente granulados são os mais comuns em adultos acromegálicos e os mamosomatotróficos, que produzem tanto GH como PRL, são achados mais frequentes em pacientes com gigantismo no início da infância e jovens com acromegalia. Ambos os tipos tumorais são compostos por células acidófilas, que assemelham-se a somatotrofos e mamossomatotrofos normais. Essas células tumorais possuem imunorreatividade para GH citoplasmática forte e difusa e nuclear forte. Adenomas mamossomatotróficos tem imunorreatividade variada para PRL e estrógeno. Os adenomas somatotróficos esparsamente granulados são compostos por células com pleomorfismo e corpos fibrosos, que não se parecem com células hipofisárias normais, com imunorreatividade para GH frequentemente focal e fraca (Asa & Ezzat, 1998).

- **Adenomas corticotróficos:** O excesso de ACTH causado por adenoma corticotrófico é conhecido por doença de Cushing, que representa

uma variante da síndrome de Cushing, resultante de qualquer causa de excesso de glicocorticoides. Existem três variantes reconhecidas, que juntas perfazem aproximadamente 10-15% dos adenomas hipofisários: adenomas corticotróficos densamente granulados, esparsamente granulados e adenomas de células de Crooke. A causa endógena mais comum da síndrome de Cushing é um microadenoma corticotrófico densamente granulado (Asa & Ezzat, 1998). Esses tumores são pequenos e de difícil visualização com ressonância magnética. Pacientes com menor excesso hormonal geralmente apresentam macroadenomas corticotróficos esparsamente granulados. Adenomas de células de Crooke são raros e exibem alterações hialinas de Crooke (Asa & Ezzat, 1998).

- **Adenomas lactotróficos:** São tumores provenientes das células secretoras de prolactina, também conhecidos como prolactinomas. Embora sejam os adenomas hipofisários mais prevalentes e somem aproximadamente a metade dos encontrados acidentalmente em necropsias, sua incidência em séries cirúrgicas é muito menor, fato que se justifica por grande parte dos pacientes com esses tumores receberem tratamento medicamentoso. Os prolactinomas são mais comuns em mulheres, as quais tendem a apresentá-los em uma idade mais jovem, associados a distúrbios hormonais. Os homens normalmente apresentam o tumor em idade mais avançada, com maior tamanho, que com mais frequência resulta em efeitos de massa e hipopituitarismo secundário à destruição adeno-hipofisária (Delgrange e cols., 1997). Existem três variantes de prolactinomas: adenomas lactotróficos esparsamente granulados, os densamente granulados e os adenomas

acidófilos de células tronco, que são raros, porém agressivos. Os adenomas lactotróficos esparsamente granulados são a variante mais comum. Células tumorais cromofóbicas que relembram lactotrofos não tumorais mostram imunorreatividade forte para PRL (Asa & Ezzat, 1998). Os adenomas lactotróficos densamente granulados são muito menos comuns e compostos por células acidófilas que exibem positividade citoplasmática difusa para PRL. Os adenomas acidófilos de células tronco são compostos por células oncocíticas com mitocôndrias gigantes. Esses tumores podem ter perfil bi-hormonal difuso, com imunorreatividade difusa para PRL e escassa para GH. Corpos fibrosos semelhantes aos encontrados nos adenomas somatotróficos esparsamente granulados são encontrados nesse subtipo, porém em menor quantidade (Asa & Ezzat, 1998).

- **Adenomas gonadotróficos:** Estes tumores são principalmente diagnosticados em homens de meia idade sem história prévia de disfunção gonadal. Quando ocorrem em mulheres, muitas vezes são mal diagnosticados, uma vez que mulheres pós-menopáusicas apresentam gonadotrofinas fisiologicamente elevadas, sendo os tumores considerados não funcionantes. Esses adenomas mostram imunorreatividade varíavel e frequentemente focal para subunidade α e β-FSH e β-LH. É comum esses adenomas exibirem uma ampla gama de diferenciação celular (Asa & Ezzat, 1998).

- **Adenomas tireotróficos:** São o subtipo de adenoma funcionante mais raro, perfazendo apenas 1% de todas as neoplasias hipofisárias. Pacientes com excesso de TSH decorrente de adenoma tireotrófico podem exibir

características de hiper ou hipotireoidismo ou podem ser eutireoideos. Como a maioria dos adenomas tireotróficos são macroadenomas invasivos, efeitos de massa e distúrbios visuais são comuns em pacientes com esse tipo de tumor. Estes macroadenomas são compostos por células poligonais com processos alongados que se assemelham a tireotrofos não tumorais, mas que frequentemente exibem polimorfismo nuclear (Asa & Ezzat, 1998).

1.2.3 Adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes

Os tumores hipofisários que não apresentam atividade hormonal clinicamente detectável são denominados adenomas clinicamente não-funcionantes (AHNF), responsáveis por 14-54% dos tumores da hipófise. A prevalência dessas neoplasias é estimada entre 10-25% da população, com leve predominância pelo sexo masculino, sendo o pico de incidência entre 40 e 80 anos (Day e cols., 2009; Greenman & Stern, 2009, Brochier e cols., 2010, Grupetta e cols., 2013, Ntali & Wass, 2018).

Mesmo não ocasionando hipersecreção clínica, os AHNF frequentemente produzem um ou mais hormônios ou subunidades de hormônios glicoproteicos. Técnicas moleculares e imuno-histoquímicas mostram que a maioria dos AHNF tem diferenciação gonadotrópica, expressando LH e FSH. O restante pode expressar outros hormônios, incluindo ACTH (adenomas corticotrópicos silenciosos), GH (adenomas somatrotópicos silenciosos), PRL (adenomas lactotróficos silenciosos) e TSH (adenomas tireotróficos silenciosos). Apenas uma pequena fração dos AHNF não possui

evidência de tipos celulares produtores de hormônios e são chamados de adenomas *null cell* (Asa & Ezzat, 1998). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou nova classificação patológica dos adenomas hipofisários (Lopes, 2017) na qual, além dos marcadores imuno-histoquímicos, fatores de transcrição podem ser usados para classificar os adenomas em três grupos: linhagem acidófila, positivos para PIT-1 (fator de transcrição hipófise-específico 1) (adenomas somatotróficos, lactotróficos e tireotróficos), positivos para SF-1 (fator estereidogênico 1) (gonadotróficos) e positivos para TPIT (gene T-box 19) (corticotrópicos). Nesta nova classificação, os adenomas *null cell* são definidos como lesões imunonegativas para hormônios e também para os fatores de transcrição (PIT-1, SF-1 e TPIT), evidenciando a ausência de linhagem celular definida (Lopes, 2017; Mete & Lopes, 2017; Delgado-Lopez e cols., 2018). Utilizando esta classificação, Castinetti e cols. (2015) observaram aproximadamente 2% dos AHNF estudados sem diferenciação de linhagem celular (*null cell)*.

Apesar de serem caracterizados como neoplasias de crescimento lento e não estarem associados a síndromes hipersecretórias, os AHNF podem apresentar potencial invasivo e levar a complicações pelo aumento de massa tumoral, visto que o diagnóstico geralmente é feito quando o tumor já atingiu volume suficiente para comprimir estruturas adjacentes, sobretudo o quiasma óptico, provocando perda visual, sendo mais de 60% dos AHNF macroadenomas (>1cm de diâmetro). Um dos sintomas mais frequentes é o hipopituitarismo, observado em 37-85% dos casos, decorrente da extensa destruição tecidual, além de cefaleia, em 19-75%. Outros sintomas incluem diminuição de libido, disfunção sexual, amenorreia ou oligomenorreia, podendo,

ainda, ser assintomáticos (Dekkers e cols., 2006; Asa & Ezzat, 2009; Brochier e cols., 2010, Ntali & Wass, 2018). Chanson e cols. (2015) descrevem que 60-80% dos pacientes diagnosticados com AHNF apresentam pelo menos uma deficiência hipofisária, sendo a gonadotrófica a mais prevalente, seguida por somatotrófica e tireotrófica.

A abordagem para o diagnóstico dos AHNF inclui imagem de ressonância magnética da região selar, avaliações laboratoriais, pesquisa de hipersecreção hormonal e hipopituitarismo e exames de campo visual (Ntali & Wass, 2018).

Os AHNF levam a taxas de mortalidade 3,6 vezes maiores que a da população em geral. Dentre as principais causas estão doenças cardio e cerebrovasculares, infecções e malignidades (Dekkers e cols., 2006; Ntali e cols., 2016). Estudos descrevem que a idade ao diagnóstico mostrou-se como único fator preditor independente significativo de mortalidade, enquanto hipopituitarismo, manejo de déficits hormonais, radioterapia, sexo, apoplexia aguda, invasão do seio cavernoso, extensão da remoção e deficiência de FSH e LH não tratada não afetaram a mortalidade (Tomlinson e cols., 2001; Chang e cols., 2008; Ntali e cols., 2016).

O tratamento dos AHNF é individualizado, baseado na conduta observacional, na cirurgia ou radioterapia isoladas, assim como na cirurgia associada à radioterapia ou a drogas. Há indicação cirúrgica na presença de sintomas compressivos ou decorrentes do aumento da massa tumoral. A cefaleia causada pelo adenoma pode ser uma indicação para cirurgia não emergencial, mas o paciente deve estar ciente de que o alívio pode não ser garantido (Chanson e cols., 2015). Os distúrbios visuais também são uma

indicação para cirurgia, visto que a melhora da visão é relatada em 80 a 90% dos casos, ainda que a recuperação completa não possa ser garantida (Chanson e cols., 2015). O hipopituitarismo deve ser levado em consideração para o tratamento cirúrgico, sendo a recuperação pós-operatória incerta (cerca de 30% dos casos), com um risco de 5-10% de hipopituitarismo agravado ou induzido pela cirurgia. O risco de início de diabetes insipidus definitivo é inferior a 5% (Chanson e cols., 2015).

A via de acesso para os adenomas com pequena ou moderada extensão suprasselar é a transesfenoidal; porém, na presença de extensão suprasselar significativa, pode ser necessária a utilização da via transcraniana ou ambas (Abucham e cols., 2005). Ao se analisar séries cirúrgicas, observa-se a predominância da via transesfenoidal, sendo considerada o tratamento mais frequente (Brochier e cols., 2010). Apesar do progresso da técnica neurocirúrgica, observa-se frequentes ressecções parciais, decorrentes do tamanho e da invasividade do AHNF, sendo a presença de tumor residual associada a alto risco de recrescimento (Chanson e cols., 2015), principalmente nos adenomas que crescem lateralmente ao seio cavernoso, onde a presença de estruturas vasculares e neurais impede a remoção completa do tumor (Jane & Laws, 2003). Nestes casos, os índices de recrescimento são altos, até 73% em ressecções não seguidas por radioterapia (Woolons e cols., 2000). Além disso, mesmo após a remoção completa do tumor, a recorrência é relatada, com taxas que variam de 12-58% em cinco anos (Greenman e cols., 2003; Dekkers e cols., 2006; Ferrante e cols., 2006; O´Sullivan e cols., 2009). Outros fatores indicativos de recidiva e recrescimento em AHNFs incluem idade mais jovem, gênero e tamanho tumoral inicial

(Raverot e cols., 2018). Contudo, permanecem questões acerca de quais fatores influenciam os resultados pós operatórios e de como predizer o recrescimento dos tumores residuais. Em ambos os casos, o tratamento complementar como reintervenção cirúrgica, radioterapia e tratamento medicamentoso pode ser indicado (Cortet-Rudelli e cols., 2015).

Alguns centros consideram a radioterapia imediata após cirurgia com o objetivo de prevenir o recrescimento do tumor, mas essa abordagem pode aumentar o risco de complicações como o hipopituitarismo, doenças cerebrovasculares, disfunções neurocognitivas, dano ao quiasma óptico e tumores cerebrais secundários (Brada e cols., 2002; Erfurth e cols., 2002; Ayuk & Stewart, 2009; Fernandez e cols., 2009). Portanto, seu uso deve ser pensado de maneira individual e de acordo com os riscos associados.

A terapia medicamentosa com agonistas da dopamina ou análogos da somatostatina possui impacto variado e limitado sobre a recorrência tumoral (Colao e cols., 2008). Neste aspecto, na ausência de sintomas de massa, o objetivo do tratamento deve se basear na estabilização e prevenção do crescimento do tumor, e não na redução do seu tamanho (Greenman e cols., 2005). O tratamento com agonistas da dopamina mostra-se eficiente, levando a uma estabilização do tamanho tumoral e à prevenção de cirurgia e radioterapia adicionais; contudo, são necessários mais estudos contemplando maior número de pacientes e maior tempo de acompanhamento para sua comprovação (Greenman & Stern, 2015). Em relação aos agonistas de receptores de somatostina (SSTR), apesar de não apresentarem eficácia clínica sobre a redução tumoral, o desenvolvimento de ligantes específicos do SSTR3, o receptor mais prevalente nos AHNFs, pode ser importante.

Recentemente, o agente alquilante temozolamida mostrou-se como adição ao tratamento para AHNF recorrentes agressivos, sendo até o momento uma alternativa promissora, mas ainda experimental para esses pacientes (Even-Zohar & Greenman, 2018).

1.3 Marcadores preditores de recidiva e recrescimento em adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes

Em contraste com os adenomas funcionantes, nos quais as características clínicas e hormonais permitem o acompanhamento e o aumento dos mesmos podem ser indicativos de recidiva ou recrescimento do tumor, os AHNF representam um desafio terapêutico, pois não apresentam alterações hormonais a serem observadas.

Atualmente, não dispomos de marcador único capaz de predizer a progressão da doença e orientar a terapêutica destes pacientes (Manojlovic-Gacic e cols., 2018). Desse modo, estudam-se marcadores capazes de indicar maiores chances de recidiva ou recrescimento destas neoplasias. Dentre eles, destacam-se proteínas e genes envolvidos no ciclo celular como Ki-67, Mcm2 (proteína mantenedora de microssomo 2), PTTG e MAPK (proteínas quinase ativadas por mitógeno), genes supressores tumorais, como o *p53*, além de fatores angiogênicos, como CD34 e CD105 [*clusters of differentiation* (CD)] (Noh e cols., 2009; Dallago e cols., 2010; Ramirez e cols., 2012; Di Ieva e cols., 2013).

1.3.1 *Pituitary tumor transforming gene* (*PTTG*)

O gene *PTTG*, ou gene transformador de tumores hipofisários, localizado no cromossomo 5q33, foi isolado de células tumorais hipofisárias de ratos (Pei & Melmed, 1997). A superexpressão do cDNA do *PTTG* causa transformação celular e indução tumoral, indicando um comportamento de oncogene. Mostra-se altamente expresso em linhagens celulares de tumores malignos humanos (Zhang e cols., 1999a), com papel regulador na separação das cromátides-irmãs durante a mitose e envolvimento na regulação do ciclo celular (Zou e cols., 1999).

O *PTTG* vem sendo estudado na tumorigênese hipofisária, mostrando-se envolvido tanto como um fator ativador de transcrição, quanto na progressão tumoral, regulando a produção do fator básico de crescimento dos fibroblastos (b-FGF), um potente ativador da angiogênese e mitogênese (Zhang e cols., 1999b).

Estudos utilizando a técnica de IH encontraram altos índices de PTTG na maioria dos adenomas hipofisários, mas índices baixos ou ausentes em tecido hipofisário normal (Minematsu e cols., 2006; Grupetta e cols., 2017; Liu e cols., 2018). Em relação à localização, a maioria dos estudos com IH em adenomas hipofisários descreve expressão citoplasmática de PTTG, com predominância de marcação paranuclear (Tena-Suck e cols., 2008; Salehi e cols., 2010; Ozkaya e cols., 2016). O grupo de Wierinckx observou que adenomas com características agressivas expressavam PTTG tanto no núcleo, como no citoplasma, com níveis maiores, enquanto os sem estas características, apresentavam somente expressão citoplasmática e com índices

menores, sugerindo que a superexpressão de PTTG e sua translocação do citoplasma para o núcleo podem estar relacionadas com agressividade (Wierinckx e cols., 2007).

Outros trabalhos estudaram o papel do PTTG em séries de adenomas funcionantes e não funcionantes, analisando a influência da idade, (Filipella e cols., 2006; Ozakaya e cols., 2016; Wierzbicka-Tutka e cols., 2016; Grupetta e cols., 2017; Liu e cols., 2018), gênero (Filipella e cols., 2006; Ozkaya e cols., 2016; Liu e cols., 2018), invasividade (Jia e cols., 2013; Li e cols., 2014; Xiao e cols., 2014), recidiva ou recrescimento, (Raverot e cols., 2015; Wierzbicka-Tutka e cols., 2016; Liu e cols., 2018), com resultados não conclusivos. Até o momento, somente os estudos de Noh e cols. (2009) e Ramirez e cols. (2012) analisaram a expressão do PTTG em séries exclusivas de AHNF. Em relação à correlação entre PTTG e Ki-67 em adenomas hipofisários, há discordância entre os achados descritos na literatura (Filipella e cols., 2006; Minematsu e cols., 2006; Ramirez e cols., 2012; Ozkaya e cols., 2016; Wierzbicka-Tutka e cols., 2016; Grupetta e cols., 2017).

1.3.2 Densidade microvascular (DMV)

Angiogênese é o surgimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes e possui importância tanto em processos fisiológicos, como patológicos, a exemplo do crescimento tumoral. A proliferação neoplásica depende da formação de novos vasos para suprir a demanda celular de

nutrientes e oxigênio, assim como a remoção de produtos metabólicos (Folkman, 1990).

A DMV representa uma medida de angiogênese, definida como o número de vasos sanguíneos por milímetro quadrado (mm^2) na área mais densamente vascularizada ou em pontos aleatórios (Weidner e cols., 1991), podendo ser um indicador de prognóstico do comportamento tumoral (Zhang e cols., 2011). Na maioria das neoplasias, a DMV se correlaciona com agressividade, pior prognóstico, presença de metástases, menor resposta ao tratamento e menor taxa de sobrevida (Weidner e cols., 1991; Bochner e cols., 1995; Gasparini e cols., 1995).

A IH demonstrou-se o método mais útil para a detecção de microvasos em amostras histológicas. Atualmente, os marcadores vasculares mais utilizados são o CD34 e CD105, glicoproteínas ligadas às membranas e expressas em células endoteliais (Rotondo e cols., 2010). O CD105, também conhecido por endoglina, por ser um marcador específico para avaliação de neovascularização tumoral em vários tecidos, é preferencial ao CD34, marcando somente vasos anormais produzidos pelo tumor (Rotondo e cols., 2010; Nassiri e cols., 2011; Di Ieva e cols., 2013).

As neoplasias benignas geralmente são pouco vascularizadas, mas com vasos anormais e frágeis (Ellis & Fidler, 1996). Em adenomas hipofisários, poucos estudos avaliaram o CD105, devendo ser estabelecido seu papel nestas neoplasias. Miao e cols. (2016) encontraram maior média de novos vasos na hipófise normal em relação ao tecido tumoral. Outros acharam maior DMV nos adenomas do que na hipófise (Pizarro e cols., 2009; Rotondo e cols., 2010).

Estudos publicados não apresentam uniformidade nos métodos de avaliação dos microvasos através do CD105. Alguns utilizam a contagem manual de microvasos nos *hot spots*, considerando o maior valor ou a média de valores encontrados, outros apresentam avaliação sob diferentes aumentos microscópicos. O método de Chalkley, no qual uma grade é acoplada à lente no aumento de 200X, é considerado o padrão ouro para contagem de microvasos (Vermeulen e cols., 1996). Os estudos de Lee e cols. (2011) e Miao e cols. (2016) avaliaram a expressão de CD105 através deste método em adenomas hipofisários.

Não existem na literatura, até o momento, estudos relacionando o PTTG com a DMV medida através do CD105 em AHNF.

1.3.3 Ki-67

O Ki-67 é um antígeno nuclear, cujo anticorpo foi descrito em 1983, expresso em células em proliferação em todas as fases do ciclo celular, exceto G_0, distinguindo-as das quiescentes (Gerdes e cols., 1983), sendo sua expressão associada com o potencial proliferativo, invasividade e prognóstico de neoplasias (Gerdes, 1990).

A avaliação do Ki-67 pela técnica de IH, geralmente com o anticorpo monoclonal MIB-1, é essencial para a avaliação da proliferação, não mostrando diferenças significativas nos seus índices entre os adenomas funcionantes e os AHNF (Jaffrain-Rea e cols., 2002).Os adenomas hipofisários são neoplasias predominantemente benignas, de crescimento lento e apresentam baixo índice

de expressão de Ki-67. Em estudos com AHNF, as medianas do índice de Ki-67 foram 0,88, 1,49 e 2,15% (Dallago e cols., 2010; Ramirez e cols., 2012; Vieira-Neto e cols., 2015) respectivamente, enquanto outros descrevem médias de 1,3 a 2,4% (Losa e cols., 2000; Honegger e cols., 2003; Nishioka e cols., 2012). De acordo com dados da OMS, índices de Ki-67 iguais ou maiores que 3% estão associados a adenomas hipofisários com comportamento agressivo e potencial invasivo (DeLellis e cols., 2004). No entanto, esta classificação foi recentemente reformulada, sem consenso do ponto de corte de Ki-67 capaz de indicar o risco de recorrência tumoral (Lloyd e cols., 2017).Em estudos com AHNF,Dallago e cols. (2010) e Landeiro e cols. (2015) descrevem de 9,75 a 14,28% das amostras com Ki-67 igual ou maior que 3%.

Estudos prévios analizaram as relações entre os índices de Ki-67 e idade, gênero, expressão hormonal, invasividade, recrescimento ou recidiva tumoral em AHNF, entretanto, os achados não são homogêneos. Ao se avaliar a influência da idade, descrevem relação inversa, sendo o índice de proliferação maior nos pacientes mais jovens (Yonezawa e cols., 1997; Losa e cols., 2000; Jaffrain-Rea e cols., 2002; Tanaka e cols., 2003). O gênero não mostrou influência nos índices de Ki-67 (Losa e cols., 2000; Nishioka e cols., 2012). O grupo de Ramirez não encontrou relação estatisticamente significativa entre Ki-67 e expressão hormonal (Ramirez e cols., 2012), enquanto Nishioka e cols. (2012) observaram relação estatisticamente significativa entre o Ki-67 e os adenomas sem expressão hormonal e corticotrópicos silenciosos, com índices de Ki-67 menores que nos demais AHNF. A maioria dos estudos não observou relação estatisticamente significativa entre os índices de Ki-67 e a invasividade (Honnegger e cols., 2003; Tanaka e cols., 2003; Dallago e cols.,

2010; Pinho e cols., 2011; Steno e cols., 2014), mas Liu e cols. (2016) encontraram Ki-67 maior nos AHNF invasivos. Ao analisar o recrescimento tumoral, Yao e cols.. (2017) não observaram relação estatisticamente significativa com os índices de Ki-67, enquanto outros demonstraram que o recrescimento tumoral mostrou-se relacionado a índices de Ki-67 mais elevados (Ekramullah, 1996; Noh, 2009). Estudos com AHNF revelaram que o índice proliferativo de Ki-67 permanece como o segundo parâmetro na predição de recorrência, após a invasão de estruturas adjacentes (Righi e cols., 2012).

O grupo de Pesquisa em Neuroendocrinologia já tem duas décadas de experiência em avaliação tecidual em tumores hipofisários e o presente estudo pretende ampliar os conhecimentos referentes à expressão de marcadores de tumorigênese, angiogênese e proliferação celular e sua influência na invasividade, recidiva ou recrescimento tumoral dos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes operados e não submetidos à radioterapia.

A investigação destes marcadores permitirá a continuidade e a ampliação de uma linha de pesquisa consolidada.

1.4. Referências Bibliográficas

Abucham J, Oliveira JHA, Nogueira RG. Avaliação e tratamento das massas selares. In: Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, Elias LCK, Castro M. Neuroendocrinologia básica e aplicada. 1ªed. São Paulo, Brasil: Editora Guanabara Koogan; 2005. p. 515-548.

Asa SL, Penz G. Fovacs K. Ezrin C. Prolactin cells in the human pituitary: a quantitative immunocytochemical analysis. Arch Pathol Lab Med. 1982 Jul;106(7): 360-363.

Asa SL, Kovacs K, Laszlo FA, Dokomos I, Ezrin C. Human fetal adenohipophysis. Histologic and immunocytochemical analysis. Neuroendocrinology. 1986 Sep;43(3):308-316.

Asa SL, Kovacs K, Horvath E. Human fetal adenohypophysis. Electron microscopic and ultrastructural immunocytochemical analysis. Neuroendocrinology. 1988 Oct;48(4):423-31.

Asa SL. Atlas of Tumor Pathology: Tumors of the pituitary gland. Washington, DC: Armed Fources Institute of Pathology, 1998. p. 47-147.

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

Asa SL & Ezzat S. The Pathogenesis of Pituitary Tumors. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2009 Feb;4:97-126.

Ayuk J & Stewart PM. Mortality following pituitary radiotherapy. Pituitary. 2009 Mar;12(1):35-39.

Babichev VN, Marova EI, Kuznetsova TA, Adamskaya IV, Shishkin IV, Kasumova SY. Role of Sex hormones in development of pituitary adenomas. Bull Exp Biol Med. 2001 Apr;131(4):309-311.

Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, *et al*. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. J Natl Cancer Inst. 1995 Nov 1;87(21):1603-1612.

Brada M, Ashley S, Ford D, Traish D, Burchell L & Rajan B. Cerebrovascular mortality in patients with pituitary adenoma. Clin Endocrinol. 2002 Dec;57(6):713-717.

Brochier S, Galland F, Kujas M, Parker F, Gaillard S, Raftopoulos C, *et al.* Factors predicting relapse of nonfunctioning pituitary macroadenomas after neurosurgery: a study of 142 patients. Eur J Endocrinol. 2010 Aug;163(2):193-200.

Castinetti F, Dufour H, Gaillard S, Jouanneau E, Vasiljevic A, Villa D, *et al.* Non-functioning pituitary adenoma: when and how to operate? What pathologic criteria for typing? Ann Endocrinol. 2015 Jul;76(3):220-227.

Chang EF, Zada G, Kim S, Lamborn KR, Quinones-Hinojosa A, Tyrrell JB, *et al*. Long-term recurrence and mortality after surgery and adjuvant radiotherapy for non-functional pituitary adenomas. J Neurosurg. 2008 Apr;108(4):736-745.

Chanson P, Raverot G, Castinetti F, Cortet-Rudelli C, Galland F, Salenave S. Management of clinically non-functioning pituitaru adenoma. Ann Endocrinol. 2015 Jul;76(3):239-247.

Colao A, Somma C, Pivonello R, Faggiano A, Lombardi G, Savastano S. Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas. Endocr Relat Cancer. 2008 Dec;15(4):905-915.

Cortet-Rudelli C, Boneville JF, Borson-Chazot F, Clavier L, Dequéant BC, Desailloud R, *et al.* Post-surgical management of non-functioning pituitary adenoma. Ann Endocrinol. 2015 Jul;76(3):228-238.

Dallago CM, Barbosa-Coutinho LM, Ferreira NP, Meurer R, Pereira-Lima JF, Oliveira MC. Determination of Cell Proliferation Using Mcm2 Antigen and

Evaluation of Apoptosis and TGF-*β*1 Expression in GH-secreting or Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas. Endocr Pathol. 2010 Mar;21(1):32-39.

Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA, Beckers A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. J Clin Endocrinol Metab*.* 2006 Dec;91(12):3316-3323.

Day PF, Loto MG, Glerean M. Incidence and prevalence of clinically relevant pituitary adenomas: retrospective cohort study in a Health Management Organization in Buenos Aires, Argentina. Arch Endocrinol Metab. 2009 Nov-Dec;60(6):554-561.

Dekkers OM, Pereira AM, Roelfsema F, Voormolen JH, Neelis KJ, Schroijen MA, Smit JW & Romijn JA. Observation alone after transsphenoidal surgery for nonfunctioning pituitary macroadenoma. J Clin Endocrinol Metab. 2006 May;91(5):1795-1801.

DeLellis R, Lloyd R, Heitz P, Eng C. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon, France: IARC Press; 2004.

Delgado-López PD, Barrio P, Dueñas-Polo MT, Pascual-Llorente M, Gordón-Bolaños MC. Recurrent non-functioning pituitary adenomas: a review on the new pathological classification, management guidelines and treatment options. Clin Tranl Oncol. Epub 2018 Apr 5. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s12094-018-1868-6.

Delgrange E, Trouillas J, Maiter D, Donckier J, Tourniaire J. Sex-related difference in the growth of prolactinomas: a clinical and proliferation marker study. J Clin Endocrinol Metab. 1997 Jul;82(7):2102-2107.

Di Ieva A, Weckman A, Di Michele J, Rotondo F, Grizzi F, Kovacs K, *et al.* Microvascular morphometrics of the hypophysis and pituitary tumors: From bench to operating theatre. Microvasc Res. 2013 Sep;89;7-14.

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

Ellis LM & Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. Eur J Cancer. 1996 Dec;32A(14):2451-2460.

Erfurth EM, Bulow B, Svahn-Tapper G, Norrving B, Odh K, Mikoczy Z, *et al.* Risk factors for cerebrovascular deaths in patients operated and irradiated for pituitary tumors. J of Clin Endoc Metab. 2002 Nov;87(11):4892-4899.

Even-Zohar N & Greenman Y. Management of NFAs: medical treatment. Pituitary. 2018 Apr;21(2);168-175.

Fernandez A, Brada M, Zabuliene L, Karavitaki N, Wass JA. Radiation-induced hypopituitarism. Endocr Relat Cancer. 2009 Sep;16(3):733-772.

Ferrante E, Ferraroni M, Castrignano T, Menicatti L, Anagni M, Reimondo G, *et al.* Non-functioning pituitary adenoma database: a useful resource to improve the clinical management of pituitary tumors. Eur J Endocrinol. 2006 Dec;155(6):823-829.

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

Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenis dependent? J Natl Cancer Inst. 1990 Jan;82(1):4-6.

Gandhi CD & Post K D. Neoplasms of the Endocrine Glands: Pituitary Neoplasms. In: Cancer Medicine, 6th ed, Boston, Massachussetts; 2003.

Gasparini G, Bevilacqua P, Bonoldi E, Testolin A, Galassi A, Verderio P, *et al*. Predictive and prognostic markers in a series of patients with head and neck squamous cell invasive carcinoma treated with concurrent chemoradiation therapy. Clin Cancer Res. 1995 Nov;1(11):1375-1383.

Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. Semin Cancer Biol. 1990 Jun;1(3):199-206.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer. 1983 Jan 15;31(1):13-20.

Greenman Y, Ouaknine G, Veshchev I, Reider-Groswasser II, Segev Y, Stern N. Postoperative surveillance of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas: markers of tumour quiescence and re-growth. Clin Endocrinol. 2003 Jun;58(6):763-769.

Greenman Y & Stern N. Non-functioning pituitary adenomas. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2009 Oct;23(5):625-638.

Greenman Y & Stern N. Optimal management of non-functioning pituitary adenomas. Endocrine. 2015 Jul:50(1):51-55.

Greenman Y, Tordjman K, Osher E, Veshchev I, Shenkerman G, Reider-Groswasser II, *et al*. Postoperative treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists decreases tumour remnant growth. Clin Endocrinol. 2005 Jul:63(1):39-44.

Grupetta M, Mercieca C, Vassalo J. Prevalence and incidence of pituitary adenomas: a population based study in Malta. Pituitary. 2013 Dec;16(4):545-553.

Grupetta M, Formosa R, Falzon S, Scicluna SA, Falzon E, Degeatano J, *et al.* Expression of cell cycle regulators and biomarkers of proliferation and regrowth in human pituitary adenomas. Pituitary. 2017 Jun;20(3):358-371.

Guyton AC & Hall JE. Os hormônios hipofisários e seu controle pelo hipotálamo. In: Tratado de Fisiologia Médica. 13ªed, Rio de Janeiro, Brasil: Editora Guanabara Koogan; 2017. p.433-439.

Hardy J. Transesphenoidal surgery of hypersecreting pituitary tumors. Amsterdam: Exerpta Medica; 1973, p.179-198.

Honegger J, Prettin C, Feuerhake F, Petrick M, Schulte-Mönting J, Reincke M. Expression of Ki-67 antigen in nonfunctioning pituitary adenomas: correlation with growth velocity and invasiveness. J Neurosurg. 2003 Oct;99(4):674-679.

Horvath E & Kovacs K. Fine structural cytology of the adenohypophysis in rat and man. J Electron Microsc Tech. 1988 Apr;8(4):401-432.

Horvath E, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV. Regional neuropathology: hypothalamus and pituitary. In: Graham D, Lanatos PL. Greenfield's Neuropathology. 6ªed London, England; Editora CRC Press; 1997. p.1007-1093.

Jaffe CA. Clinically non-functioning pituitary adenoma. Pituitary. 2006 Dec;9(4):317-321.

Jaffrain-Rea ML, Minniti G, Esposito V, Bultrini A, Ferretti E, Santoro A, *et al*. A critical reappraisal of MIB-1 labelling index significance in a large series of pituitary tumours: secreting versus non-secreting adenomas. Endocr Relat Cancer. 2002 Jun;9(2):103-113.

Jane JA & Laws ER. The management of non-functioning pituitary adenomas. Neurol India. 2003 Dec;51(4):461-465.

Jia W, Lu R, Jia G, Ni M, Xu Z. Expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in human pituitary macroadenomas. Tumour Biol. 2013 Jun;34(3):1559-1567.

Kovacs K & Horvath E. Tumors of the pituitary gland. In: Hartmann WH. Atlas of Tumor Pathology. 2ªed. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1986. p. 1-264.

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

Landeiro JA, Fonseca EO, Monnerat ALC, Taboada GF, Cabral GAPS, Antunes F. Nonfunctioning giant pituitary adenomas: invasiveness and recurrence. Surg Neurol Int. 2015 Nov;26(6):179-196.

Lee JS, Park YS, Kwon JT, Nam TK, Lee TJ, Kim JK. Radiological apoplexy and its correlation with acute clinical presentation, angiogenesis and tumor microvascular density in pituitary adenomas. J Korean Neurosurg Soc. 2011 Oct;50(4):281-287.

Li Y, Zhou LP, Ma P, Sui CG, Meng FD, Tian X, *et al.* Relationship of PTTG Expression with Tumor Invasiveness and Microvessel Density of Pituitary Adenomas: A Meta-Analysis. Genet Test Mol Biomarkers. 2014 Apr;18(4):279-285.

Liu C, Li Z, Wu D, Li C, Zhang Y. Smad3 and phospho-Smad3 are potential markers of invasive nonfunctioning pituitary adenomas. Onco Targets Ther. 2016 Apr;15(9):2265-2271.

Liu X, Feng M, Zhang Y, Dai C, Sun B, Bao X, *et al.* Expression of MMP-9, PTTG, HMGA2, and Ki-67 in ACTH-secreting pituitary tumors and their association with tumor recurrence. World Neurosurg. 2018 May;113:e213-e221.

Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J. WHO classification of tumor of endocrine organs. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2017.

Lopes MBS. The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary. Acta Neuropathol. 2017 Oct;134(4):521-535.

Losa M, Franzin A, Mangili F, Terreni MR, Barzaghi R, Veglia F, *et al*. Proliferation index of nonfunctioning pituitary adenomas: correlations with clinical characteristics and long-term follow-up results. Neurosurgery. 2000 Dec;47(6):1313-1319.

Maitra A. O sistema endócrino. In: Robbins & Cotran. Patologia: Bases patológicas das doenças. 8ª ed. Rio de Janeiro, Brasil: Editora Elsevier; 2010. p. 1106-1114.

Manojlovic-Gacic E, Engström BE, Casar-Borota O. Histopathological classification of non-functioning pituitary neuroendocrine tumors. Pituitary. 2018 Apr;21(2):119-129.

Mete O & Lopes MB. Overview of the 2017 WHO classification of pituitary tumors. Endocr Pathol. 2017 Sep;28(3):228-243.

Miao Y, Zong T, Yuan X, Guan S, Wang Y, Zhou D. A comparative analysis of ESM-1 and vascular endothelial cell marker (CD34/CD105) expression on pituitary adenoma invasion. Pituitary. 2016 Apr;19(2):194-201.

Minematsu T, Suzuki M, Sanno N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY. PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas. Endocr Pathol. 2006 Jun;17(2):143-153.

Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, *et al.* Endoglina (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. Anticancer Res. 2011 Jun;31(6):2283-2290.

Nishioka H, Inoshita N, Sano T, Fukuhara N, Yamada S. Correlation Between Histological Subtypes and MRI Findings in Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas. Endocr Pathol. 2012 Sep;23(3):151-156.

Noh TW, Jeong HJ, Lee MK, Kim TS, Kim SH, Lee EJ. Predicting recurrence of nonfunctioning pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab. 2009 Nov;94(11):4406-4413.

Ntali G, Capatina C, Fazal-Sanderson V, Byrne J, Cudlip S, Grossman A, *et al.* Mortality in patients with non-functioning pituitary adenoma is increased: systematic analysis of 546 cases with long follow-up. Eur J Endocrinol. 2016 Feb;174(2):137-145.

Ntali G & Wass J. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of non-functioning pituitary adenomas. Pituitary. 2018 Apr;21(2):111-118.

Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. Neuro Oncol. 2013 Nov; 15:suppl2:1-56.

O'Sullivan EP, Woods C, Glynn N, Behan LA, Crowley R, O´Kelly P, *et al*. The natural history of surgically treated but radiotherapy-naïve nonfunciotining pituitary adenomas. Clin Endocrinol. 2009 Nov;71(5):709-714.

Ozkaya HM, Comunglu N, Keskin FE, Oz B, Haililoglu OA, Tanriover N, *et al.* Locally produced estrogen through aromatization might enhance tissue expression of pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor 2 in growth hormone-secreting adenomas. Endocrine. 2016 Jun;52(3):632-640.

Pei L & Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). Mol Endocrinol.1997 Apr;11(4):433-441.

Pinho LKJ, Vieira Neto L, Wildemberg LEA, Gasparetto EL, Marcondes J, Nunes BA, *et al*. Low Aryl Hydrocarbon Receptor-Interacting Protein Expression Is a Better Marker of Invasiveness in Somatotropinomas than Ki-67 and p53. Neuroendocrinology. 2011 Jul;94(1):39-48.

Pizarro CB, Oliveira MC, Pereira-Lima JF, Leaes CG, Kramer CK, Schuch T. Evaluation of angiogenesis in 77 pituitary adenomas using endoglin as a marker. Neuropathology. 2009 Feb;29(1):40-44.

Ramirez C, Cheng S, Vargas C, Asa SL, Ezzat S, González B, *et al*. Expression of Ki-67, PTTG1, FGFR4, and SSTR2, 3, and 5 in nonfunctioning pituitary adenomas: a high throughput TMA, immunohistochemical study. J Clin Endocrinol Metab. 2012 May;97(5):1745-1751.

Raverot G, Assié G, Cotton F, Cogne M, Boulin A, Dherbomez M, *et al.* Biological and radiological exploration and management of non-functioning pituitary adenoma. Ann Endocrinol. 2015 Jul;76(3):201-209.

Raverot G, Vasiljevik A, Jouanneau E. Prognostic factors of regrowth in nonfunctioning pituitary adenomas. Pituitary. 2018 Apr;21(2):176-182.

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

Rotondo F, Sharma S, Scheithauer BW, Horvath E, Syro LV, Cusimano MD, *et al.* Endoglin and CD-34 immunoreactivity in the assessment of microvessel density in normal pituitary and adenoma subtypes. Neoplasma. 2010 Jan;57(6):590-593.

Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, Cantelmi D, Horvarth E, Lloyd RV, *et al*. Immunohistochemical expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in pituitary adenomas: a correlative study of tumor subtypes. Int J Surg Pathol. 2010 Feb;18(1):5-13.

Šteňo A, Bocko J, Rychlý B, Chorváth M, Celec P, Fabian M, *et al.* Nonfunctioning pituitary adenomas: association of Ki-67 and HMGA-1 labeling indices with residual tumor growth. Acta Neurochir. 2014 Mar;156(3):451-461.

Takei Y, Seyama S, Pearl GS, Tindall GT. Ultrastructural study of the human neurohypophysis. II. Cellular elements of neural parenchyma, the pituicytes. Cell Tissue Res. 1980;205(2):273-287.

Tanaka Y, Hongo K, Tada T, Sakai K, Kakizawa Y, Kobayashi S. Growth pattern and rate in residual nonfunctioning pituitary adenomas: correlations among tumor volume doubling time, patient age, and MIB-1 index. J Neurosurg. 2003 Feb;98(2):359-365.

Tena-Suck ML, Ortiz-Plata A, de la Vega HA. Phosphatase and tensin homologue and pituitary tumor-transforming gene in pituitary adenomas.

Clinical-pathologic and immunohistochemical analysis. Ann Diagn Pathol. 2008 Aug;12(4):275-82.

Tomlinson JW, Holden N, Hills RK, Wheatley K, Clayton RN, Bates AS, *et al*. Association between premature mortality and hypopituitarism. West Midlands Prospective Hypopituitary Study Group. Lancet. 2001 Feb 10;357(9254):425-431.

Vermeulen P, Gasparini G, Fox S, Toi M, Martin L, McCulloch P, *et al.* Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. Eur J Cancer. 1996 Dec;32A(14):2474-2484.

Vieira-Neto L, Wildemberg LE, Moraes AB, Colli LM, Kasuki L, Marques NV, *et al.* Dopamine receptor subtype 2 expression profile in nonfunctioning pituitary adenomas and in vivo response to cabergoline therapy. Clin Endocrinol. 2015 May;82(5):739-746.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med. 1991 Jan 3;324(1):1-8.

Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, Reynaud A, Chevallier P, Jan M, *et al*. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. Endocr Relat Cancer. 2007 Sep;14(3):887-900.

Wierzbicka-Tutka I, Sokołowski G, Bałdys-Waligórska A, Adamek D, Radwańska E, Gołkowski F. PTTG and Ki-67 expression in pituitary adenomas. Przegl Lek. 2016;73(2):53-58.

Woollons AC, Hunn MK, Rajapakse YR, Toomath R, Hamilton DA, Conaglen JV, *et al.* Nonfunctioning pituitary adenomas: indications for postoperative radiotherapy. Clin Endocrinol. 2000 Dec;53(6):713-717.

Xiao JQ, Liu XH, Hou B, Yao Y, Deng K, Feng M, *et al.* Correlations of Pituitary Tumor Transforming Gene Expression with Human Pituitary Adenomas: A Meta-Analysis. PLoS One. 2014 Mar 4;9(3):e90396.

Yao X, Gao H, Li C, Wu L, Bai J, Wang J, *et al.* Analysis of Ki-67, HMGA1, MDM2, and RB expression in nonfunctioning pituitary adenomas. J Neurooncol. 2017 Apr;132(2):199-206.

Yonezawa K, Tamaki N, Kokunai T. Clinical Features and Growth Fractions of Pituitary Adenomas. Neoplasm. 1997 Nov;48(5):494-500.

Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, *et al*. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab. 1999a Feb;84(2):761-767.

Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Marcello D, *et al.* Structure, Expression, and Function of Human Pituitary Tumor-Transforming Gene (PTTG). Mol Endocrinol. 1999b Jan;13(1):156-166.

Zhang Y, He N, Zhou J, Chen Y. The relationship between MRI invasive features and expression of EMMPRIN, galectin-3, and microvessel density in pituitary adenoma. Clin Imaging. 2011 May-Jun;35(3):165-173.

Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. Science. 1999 Jul;285(5426):418-422.

2. Objetivos

Visto que os AHNF permanecem um desafio na prática clínica, o objetivo deste estudo é avaliar marcadores que possam predizer de maneira mais acurada a recidiva ou recrescimento dos AHNF, tendo como objetivos específicos:

a) Avaliar a expressão proteica de PTTG em AHNF através da técnica de imuno-histoquímica

b) Analisar a DMV em AHNF através do marcador imuno-histoquímico CD105.

c) Avaliar os índices de Ki-67 em AHNF através da técnica de imuno-histoquímica

d) Relacionar os índices de expressão PTTG, Ki-67 e DMV com dados clínicos de idade, gênero, expressão hormonal, grau tumoral, invasividade e presença de recidiva ou recrescimento.

3. Artigo científico redigido em inglês

"PTTG overexpression in non-functioning pituitary adenomas: correlation with invasiveness, female gender and younger age"

Geraldine Trott[1,2], Bárbara Roberta Ongaratti[1,2], Camila Batista de Oliveira Silva[1,2], Gabriel Dotta Abech[2], Taiana Haag[2], Carolina Garcia Soares Leães Rech[2], Nelson Pires Ferreira[2], Miriam da Costa Oliveira[1,2], Julia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima[1,2]

[1] Graduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Rua Sarmento Leite, 245, CEP: 90050-170, Porto Alegre/RS, Brazil.

[2]Neuroendocrinology Center, Santa Casa de Porto Alegre/UFCSPA. Rua Professor Annes Dias, 295, CEP: 90020-090 - Porto Alegre/RS, Brazil

Enviado para publicação na Revista "Cancer Biomarkers"

ABSTRACT

BACKGROUND: Non-functioning pituitary adenomas (NFPA) are prevalent pituitary neoplasms. Because they do not present hormonal hypersecretion, there is no marker that indicates regrowth or recurrence, as in other adenomas.

OBJECTIVES: Evaluate the immunohistochemical expression of PTTG, CD105 and Ki-67 and their relationships with age, gender, invasiveness, hormonal expression and regrowth or recurrence in the follow-up of NFPA operated and not submitted to radiotherapy.

METHODS: Included 56 patients submitted to transsphenoidal surgery. Clinical data were obtained from medical records. The degree of invasion was obtained by Hardy's classification.

RESULTS: Mean age 55±13.6 years, 62.5% men and 68% invasive. 62.2% presented persistence of the lesion and regrowth in 35.7%. The recurrence-free survival rate was 94.5%, 75.4% and 69.1% (1, 2 and 3 years). No patient presented recurrence. The PTTG was positive in 55.3%, with statistically significant relationship with invasiveness, age and female gender, without relation to regrowth. The MVD presented statistically significant relationship with male gender, negative correlation with PTTG (r=0.434, p=0.001), with no relation to invasiveness and regrowth. The Ki-67 presented statistically significant relationship with age, tendency towards regrowth (p=0.054), with no relation to invasiveness.

CONCLUSIONS: It is suggested that PTTG can be used as a prognostic marker in NFPA.

Key words: non-functioning pituitary adenomas, PTTG protein, CD105 antigen, Ki-67 antigen, microvascular density, immunohistochemistry

1. Introduction

Pituitary adenomas are benign, slow-growing neoplasms, but a third of them exhibit invasive potential. Non-functioning adenomas (NFPA) are the most prevalent, and may lead to complications by the effects of tumor mass [1,37]. The treatment of choice for NFPA is surgery. Because they do not present hormonal hypersecretion, as with the other adenomas, so far we have no markers that can predict regrowth or recurrence, despite many candidates [4,11,19,42,44,64].

PTTG is an oncogene whose overexpression leads to cellular transformation and tumor development [40,65]. Studies show that pituitary adenomas present increased PTTG expression compared to normal pituitary tissue [16,28,33] in association with increased invasiveness [26,61].

CD105 (cluster of differentiation number 5) is an antigen associated with endothelial cell proliferation, present in the cells of new formed vessels, being the most specific antigen for the evaluation of their microvascular density (MVD) [7,56]. Few studies have evaluated the MVD through CD105 in pituitary adenomas. Miao et al. (2016) described that adenomas have higher MVD than normal pituitary tissue, while Rotondo et al. (2010) found lower MVD in pituitary adenomas [32,46].

Ki-67 is a nuclear antigen expressed in proliferating cells, associated with proliferative potential and invasiveness of neoplasms [13]. According to WHO data, Ki-67 indexes equal to or greater than 3% are associated with aggressive behavior and invasive potential adenomas [6]. In NFPA, some studies associate higher indexes of Ki-67 with regrowth and invasiveness [8,27,35], while others do not [18,4,50,62].

The aim of the present study was to evaluate the immunohistochemical expression of the markers PTTG, CD105 and Ki-67 and their relations with age, gender, invasiveness, hormonal expression, presence of regrowth or recurrence in clinical follow-up of patients with NFPA operated and non-submitted to radiotherapy.

2. Methods

2.1 Patients

In this cross-sectional study, we included 56 patients diagnosed with NFPA, submitted to transsphenoidal surgical resection by a single surgeon (N.P.F.), in Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, between 2009 and 2016, the sample of the study was for convenience, excluding patients undergoing complementary radiotherapy. The slides, with tissue from surgery, were stained with hematoxylin and eosin to confirm the presence of tumor and was subjected to immunohistochemical analysis for the six adenohypophyseal hormones (GH, PRL, ACTH, FSH, LH, and TSH) and chromogranin A using commercial antibodies. The diagnosis of NFPA was made based on the anatomopathological evaluation [6] and absence of clinical and biochemical evidence of hormonal excess.

Patients´ medical records were reviewed to obtain data on age, gender, tumor size, extension, invasion, and recurrence or regrowth. All patients signed the free and informed consent term, the study was approved by the Research Ethics Committee of Santa Casa de Misericórdia, Brazil (Report nº 1397227) and was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

Tumor grade and invasiveness were defined based on magnetic resonance images (MRI 1.5T) obtained preoperatively and classified according to the criteria proposed by Hardy [17]: grade I (microadenomas, <1 cm in diameter), grade II (≥1 cm in diameter, intrasellar or with suprasellar extension without causing bone erosion), grade III (locally invasive tumors that may be associated with diffuse sellar enlargement and bone erosion of the sella turcica), and grade IV (invasive tumors that involve extrasellar structures including bone, hypothalamus, and the cavernous sinus). Grade I and II pituitary adenomas were considered non-invasive tumors, while grade III and IV were considered invasive tumors [6].

Diagnosis of complete surgical resection was based on the absence of visible tumor in the surgical description and in the images performed 3 months after the surgery. The presence of recurrence was defined as the appearance of a new tumor after complete surgical resection and regrowth by the increase of remaining surgical residue greater than 2mm in at least one diameter [2]. Patients with a medical monitoring of at least six months after surgery were included in the follow-up.

2.2 Immunohistochemistry

The streptoavidin-biotin method (LSAB + peroxidase kit; Dako®, Denmark) was used for the detection of PTTG, CD105 and Ki-67. The blocks with the formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues were sectioned at 4μm, deparaffinized with xylol and rehydrated with ethanol. Antigenic recovery was performed with citrate (pH = 6) for Ki-67 and CD105 and with Tris-EDTA (pH=9) for PTTG, both at 92°C for 40 minutes. Endogenous peroxidase was inactivated using H_2O_2 30V dissolved in methanol (5%) for ten minutes (three times). Non-

specific proteins were blocked using 1% BSA (bovine serum albumin) for one hour at room temperature. Primary antibodies were applied overnight at 4°C (Table 1). The slides were washed with PBS-tx and incubated with the secondary and tertiary antibodies for 40 minutes each at room temperature. The reaction was revealed with 3,3-diaminobenzidine (DAB). Sections were counterstained with Harris hematoxylin and assembled with Entellan®. As a negative control, the primary antibodies were replaced with saline.

The selection of hot spots was done under a light microscope with a magnification of 100X. Counts were done by two independent observers, the final results being the average between both. The cell counts for PTTG and Ki-67 and the microvessel count for CD105 were performed in magnification of 400X and 200X, respectively, with the aid of Image J® software.

PTTG expression was evaluated by cytoplasmic staining intensity (0 = absent, 1 = weak, 2 = moderate, 3 = strong) and the percentage of positive cells in 10 hot spots. The mean number of cells counted in each field was 1077.92±338.9. The final score was calculated by multiplying the intensity by the percentage, with 300 being the maximum value [47].

The evaluation of MVD with the CD105 antibody was through the Chalkley point counting method [56], with the selection of three hot spots on each slide, the Chalkley grating being attached to the microscope lens, in the magnification of 200X. Endothelial cells or stained cell groups were considered microvessels, being MVD obtained by the average of microvessels in the three hot spots.

Ki-67 index was defined by the counting of tumor cells with immunolabeled nuclei in relation to the total cells in at least 3 hot spots, with the result given in percentage. The mean number of cells counted in each field was 1032.08±292.6.

The cutoff point for defining increased proliferative activity of the tumor was 3% or more positive cells for Ki-67 [6].

2.3 Statistical analysis

The concordance analyzes between observers were determined through the intraclass correlation coefficient, with the definition of absolute agreement. The quantitative variables were described as mean and standard deviation or median and interquartile range (p25-p75), according to their distribution, according to the Kolmogorov-Smirnov normality test. Correlations between the quantitative variables were verified by the Spearman Correlation test and among the qualitative variables Chi-square or Fisher's exact test was used when necessary. Comparisons between quantitative and qualitative variables were evaluated by Student's t-test or Mann-Whitney U test, according to the distribution. The Kaplan-Meier test was used to estimate the recurrence-free survival time. The level of significance was set at $p<0.05$. Analyzes were performed with SPSS version 23.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, IL, USA).

3. Results

Of the 56 patients with AHNF, 35 (62.5%) were men. The mean age was 55±13.6 years, ranging from 23 to 80 years. In the immunohistochemical analysis, 27 (48.2%) did not present hormonal expression (hormone negative), 4 (7.1%) expressed only FSH, 3 (5.4%) only LH, 3 (5.4%), LH and FSH and 19 (33.9%) expressed FSH and/or LH along with other hormones.

As to tumor grade, 18 (32.1%) were grade II (non-invasive), 9 (16.1%) grade III and 29 (51.8%) grade IV, totaling 38 (67.9%) invasive.

Two patients died after surgery and nine patients had follow-up at other centers, remaining 45 under follow-up. The median follow-up at the time of data analysis was 29 months (4.5-42.5), ranging from 6 to 104 months. Post-surgery, 28 (62.2%) presented persistence of the lesion (18 with the stable lesion and 10 with regrowth) and 17 (37.8%) had no remaining lesion. Patients without remaining lesion did not present recurrence. Regrowth occurred in 35.7% of the cases, with a median of 17 months (14.2-29.2), ranging from 12 to 50 months after surgery. Of these, eight were submitted to one intervention, one to two reinterventions and one to radiotherapy alone. According to the Kaplan-Meier's test, the recurrence-free survival rate was 94.5% in 1 year, 75.4% in 2 years and 69.1% in 3 years (Fig. 1).

Regarding immunohistochemistry, there was an agreement between the readings of the two observers for all markers, with intraclass correlation coefficients for Ki-67 of 0.98, for PTTG of 0.99 and for CD105 of 0.94.

PTTG was positive in 55.3% (31 cases), with a median of 99 (34-196), ranging from 17 to 300. Twenty cases (64.5%) showed strong intensity expression. It was found a statistically significant relationship between PTTG and invasiveness (p=0.022), being higher in invasive, gender (p=0.002), being higher in women, and age (p=0.03), being higher in younger patients (Fig. 2b). There was no statistically significant difference between PTTG and regrowth (p=0.799) or hormonal expression (p=0.984).

Regarding MVD, 100% of the cases were positive, with a median of 27.5 (16-44.2), ranging from 1 to 93 microvessels. A statistically significant relationship was found between MVD and gender (p=0.01), with MVD being higher in men.

There was no statistically significant difference between MVD and invasiveness (p=0.61), regrowth (p=0.51), hormonal expression (p=0.54) or age (p=0.07).

Ki-67 was positive in 100% of the cases, with a median of 0.7% (0.43-1.3), ranging from 0.1 to 7.6%. Six cases (10.7%) presented indexes of Ki-67 equal to or greater than 3%, of which five patients were less than 60 years old. A statistically significant relationship was found between Ki-67 and age (p=0.001), with higher rates in younger patients (Fig. 2a) and trend of Ki-67 relationship with regrowth (p=0.054). There was no statistically significant relationship between Ki-67 and invasiveness (p=0.819), hormonal expression (p=0.304) or gender (p=0.091).

A negative correlation was found between PTTG and MVD expression (Fig. 3). There was no correlation between Ki-67 and PTTG (p=0.820), nor between Ki-67 and MVD (p=0.079).

4. Discussion

The present study analyzed a representative sample of NFPA with mean age and predominance of the male gender in accordance with the literature [10,15,36].

The majority (67.9%) of the NFPA studied were classified as invasive, similar to other studies with surgical series that described 57% to 91.9% of invasive NFPA [25,48].

The prevalence of 48.2% of adenomas without hormonal expression (hormone-negative) was similar to that of other studies with NFPA, which varied from 6.8% to 78.8% [2,4,5,12,24,30,36].

Persistence of lesion after surgery was observed in 62.2% of the patients, other studies described from 52.3 to 79.8% [54,49,38,45]. The regrowth rate was

35.7%. In relation to studies with persistence of lesion, also not submitted to radiotherapy, 35 to 73% presented regrowth [38,45,49,54,60].

The median of regrowth time was 17 months, ranging from 12.5 to 50 months after surgery. In the literature, tumor regrowth occurred in periods between 27 and 64 months in patients with NFPA operated and not submitted to radiotherapy [14,38,49,54,55]. The earlier detection of regrowth in our work may be a consequence of the use of more sensitive imaging methods.

Patients in whom total resection was obtained did not present recurrence in the follow-up period. Other studies also found 0% of recurrence rates, with a mean follow-up of 5.6 years [38,49]. Our study had a recurrence-free survival rate of 94.5% (1 year), 75.4% (2 years) and 69.1% (3 years). Similar to our results, recurrence-free survival rates range from 92.9 to 100% (1 year), 78% (2 years), from 48.6 to 100% (5 years), from 22 to 100% (10 years) [14,38,55].

Immunohistochemical studies found high PTTG indexes in most pituitary adenomas, but absent or at very low indexes in normal pituitary tissue [16,28,33]. In the present study, PTTG expression was detected in the cytoplasm of tumor cells, with a predominance of paranuclear staining pattern, like other authors [39,47,52]. The median of the PTTG was 99, ranging from 17 to 300. The studies of Salehi et al. (2010) and Ozkaya et al. (2016) used the same method of counting used in the present study and found medians of 110 and 225, ranging from 34 to 266, being the first study with functioning and non-functioning adenomas and the second with GH secreting adenomas [39,47].

Regarding the 55% of positive cases, 64.5% of them presented strong intensity. Tena-Suck et al. (2008), evaluating the cytoplasmic expression of NFPA, found a strong intensity in only 5% of the cases [52]. The group of Wierinckx (2007)

observed that adenomas with aggressive characteristics, 20% of the sample studied, expressed PTTG in the nucleus and the cytoplasm, with higher indexes, while those without these characteristics showed only cytoplasmic expression and with lower indexes, suggesting that the overexpression of PTTG and its translocation from the cytoplasm to the nucleus may be related to aggressiveness [58].

To date, only studies by Noh et al. (2009) and Ramirez et al. (2012) analyzed the expression of PTTG in exclusive series of NFPA. The study by Noh et al. (2009) showed PTTG expression in 100% of the cases and a statistically significant relationship with tumor regrowth, with a higher expression in the adenomas that have regrown [35]. Ramirez et al. (2012) found positivity in 99% of the samples, with no relation with invasiveness or hormonal expression [43]. In our study, we observed positivity in more than 50% of the sample.

In relation to invasiveness, Jia et al. (2013), studying functioning and non-functioning pituitary adenomas, found significantly higher indexes of PTTG in invasive adenomas [21]. Meta-analyzes published by Xiao et al. (2014) and Li et al. (2014), showed that patients with invasive adenomas have higher indexes of PTTG than non-invasive ones, this data is similar to our findings [26,61].

The only studies that describe gender-specific analysis include functioning and non-functioning adenomas, and, unlike our findings, found no PTTG and gender relationship [11,28,39]. Analyzing the influence of age, studies involving functioning and non-functioning adenomas found higher PTTG indexes in younger patients [16,59], as observed here.

Angiogenesis is important for tumor growth and development, correlated with metastasis, progression, and survival. Benign neoplasms are usually poorly

vascularized, but with abnormal and fragile vessels [9]. The role of angiogenesis in pituitary adenomas remains controversial.

Studies do not show uniformity in microvessel assessment methods. Some use manual microvessel counting in hot spots, considering the highest value or average of values found, and there are variations in microscopic magnifications. The Chalkley method, in which a grid is attached to the lens in the magnification of 200X, is considered the gold standard for microvessel counting [56]. Few studies have evaluated the expression of CD105 through this method in pituitary adenomas. Lee et al. (2011) and Miao et al. (2016), studying samples of functioning and non-functioning adenomas, found a mean of 53.4±17.2 and 48.2±24.4 new vessels per field, respectively [23,32]. In our study with NFPA, the median was 27.5 (16-44.2) new vessels per field. We found a statistically significant relationship between MVD and gender, with higher MVD in men. The study by Pizarro et al. (2009) found a similar result, but with a sample of functioning and non-functioning adenomas [42].

Evaluating MVD through CD105, Miao et al. (2016) found a higher mean of new vessels in the normal pituitary compared to tumor tissue, unlike Rotondo et al. (2010) and Pizzaro et al. (2008) [32,42,46]. Our findings, with an exclusive sample of NFPA, showed negative correlation between PTTG and MVD, being of our knowledge the first study to relate these markers with MVD evaluated through CD105, neoangiogenesis specific marker. Other works have studied factors related to angiogenesis, such as CD34, FGF (basic fibroblast growth factor) and VEGF (vascular endothelial growth factor) [3,21,31,33], being the MVD higher since they are not exclusive markers of new vessels.

In the current study, Ki-67 was positive in 100% of cases. In the literature, the positivity of NFPA samples ranges from 95 to 100% [4,22,57]. The median was 0.7%, ranging from 0.1 to 7.6%. Previous studies with NFPA presented similar results, with medians of 0.88; 1.49 and 2.15% [4,43,57].

Ki-67 indexes equal to or greater than 3% are associated with adenomas with aggressive behavior and invasive potential, according to WHO data [6]. In our study, 10.7% of the cases presented Ki-67 equal to or greater than 3%. Studies with NFPA describe from 9.75 to 14.28% of samples with Ki-67 equal to or greater than 3% [4,22]. We found statistically significant relationship between Ki-67 and age, with a higher proliferation index in younger patients. When assessing the influence of age on the Ki-67 index in NFPA, other studies also demonstrated inverse relationship between Ki-67 and age [20,29,51,63].

We observed no statistically significant relationship between Ki-67 expression and invasiveness, as well as most of the studies with NFPA [4,18,41,50,51]. Liu et al. (2016) found higher Ki-67 in invasives NFPA [27].

Regarding the regrowth of the remaining lesion, no statistically significant relationship was observed with the Ki-67 index, data also obtained by Yao et al. (2017) [62]. In other studies with NFPA, regrowth was related to higher Ki-67 indexes [8,35].

We found no statistically significant relationship between Ki-67 and hormonal expression. The Ramirez group (2012) found no statistically significant relationship between Ki-67 and hormone negative and gonadotropic adenomas [43]. Nishioka et al. (2012) observed a statistically significant relationship between Ki-67 and hormone negative and silent corticotropic adenomas, with Ki-67 indexes lower than the other NFPA [34].

The present study demonstrated no statistically significant relationship between Ki-67 and gender. Studies with NFPA patients showed no influence of gender on the proliferation rates of Ki-67 [29,34].

We found no correlation between PTTG and Ki-67 in NFPA, similarly to Ramirez et al. (2012) [43]. Minematsu et al. (2006) and Ozkaya et al. (2016), studying functioning and non-functioning adenomas, also found no correlation between PTTG and Ki-67 [33,39].

No correlation was found between Ki-67 and CD105 in NFPA. Pizarro et al. (2008) studied the relationship between Ki-67 and CD105 in functioning and non-functioning pituitary adenomas and, as in our results, found no correlation between the markers [42]. This finding suggests the hypothesis that microvascular density is not necessarily a modulator of pituitary cell proliferation, although it may be indicative of antiapoptotic activity [53].

5. Conclusions

In an exclusive NFPA sample, we found PTTG expression in more than 50% of the cases, with higher indexes in invasive adenomas and in younger women, with no relation to regrowth. MVD was not related to invasiveness or tumor regrowth. Ki-67 was found to be higher in younger patients, with a trend towards tumor regrowth, with no relation to invasiveness. The PTTG presented a negative correlation with MVD and showed no correlation with Ki-67. PTTG was related to invasiveness, possibly due to its role as cell cycle regulator and transcriptional activator, suggesting its use as a prognostic marker in NFPA.

6. References

[1] S.L. Asa & S. Ezzat, The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas, *Endocr Rev* **19** (1998), 798-827.

[2] S. Brochier, F. Galland, M. Kujas, F. Parker, S. Gaillard, C. Raftopoulos, et al, Factors predicting relapse of nonfunctioning pituitary macroadenomas after neurosurgery: a study of 142 patients, *Eur J Endocrinol* **163** (2010), 193-200.

[3] K. Chamaon, D. Kanakis, C. Mawrin, K. Dietzmann, E. Kirches, Transcripts of PTTG and growth factors bFGF and IGF-1 are correlated in pituitary adenomas, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **118** (2009), 121-126.

[4] C.M. Dallago, L.M. Barbosa-Coutinho, N.P. Ferreira, R. Meurer, J. F. Pereira-Lima, M.C. Oliveira, Determination of Cell Proliferation Using Mcm2 Antigen and Evaluation of Apoptosis and TGF-*β*1 Expression in GH-secreting or Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas, *Endocr Pathol* **21** (2010), 32-39.

[5] O.M. Dekkers, A.M. Pereira, F. Roelfsema, J.H. Voormolen, K.J. Neelis, M.A. Schroijen, J.W. Smit, J.A. Romijn, Observation alone after transsphenoidal surgery for nonfunctioning pituitary macroadenoma, *J Clin Endocrinol Metab* **91** (2006), 1796-1801.

[6] R. DeLellis, R. Lloyd, P. Heitz, C. Eng, World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of endocrine organs, Lyon, France: IARC Press; 2004.

[7] A. Di Ieva, A. Weckman, J. Di Michele, F. Rotondo, F. Grizzi, K. Kovacs, et al*,* Microvascular morphometrics of the hypophysis and pituitary tumors: From bench to operating theatre, *Microvasc Res* **89** (2013), 7-14.

[8] S.M. Ekramullah, Y. Saitoh, N. Arita, T. Ohnishi, T. Hayakawa, The correlation of Ki-67 staining indices with tumour doubling times in regrowing non-functioning pituitary adenomas, *Acta Neurochir* **138** (1996), 1449-1455.

[9] L.M. Ellis & I.J. Fidler, Angiogenesis and metastasis, *Eur J Cancer* **32A** (1996), 2451-2460.

[10] E. Ferrante, M. Ferraroni, T. Castrignano, L. Menicatti, M. Anagni, G. Reimondo, et al*,* Non-functioning pituitary adenoma database: a useful resource to improve the clinical management of pituitary tumors, *Eur J Endocrinol* **155** (2006), 823-829.

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

[12] F. Gabalec, M. Drastikova, T. Cesak, D. Netuka, V. Masopust, J. Machac, et al, Dopamine 2 and Somatostatin 1-5 Receptors Coexpression in Clinically Non-Functioning Pituitary Adenomas, *Physiol Res* **64** (2015), 369-377.

[13] J. Gerdes, U. Schwab, H. Lemke, H. Stein, Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* **15** (1983), 13-20.

[14] Y. Greenman, G. Ouaknine, I. Veshchev, I.I. Reider-Groswasser, Y. Segev, N. Stern, Postoperative surveillance of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas: markers of tumour quiescence and re-growth, *Clin Endocrinol* **58** (2003), 763-769.

[15] Y. Greenman & N. Stern, Non-functioning pituitary adenomas, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **23** (2009), 625-638.

[16] M. Grupetta, R. Formosa, S. Falzon, S.A. Scicluna, E. Falzon, J. Degeatano, et al, Expression of cell cycle regulators and biomarkers of proliferation and regrowth in human pituitary adenomas, *Pituitary* **20** (2017), 358-371.

[17] J. Hardy, Transesphenoidal surgery of hypersecreting pituitary tumors, Amsterdam: Excerpta Medica; 1973, p.179-198.

[18] J. Honegger, C. Prettin, F. Feuerhake, M. Petrick, J. Schulte-Mönting, M. Reincke, Expression of Ki-67 antigen in nonfunctioning pituitary adenomas: correlation with growth velocity and invasiveness, *J Neurosurg* **99** (2003), 674-679.

[19] C.A. Jaffe, Clinically non-functioning pituitary adenoma, *Pituitary* **9** (2006), 317-321.

[20] M.L. Jaffrain-Rea, G. Minniti, V. Esposito, A. Bultrini, E. Ferretti, A. Santoro, et al, A critical reappraisal of MIB-1 labelling index significance in a large series of pituitary tumours: secreting versus non-secreting adenomas, *Endocr Relat Cancer* **9** (2002), 103-113.

[21] W. Jia, R. Lu, G. Jia, M. Ni, Z. Xu, Expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in human pituitary macroadenomas, *Tumour Biol* **34** (2013), 1559-1567.

[22] J. A. Landeiro, E.O. Fonseca, A.L.C. Monnerat, G.F. Taboada, G.A.P.S.Cabral, F. Antunes, Nonfunctioning giant pituitary adenomas: invasiveness and recurrence, *Surg Neurol Int* **26** (2015), 179-196.

[23] J.S. Lee, Y.S. Park, J.T. Kwon, T.K. Nam, T.J. Lee, J.K. Kim, Radiological apoplexy and its correlation with acute clinical presentation, angiogenesis and tumor microvascular density in pituitary adenomas, *J Korean Neurosurg Soc* **50** (2011), 281-287.

[24] M.H. Lee, J.H. Lee, H.J. Seol, J.I. Lee, J.H. Kim, D.S. Kong, et al, Clinical concerns about recurrence of non-functioning pituitary adenoma, *Brain Tumor Res* **4** (2016), 1-7.

[25] J. Lelotte, A. Mourin, E. Fomekong, A. Michotte, C. Raftpoulos, D. Maiter, Both invasiveness and proliferation criteria predict recurrence of non-functioning pituitary macroadenomas after surgery: A retrospective analysis of a monocentric cohort of 120 patients, *Eur J Endocrinol* **178** (2018), 237-246.

[26] Y. Li, L.P. Zhou, P. Ma, C.G. Sui, F.D. Meng, X. Tian, et al, Relationship of PTTG Expression with Tumor Invasiveness and Microvessel Density of Pituitary Adenomas: A Meta-Analysis, *Genet Test Mol Biomarkers* **18** (2014), 279-285.

[27] C. Liu, Z. Li, D. Wu, C. Li, Y. Zhang, Smad3 and phospho-Smad3 are potential markers of invasive nonfunctioning pituitary adenomas, *Onco Targets Ther* **15** (2016), 2265-2271.

[28] X. Liu, M. Feng, Y. Zhang, C. Dai, B. Sun, X. Bao, et al, Expression of MMP-9, PTTG, HMGA2, and Ki-67 in ACTH-secreting pituitary tumors and their association with tumor recurrence, *World Neurosurg* **113** (2018), e213-e221.

[29] M. Losa, A. Franzin, F. Mangili, M.R. Terreni, R. Barzaghi, F. Veglia, et al, Proliferation index of nonfunctioning pituitary adenomas: correlations with clinical characteristics and long-term follow-up results, *Neurosurgery* ***47*** (2000), 1313-1319.

[30] A. Mahta, V. Haghpanah, A. Lashkari, R. Heshmat, B. Larijani, S.M. Tavangar, Non-functioning pituitary adenoma: immunohistochemical analysis of 85 cases, *Folia Neuropathol* **45** (2007), 72-77.

[31] C.J. McCabe, K. Boelaert, L.A. Tannahill, A.P. Heaney, A.L. Stratford, J.S. Khaira, et al, Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors, *J Clin Endocrinol Metab* **87** (2002), 4238-4244.

[32] Y. Miao, T. Zong, X. Yuan, S. Guan, Y. Wang, D. Zhou, A comparative analysis of ESM-1 and vascular endothelial cell marker (CD34/CD105) expression on pituitary adenoma invasion, *Pituitary* ***19*** (2016), 194-201.

[33] T. Minematsu, M. Suzuki, N. Sanno, S. Takekoshi, A. Teramoto, R.Y. Osamura, PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas, *Endocr Pathol* **17** (2006), 143-153.

[34] H. Nishioka, N. Inoshita, T. Sano, N. Fukuhara, S. Yamada, Correlation Between Histological Subtypes and MRI Findings in Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas, *Endocr Pathol* **23** (2012), 151-156.

[35] T.W. Noh, H.J. Jeong, M.K. Lee, T.S. Kim, S.H. Kim, E.J. Lee, Predicting recurrence of nonfunctioning pituitary adenomas, *J Clin Endocrinol Metab* **94** (2009), 4406-4413.

[36] G. Ntali, C. Capatina, V. Fazal-Sanderson, J. Byrne, S. Cudlip, A. Grossman, et al, Mortality in patients with non-functioning pituitary adenoma is increased: systematic analysis of 546 cases with long follow-up, *Eur J Endocrinol* **174** (2016), 137-145.

[37] G. Ntali & J. Wass, Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of non-functioning pituitary adenomas, *Pituitary* **21** (2018), 111-118.

[38] E.P. O'Sullivan, C. Woods, N. Glynn, L.A. Behan, R. Crowley, P. O´Kelly P, et al, The natural history of surgically treated but radiotherapy-naïve nonfunciotining pituitary adenomas, *Clin Endocrinol* **71** (2009), 709-714.

[39] H.M. Ozkaya, N. Comunglu, F.E. Keskin, B. Oz, O.A. Haililoglu, N. Tanriover, et al, Locally produced estrogen through aromatization might enhance tissue expression of pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor 2 in growth hormone-secreting adenomas, *Endocrine* **52** (2016), 632-640.

[40] S. Pei & S. Melmed, Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG), *Mol Endocrinol* **11** (1997), 433-441.

[41] L.K.J. Pinho, L. Vieira-Neto, L.E.A. Wildemberg, E.L. Gasparetto, J. Marcondes, B.A. Nunes, et al, Low Aryl Hydrocarbon Receptor-Interacting Protein Expression Is a Better Marker of Invasiveness in Somatotropinomas than Ki-67 and p53, *Neuroendocrinology* **94** (2011), 39-48.

[42] C.B. Pizarro, M.C. Oliveira, J.F. Pereira-Lima, C.G. Leaes, C.K. Kramer, T. Schuch, Evaluation of angiogenesis in 77 pituitary adenomas using endoglin as a marker, *Neuropathology* **29** (2008), 40-44.

[43] C. Ramirez, S. Cheng, C. Vargas, S.L. Asa, S. Ezzat, B. González, et al, Expression of Ki-67, PTTG1, FGFR4, and SSTR2, 3, and 5 in nonfunctioning pituitary adenomas: a high throughput TMA, immunohistochemical study, *J Clin Endocrinol Metab* **97** (2012), 1745-1751.

[44] G. Raverot, A. Vasiljevik, E. Jouanneau, Prognostic factors of regrowth in nonfunctioning pituitary adenomas. *Pituitary* **21** (2018) 176-182.

[45] R. Reddy, S. Cudlip, J.V. Byrne, N. Karavitaki, J.A.H. Wass, Can we ever stop imaging in surgically treated and radiotherapy naïve patients with non-functioning pituitary adenoma?, *Eur J Endocrinol* **165** (2011), 739-744.

[46] F. Rotondo, S. Sharma, B.W. Scheithauer, E. Horvath, L.V. Syro, M.D. Cusimano, et al, Endoglin and CD-34 immunoreactivity in the assessment of microvessel density in normal pituitary and adenoma subtypes, *Neoplasma* **57** (2010), 590-593.

[47] F. Salehi, K. Kovacs, B.W. Scheithauer, D. Cantelmi, E. Horvarth, R.V. Lloyd, et al, Immunohistochemical expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in pituitary adenomas: a correlative study of tumor subtypes, *Int J Surg Pathol* **18** (2010), 5-13.

[48] L. Sánchez-Tejada, R. Sánchez-Ortiga, O. Moreno-Pérez, C.F. Montanana, M. Niveiro, N.A. Tritos, et al, Pituitary tumor transforming gene and insulin-like growth factor 1 receptor expression and immunohistochemical measurement of Ki-67 as potential prognostic markers of pituitary tumors aggressiveness, *Endocrinol Nutr* **60** (2013), 358-367.

[49] G. Soto-Ares, C. Cortet-Rudelli, R. Assaker, A. Boulinguez, C. Dubest, D. Dewailly, et al, MRI protocol technique in the optimal therapeutic strategy of non-functioning pituitary adenomas, *Eur J Endocrinol* **146** (2002), 179-186.

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

[51] Y. Tanaka, K. Hongo, T. Tada, K. Sakai, Y. Kakizawa, S. Kobayashi, Growth pattern and rate in residual nonfunctioning pituitary adenomas: correlations among tumor volume doubling time, patient age, and MIB-1 index, *J Neurosurg* **98** (2003), 359-365.

[52] M.L. Tena-Suck, A. Ortiz-Plata, H.A. de la Vega, Phosphatase and tensin homologue and pituitary tumor-transforming gene in pituitary adenomas. Clinical-pathologic and immunohistochemical analysis, *Ann Diagn Pathol* **12** (2008), 275-82.

[53] H.E. Turner, Z. Nagy, K.C Gatter, M.M. Esiri, J.A. Wass, A.L. Harris, Proliferation, bcl-2 expression and angiogenesis in pituitary adenomas: relationship to tumour behavior. *Br J Cancer* **82** (2000), 1441-1445.

[54] H.E. Turner, I.M. Stratton, J.V. Byrne, C.B. Adams, J.A. Wass, Audit of selected patients with nonfunctioning pituitary adenomas treated without irradiation - A follow-up study, *Clin Endocrinol* **51** (1999), 281-284.

[55] A.C.M. van den Bergh, G. van den Berg, M.A. Schoorl, W.J. Sluiter, A.M. van der Vliet, E.W. Hoving, et al, Immediate postoperative radiotherapy in residual non-functioning pituitary adenoma: beneficial effect on local control without additional negative impact on pituitary function and life expectancy, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **67** (2007), 863-869.

[56] P. Vermeulen, G. Gasparini, S. Fox, M. Toi, L. Martin, P. McCulloch, et al, Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation, *Eur J Cancer* **32A** (1996), 2474-2484.

[57] L. Vieira-Neto, L.E. Wildemberg, A.B. Moraes, L.M. Colli, L. Kasuki, N.V. Marques, et al, Dopamine receptor subtype 2 expression profile in nonfunctioning pituitary adenomas and in vivo response to cabergoline therapy, *Clin Endocrinol* **82** (2015), 739-746.

[58] A. Wierinckx, C. Auger, P. Devauchelle, A. Reynaud, P. Chevallier, M. Jan, et al, A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors, *Endocr Relat Cancer* **14** (2007), 887-900.

[59] I. Wierzbicka-Tutka, G. Sokołowski, A. Bałdys-Waligórska, D. Adamek, E. Radwańska, F. Gołkowski, PTTG and Ki-67 expression in pituitary adenomas, *Przegl Lek* **73** (2016), 53-58.

[60] A.C. Woollons, M.K. Hunn, Y.R. Rajapakse, R. Toomath, D.A. Hamilton, J.V. Conaglen, et al, Nonfunctioning pituitary adenomas: indications for postoperative radiotherapy, *Clin Endocrinol* **53** (2000), 713-717.

[61] J.Q. Xiao, X.H. Liu, B. Hou, Y. Yao, K. Deng, M. Feng, et al, Correlations of Pituitary Tumor Transforming Gene Expression with Human Pituitary Adenomas: A Meta-Analysis, *PLoS One* **4** (2014), e90396.

[62] X. Yao, H. Gao, C. Li, L. Wu, J. Bai, J. Wang, et al, Analysis of Ki-67, HMGA1, MDM2, and RB expression in nonfunctioning pituitary adenomas, *J Neurooncol* **132** (2017), 199-206.

[63] K. Yonezawa, N. Tamaki, T. Kokunai, Clinical Features and Growth Fractions of Pituitary Adenomas, *Neoplasm* **48** (1997), 494-500.

[64] X. Zhang, G.A. Horwitz, A.P. Heaney, M. Nakashima, T.R. Prezant, M.D. Bronstein, et al, Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas, *J Clin Endocrinol Metab* **84** (1999a), 761-767.

[65] X. Zhang, G.A. Horwitz, T.R. Prezant, A. Valentini, M. Nakashima, D. Marcello, et al, Structure, Expression, and Function of Human Pituitary Tumor-Transforming Gene (PTTG), *Mol Endocrinol* **13** (1999b), 156-166.

7. Tables

Table 1 Description of the antibodies used in the immunohistochemical analysis.

Antibdy	**Manufacturer**	**+ control**	**Dilution**
Anti-PTTG policlonal	Abcam, Cambridge, UK	Esophagus	1:200
Anti-CD105 Monoclonal (4G11)	NovoCastra Laboratories, Newcastle, UK	Tonsil	1:80
Anti-Ki-67 policlonal	Dako®, Carpinteria, CA, USA	Tonsil	1:100

8. Figures

Fig. 1 Kaplan-Meyer curve showing the recurrence-free survival rate in NFPA.

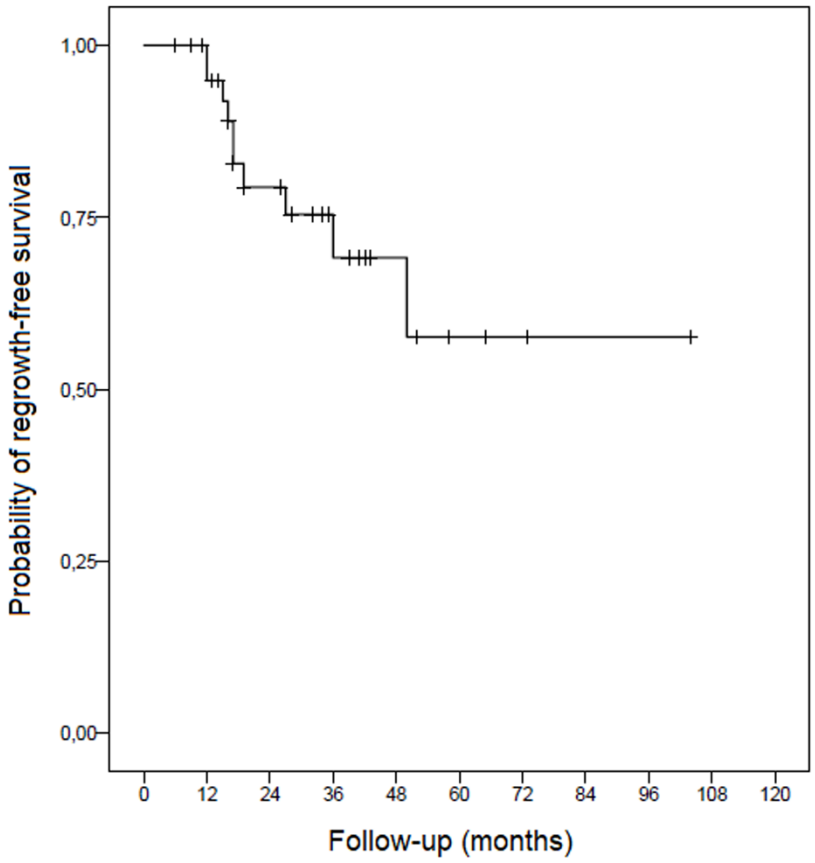


Fig. 2 a) Correlation between a) Ki-67 and age (r=-0,376, p=0,037). b) PTTG and age (r=-0,44, p=0,001).

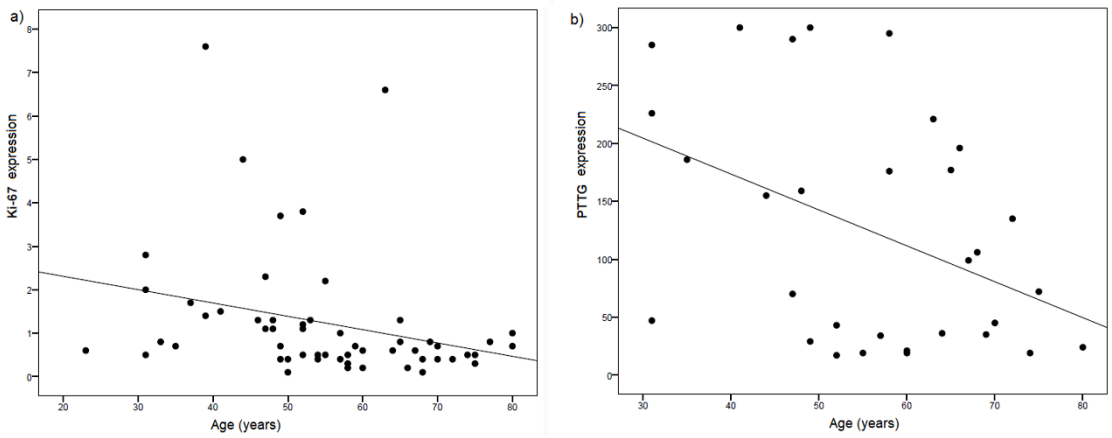
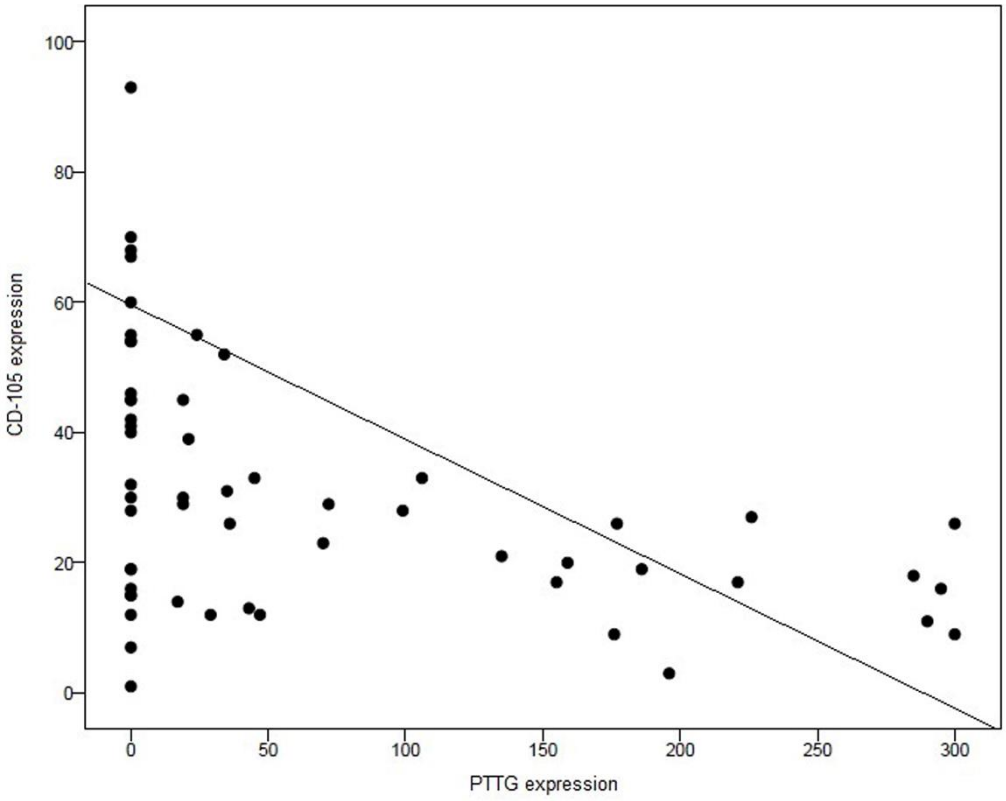


Fig. 3 Correlation between PTTG and CD105 (r=0.434, p=0.001).



4. Considerações finais

No presente estudo, avaliando uma série exclusiva de AHNF, o oncogene PTTG mostrou-se expresso em mais de 50% dos casos, com índices maiores nos adenomas invasivos e em mulheres mais jovens, sem relação com o recrescimento tumoral.

A DMV não se mostrou relacionada à invasividade ou recrescimento tumoral.

O Ki-67 mostrou-se mais elevado nos mais jovens, com tendência em relação a recrescimento tumoral, sem relação com invasividade.

Evidenciamos correlação negativa entre PTTG e DMV e ausência de correlação com o Ki-67.

Acompanhando a evolução da doença, sem radioterapia após a cirurgia, 62,2% apresentaram persistência de lesão com taxa de recrescimento de 35,7% em 17 meses. A taxa de sobrevida livre de recorrência foi de 94,5% (1 ano), 75,4% (2 anos) e 69,1% (3 anos). Os pacientes sem persistência da lesão não apresentaram recidiva no período de acompanhamento, mediana de 29 meses.

O PTTG mostrou-se relacionado à invasividade, possivelmente pelo seu papel regulador do ciclo celular e ativador da transcrição, sugerindo-se sua utilização como marcador prognóstico nos AHNF.

O grupo de Pesquisa em Neuroendocrinologia tem duas décadas de experiência em avaliação tecidual em tumores hipofisários. O presente estudo permitiu aprofundar os conhecimentos referentes à expressão de marcadores de tumorigênese, angiogênese e proliferação celular e sua influência na invasividade, recidiva ou recrescimento tumoral nos AHNF operados e não

submetidos à radioterapia, ampliando e dando continuidade a uma linha de pesquisa consolidada.

5. Anexos

5.1 Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pesquisa de marcadores preditores de recidiva e recrescimento em adenomas hipofisários não-funcionantes.

Pesquisador: Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51848315.0.3001.5345

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.500.590

Apresentação do Projeto:

Os adenomas hipofisiários constituem 25% dos tumores cerebrais, e um terço dos adenomas é não funcionante. Após a cirurgia é difícil acompanhar o recrescimento ou recidiva dos tumores não-funcionantes, pois não secretam substâncias a serem dosadas.

O estudo propõe-se a determinar se na análise histoquímica do tecido retirado a presença de três fatores poderia ser utilizada como preditora do comportamento do tumor. Estes fatores são um oncogene (PPTG), a densidade microvascular determinada a partir do CD 105 e a expressão de KI67 (antígeno nuclear expresso em células em proliferação).

O estudo é observacional. Os casos serão originários das cirurgias realizadas no Hospital São José da ISCMPA de 2009 a 2017.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar fatores preditores de recidiva e recrescimento em adenomas hipofisários não funcionantes.

Os seguintes fatores serão investigados: (1) oncogene PTTG; (2) KI67; (3) CD 105 como medida da densidade microvascular.

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245
Bairro: Sarmento **CEP:** 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo é observacional, tendo apenas os riscos relacionados à confidencialidade do participante. Não trará benefícios aos participantes, porém o conhecimento adquirido poderá ajudar futuros pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo observacional. Utilizará o material obtido na ressecção dos adenomas hipofisários que tiveram indicação médica de remoção. Utilizará dados de prontuário e acompanhamento dos pacientes.

As amostras de 2009-2015 são procedentes do projeto "Avanços em biologia molecular dos adenomas hipofisários não-funcionantes" (aprovado sob parecer nº 1593/12) que prevê a pesquisa de marcadores de persistência de doença e de recorrência, ainda não verificados por falta de reagentes específicos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de consentimento livre esclarecido está adequado, bem como Cronograma e orçamento. Apresenta Declarações de uso de dados e materiais; publicação de dados; isenção de ônus ao hospital; declaração de confidencialidade e termo de compromisso de utilização dos dados.

Recomendações:

Descrever quais os desfechos do seguimento clínico serão investigados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto respeita as normas de pesquisa envolvendo participantes humanos. Tem relevância para o estudo desta patologia e poderá contribuir para ter melhor entendimento. Nosso parecer é favorável a sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Dea acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_634299.pdf	09/12/2015 09:42:19		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	09/12/2015 09:41:05	Geraldine Trott	Aceito

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Continuação do Parecer: 1.500.590

Outros	DECLARACAO_DE_AUTORIZACAO_DA_CHEFIA_RESPONSAVEL_.pdf	07/12/2015 11:06:10	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Formulario_de_inscricao_cep_SantaCasa.pdf	07/12/2015 11:05:34	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Termo_compromisso_relatorio_final.pdf	27/11/2015 13:05:39	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Termo_compromisso_utlizacao_dados_prontuarios.pdf	27/11/2015 13:02:14	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Termo_anuencia_responsavel_setor_patologia.pdf	27/11/2015 13:00:39	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Termo_anuencia_responsavel_setor_biomol.pdf	27/11/2015 12:58:40	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Declaracao_uso_publicacao_dados.pdf	27/11/2015 12:51:54	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Declaracao_confidencialidade_sujeito.pdf	27/11/2015 12:50:48	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Declaracao_isencao_de_onus.pdf	27/11/2015 12:48:48	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Declaracao_de_uso_de_dados_materiais.pdf	27/11/2015 12:44:42	Geraldine Trott	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Pesquisa_marcadores_preditores_recidiva_recrescimento_AHNF.pdf	27/11/2015 12:39:45	Geraldine Trott	Aceito
Orçamento	Orcamento_Pesquisa_marcadores_preditores_recidiva_recrescimento_AHNF.pdf	27/11/2015 12:37:18	Geraldine Trott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pesquisa_marcadores_preditores_recidiva_recrescimento_AHNF.pdf	27/11/2015 12:36:24	Geraldine Trott	Aceito
Cronograma	Cronograma_Pesquisa_marcadores_preditores_de_recidiva_e_recrescimento_em_adenomas_hipofisaarios_naofuncionantes.pdf	27/11/2015 12:30:04	Geraldine Trott	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245
Bairro: Sarmento **CEP:** 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Continuação do Parecer: 1.500.590

PORTO ALEGRE, 14 de Abril de 2016

Assinado por:
Airton Tetelbom Stein
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245
Bairro: Sarmento **CEP:** 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

5.2 Parecer do Comitê de Ética da ISCMPA

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pesquisa de marcadores preditores de recidiva e recrescimento em adenomas hipofisários não-funcionantes.
Pesquisador: Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 51848315.0.0000.5335
Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericordia de Porto Alegre - ISCMPA
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.397.227

Apresentação do Projeto:
Os adenomas hipofisiários constituem 25% dos tumores cerebrais, e um terço dos adenomas é não-funcionante. Após a cirurgia é dificíl acompanhar o recrescimento ou recidiva dos tumores não-funcioantes, pois não secretam substancias a serem dosadas.
O estudo propõe-se a determinar se na análise histoquímica dao tecido retirado a presença de tres fatores poderia ser utilizada como preditora do comportamentro do tumor. estes fatores são um oncogene (PPTG), a densidade microvascular determi nada a partir do CD 105 e a express]ao de KI67 (antígeno nuclear expresso em célulasem proliferação).
O estudo é observacional. Os casos serão originários das cirurgia realizadas no Hospital São josé de 2009 a 2017.

Objetivo da Pesquisa:
A pesquisa tem por objetivo determinar a capacidade preditora de recidiva/recrescimento de adenomas hipofisiários removidos cirurgicamente, dos seguintes fatores; (1) oncogene PTTG; (2) KI67; (3) CD 105 como medida da densidade microvascular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
O estudo é observacional, tendo apenas os riscos relacionados à confidencialidade do participante.
Não trará benefícios aos participantes, porém o conhecimento adquirido poderá ajudar futuros

Endereço: R. Profº Annes Dias,295 Hosp.Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo observacional. Utilizará o material obtido na ressecção dos adenomas hipofisiários que tiveram indicação médica de remoção. Utilizará dados de prontuário e acompanhamento dos pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de consentimento livre esclarecido está adequado, bem como Cronograma e orçamento. Apresenta Declarações de uso de dados e materiais; publicação de dados; isenção de ônus ao hospital; declaração de confidencialidade e termo de compromisso de utilização dos dados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto respeita as normas de pesquisa envolvendo participantes humanos. Tem relevância para o estudo desta patologia e poderá contribuir para ter melhor entendimento. Nosso parecer é favorável a sua aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

Continuação do Parecer: 1.397.227

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_634299.pdf	09/12/2015 09:42:19		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	09/12/2015 09:41:05	Geraldine Trott	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_AUTORIZACAO_DA_CHEFIA_RESPONSAVEL_.pdf	07/12/2015 11:06:10	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Formulario_de_inscricao_cep_SantaCasa.pdf	07/12/2015 11:05:34	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Termo_compromisso_relatorio_final.pdf	27/11/2015 13:05:39	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Termo_compromisso_utlizacao_dados_prontuarios.pdf	27/11/2015 13:02:14	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Termo_anuencia_responsavel_setor_patologia.pdf	27/11/2015 13:00:39	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Termo_anuencia_responsavel_setor_biomol.pdf	27/11/2015 12:58:40	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Declaracao_uso_publicacao_dados.pdf	27/11/2015 12:51:54	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Declaracao_confidencialidade_sujeito.pdf	27/11/2015 12:50:48	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Declaracao_isencao_de_onus.pdf	27/11/2015 12:48:48	Geraldine Trott	Aceito
Outros	Declaracao_de_uso_de_dados_materiais.pdf	27/11/2015 12:44:42	Geraldine Trott	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Pesquisa_marcadores_preditores_recidiva_recrescimento_AHNF.pdf	27/11/2015 12:39:45	Geraldine Trott	Aceito
Orcamento	Orcamento_Pesquisa_marcadores_preditores_recidiva_recrescimento_AHNF.pdf	27/11/2015 12:37:18	Geraldine Trott	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pesquisa_marcadores_preditores_recidiva_recrescimento_AHNF.pdf	27/11/2015 12:36:24	Geraldine Trott	Aceito
Cronograma	Cronograma_Pesquisa_marcadores_preditores_de_recidiva_e_recrescimento_em_adenomas_hipofisaarios_naofuncionantes.pdf	27/11/2015 12:30:04	Geraldine Trott	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Endereço: R. Profº Annes Dias,295 Hosp.Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

PORTO ALEGRE, 28 de Janeiro de 2016

Assinado por:
Carlos Henrique Munhoz Olea
(Coordenador)

Endereço: R. Profº Annes Dias,295 Hosp.Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

5.3 Protocolo da técnica de imuno-histoquímica

TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

1) Desparafinar o tecido:

- Deixar as lâminas na estufa a 60° C por 30min a 1 hora.

- Xilol 2x de 5 min.

- Passar nos álcoois absolutos. Deixar 5 min no último álcool.

- Lavar em água destilada por 5 min.

2) Recuperação antigênica:

-Aquecer em banho-maria a solução de citrato de sódio pH 6,0 (ou Tris/EDTA pH 9,0) até 92°C .

- Colocar as lâminas e deixar por 40 min.

- Retirar do banho e deixar esfriar a temperatura ambiente por 20 min.

- Lavar em água destilada.

3) Bloqueio da peroxidase endógena:

- Metanol (95 ml) + água oxigenada 30 V (5 ml) 2x de 10 min (protegido da luz). Adicionar a água oxigenada somente no momento do uso.

- Lavar 2x em água destilada.

- Lavar em PBS por 5 min com agitação.

4) Bloqueio das ligações inespecíficas:

- Incubar com uma solução de proteína inócua à amostra (BSA 1%) por 30 min para mouse e 1 hora para rabbit. Preparo: 200 ml PBS + 2 g albumina bovina.

5) Incubar com anticorpo primário:

- Deixar escorrer o excesso do soro.

- Aplicar ± 50µl do anticorpo primário em cada lâmina (diluir em PBS ou BSA).

- Deixar de 30 min a 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, colocar a 4 °C (na geladeira) overnight.

- No outro dia, lavar em PBS 2x de 5 min.

Existem 2 maneiras de continuar a técnica: utilizar o polímero Envision (não necessita avidina-biotina pois já está conjugado com a peroxidase) ou anticorpos secundário e terciário (conjugado avidina-biotina + peroxidase).

Utilizando o polímero, deixar 40 min a temperatura ambiente e lavar em PBS 2x por 5 min. Seguir para a etapa 8, revelação.

Utilizando a outra opção:

6) Incubar com anticorpo secundário biotinilado:

- Aplicar o anticorpo secundário sobre cada lâmina e deixar por 40 min a temp. ambiente. Lavar em PBS 2x 5 min.

7) Incubar com complexo streptavidin–peroxidase:

- Aplicar o anticorpo terciário sobre cada lâmina e deixar por 40 min a temp. ambiente. Lavar em PBS 2x 5 min.

8) Revelação com substrato cromógeno (DAB):

- Misturar 1 ml de água destilada + 1 gota do frasco 1 + 2 gotas do frasco 2 (Dab – kit pronto para uso). Agitar em vórtex e adicionar 1 gota do frasco 3. Pingar sobre as lâminas e deixar 5 min.

- Lavar em água corrente e destilada e descartar em frasco identificado.

9) Contracorar com Hematoxilina:

Somente se a técnica exigir. Deixar 30 segundos no corante hematoxilina e lavar em água corrente até clarificar a água.

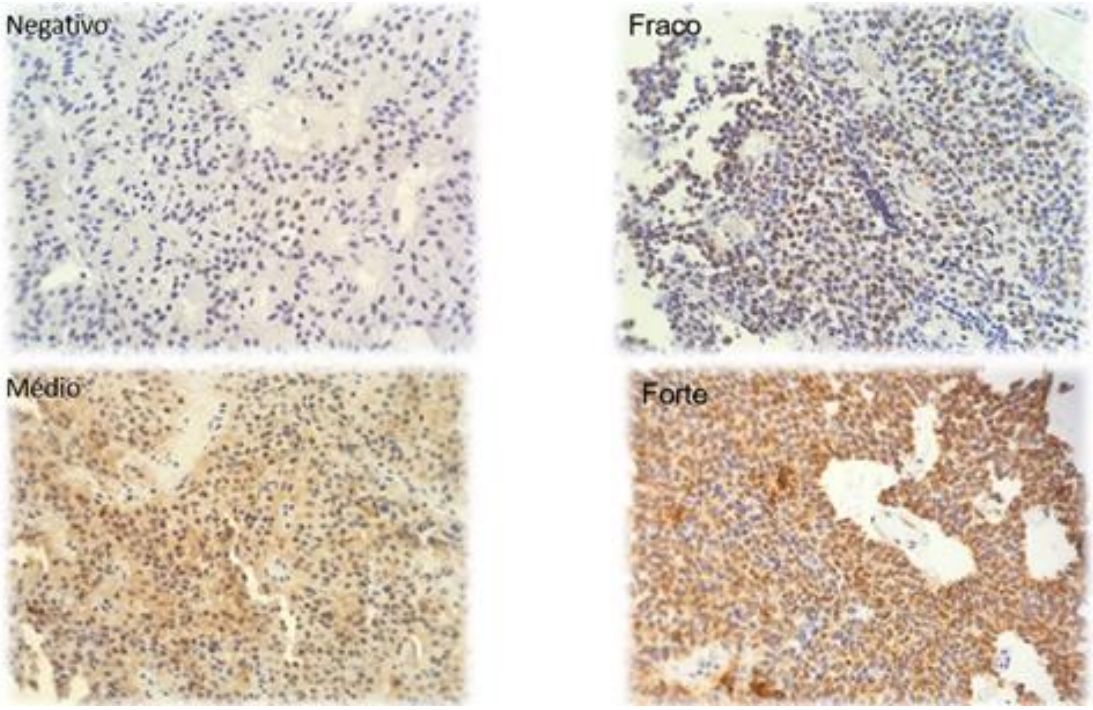
10) Desidratar:

- Passar nos álcoois absolutos. Deixar 5 min no último álcool.

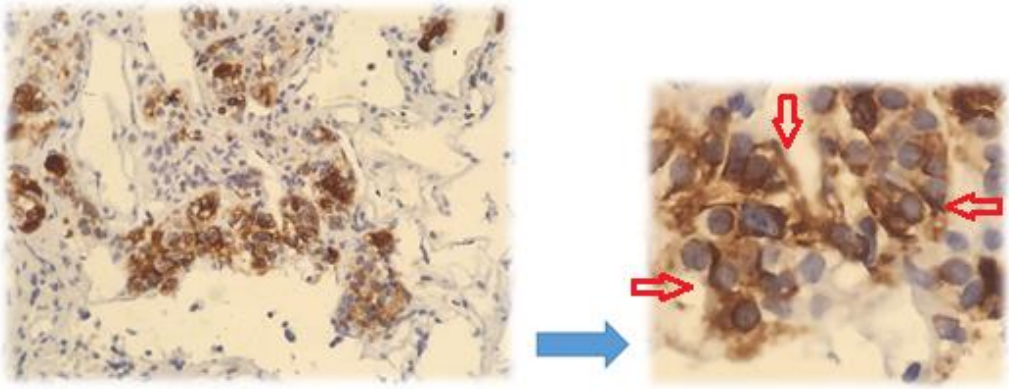
- Xilol 2x de 5 min.

11) Montar com Entellan.

5.4 Expressão de PTTG em AHNF pela técnica de imuno-histoquímica



Expressão IH de PTTG em adenomas hipofisários não funcionantes. Escala de intensidade de marcação. 400X.



Expressão IH de PTTG de intensidade forte em adenoma hipofisário não funcionante, com demostração de padrão paranuclear de marcação (setas). 400X.

5.5 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisa de marcadores preditores de recidiva e recrescimento em adenomas hipofisários não-funcionantes

Versão 1 (data: 27/11/2015)

_____

_____

(Nome completo do PACIENTE – preencher em letra de forma)

Adenomas hipofisários são tumores benignos da glândula hipófise. Dentre estes tumores, os adenomas não funcionantes são os mais difíceis de se tratar, uma vez que não secretam hormônios no sangue. Sendo assim, são necessários estudos que investiguem fatores envolvidos na formação e progressão desses tumores.

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Pesquisa de marcadores preditores de recidiva e recrescimento em adenomas hipofisários não-funcionates”, que objetiva ampliar os conhecimentos dos mecanismos relacionados à evolução deste tipo de tumor. Uma parte do material retirado na cirurgia (o tumor) será encaminhada ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre para realizarem-se análises. A outra parte do tumor será encaminhada ao Laboratório de Patologia da Santa Casa para identificação do tumor (procedimento de rotina) e posteriormente, o material será utilizado para o presente estudo no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Os dados clínicos dos pacientes serão obtidos através dos prontuários médicos. Ao participar desta pesquisa o voluntário não terá benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre os adenomas hipofisários, proporcionando uma investigação mais detalhada e ajudando mais pacientes. Não será realizado nenhum procedimento além dos de rotina, não havendo riscos médicos adicionais aos procedimentos. É garantido que todo o material coletado será analisado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre não gerando ônus ao paciente e à Santa Casa. Os gastos para a realização da pesquisa serão absorvidos pelo orçamento do estudo e você não receberá nenhuma compensação financeira por participar.

É dada à liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar da pesquisa, sem que isso traga prejuízos. Ressaltamos que a concordância ou não em participar desse estudo não implica em qualquer modificação no tratamento médico já estabelecido, visto que se trata de uma participação voluntária. É dada a garantia da não identificação do paciente e de ser mantido o caráter confidencial das informações em todas as etapas da pesquisa. Os dados serão utilizados apenas pela equipe da pesquisa e autoridades regulatórias da área da saúde. É assumido o

compromisso de fornecer ao paciente informações atualizadas obtidas durante o estudo, ainda que estas possam afetar a sua vontade em continuar participando.

Para casos de eventos adversos ou dúvidas referentes à pesquisa deve ser contatada a *Dra. Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima* (investigador principal) pelo telefone (51) 3303.8779. Para questões sobre a pesquisa e sobre os direitos dos pacientes envolvidos ou sobre problemas decorrentes da pesquisa deve ser contatado o Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – sob coordenação Dr. Carlos Olea, telefone 3214.8571 e email cep@santacasa.tche.br e/ou o Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre pelo telefone (51) 3303-8804.

Estou ciente que não serão violados os segredos profissionais obtidos durante a pesquisa e autorizo a utilização do material coletado para futuras pesquisas. 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 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dará autorização ao coordenador do estudo, aos Comitês de Ética do hospital e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e à organização governamental de saúde para utilização dos dados obtidos quando necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha privacidade.

_____ _____

Nome do Sujeito de Pesquisa (letra de forma) Data

_____

Assinatura do Sujeito de Pesquisa

_____ _____

Nome do Pesquisador responsável (letra de forma) Data

_____

Assinatura do Pesquisador responsável

5.6 Participação na XI Jornada do Programa de Pós Graduação em de Patologia UFCSPA, com apresentação oral.

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

C E R T I F I C A D O

Certificamos, para os devidos fins, que **Geraldine Trott** participou da *"XI Jornada do Programa de Pós-Graduação em Patologia"*, nos dias 21 e 22 de agosto de 2017, na cidade de Porto Alegre-RS, realizada pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Porto Alegre, 29 de setembro de 2017.

Maristela Pasin
Secretária Executiva
Pós-Graduação-UFCSPA

5.7 Apresentações na III Mostra de trabalhos de ensino, pesquisa e extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

III MOSTRA DE TRABALHOS DE Ensino, Pesquisa e Extensão DA UFCSPA 2017

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado "Pesquisa de marcadores preditores de recidiva e recrescimento em adenomas hipofisários não-funcionantes" de autoria de Gabriele Caroline Barbosa, Geraldine Trott, Bárbara Roberta Ongaratti, Camila Batista De Oliveira Silva, Carolina Garcia Soares Leães Rech, Taiana Haag, Nelson Pires Ferreira, Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima, Miriam Da Costa Oliveira, foi apresentado por GABRIELE CAROLINE BARBOSA na categoria Trabalhos Relacionados à Pesquisa, na III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, ocorrida de 26 a 28 de setembro de 2017 na cidade de Porto Alegre - RS.

UFCSPA

Prof.ª Alethea Gatto Barschak
Coordenadora Geral
da III Mostra de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA

III MOSTRA DE TRABALHOS DE

Ensino, Pesquisa e Extensão

DA UFCSPA 2017

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado "Pesquisa de marcadores preditores de recidiva e recrescimento em adenomas hipofisários não-funcionantes" de autoria de Tainá Mafalda Dos Santos, Geraldine Trott, Bárbara Roberta Ongaratti, Camila Batista De Oliveira Silva, Taiana Haag, Carolina Garcia Soares Leães Rech, Nelson Pires Ferreira, Miriam Da Costa Oliveira, Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima, foi apresentado por TAINÁ MAFALDA DOS SANTOS na categoria Trabalhos Relacionados à Pesquisa, na III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, ocorrida de 26 a 28 de setembro de 2017 na cidade de Porto Alegre - RS.

UFCSPA

Prof.ª Alethea Gatto Barschak
Coordenadora Geral
da III Mostra de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA

5.8 Comprovante de submissão do artigo científico

Manuscript 18-0025 (Cancer Biomarkers) Entrada x

cbm_peerreview@iospress.com por mstracker.com
para mim

Dear Dr. Trott,

Thank you for your recent submission of the manuscript entitled "PTTG overexpression in non-functioning pituitary adenomas: correlation with invasiveness, female gender and younger age."

It has been assigned tracking number 18-0025.

To obtain the history and current status of your manuscript, visit the address presented below and enter your last name as username and the tracking number as password.

Cancer Biomarkers Editorial Office

https://msTracker.com/history1.php?jc=cbm