CAHUÊ DE BERNARDIS MURAT

Estudo molecular dos componentes da via de sinalização HGF/MET

em insulinomas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi

São Paulo

2013

Estudo molecular da via de sinalização HGF/MET em insulinomas
Mestrado
FMUSP 2013

CAHUÊ DE BERNARDIS MURAT

Estudo molecular dos componentes da via de sinalização HGF/MET em insulinomas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia Orientador: Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD)

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Murat, Cahuê De Bernardis Estudo molecular dos componentes da via de sinalização HGF/MET em insulinomas / Cahuê De Bernardis Murat São Paulo, 2013. Dissertação(mestrado)Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia. Orientador: Ricardo Rodrigues Giorgi.
Descritores: 1.Insulinoma 2.Vias de sinalização 3.Fator de crescimento de hepatócito 4.Proteínas proto-oncogênicas c-met 5.Expressão gênica 6.Análise mutacional de DNA
USP/FM/DBD-237/13

Dedico...

à minha mãe, Ana Carolina Murat,

que sempre se doou ao máximo por mim.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pela oportunidade e estrutura concedidas para minha formação acadêmica e realização desta dissertação.

À Dra. Maria Lucia Corrêa Giannella, pela oportunidade, confiança e apoio desde quando cheguei à FMUSP em 2007. Muito respeito e admiração.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi, pela amizade, confiança depositada em mim durante todos estes anos, por todo o conhecimento passado e por me auxiliar nas diretrizes acadêmicas, profissionais e pessoais. Obrigado por me ensinar a fazer pesquisa!

À bióloga Angela Fortes, pela grande amizade, por toda a contribuição para a realização dos meus projetos, minha formação acadêmica e pessoal e pelos bons momentos dentro e fora do ambiente de trabalho. Sua alegria é contagiante!

Ao Dr. Daniel Giannella Neto, pela cooperação e discussão acerca dos resultados deste trabalho. Muito obrigado.

À toda minha família, pelo amor, educação e apoio durante toda a minha vida. Sou muito grato a todos! À Universidade Ibirapuera, pela confiança em me ceder horários flexíveis para a minha formação acadêmica e elaboração deste estudo. Muito agradecido.

À Dra. Thais Chile, Dra. Viviane Blois e Thiago Patente, pela amizade e todo apoio prestado durante o curso deste trabalho. Obrigado!

A todos os profissionais e estudantes do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM-25) da FMUSP, pela companhia, apoio e pelos almoços muito agradáveis.

À Dra. Maria Claudia Nogueira Zerbini e às técnicas Esmeralda Eher e Sandra Fernezlian do Laboratório de Imuno-histoquímica da FMUSP, pelo pronto atendimento, simpatia e agilidade em contribuir para a minha dissertação. São de pessoas como vocês que precisamos para o bom andamento da pesquisa. Muito obrigado.

À Dra. Luciana Corrêa, pela grande ajuda na liberação dos equipamentos, quantificação e discussão dos dados da imuno-histoquímica. Muito agradecido!

Às secretárias Cida Silva e Rosana Zamboni, pelo grande apoio nos processos ligados à pós-graduação. Obrigado.

A todos os meus amigos, pela companhia, alegria e apoio. Estando com vocês, a felicidade é certa! Muito obrigado!

A todos os meus amigos dos esportes, pela companhia, apoio, viagens, caronas e momentos únicos. Curtir a vida de forma ativa, radical e saudável é fundamental para nos tornarmos boas pessoas e profissionais. Muito obrigado!

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

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

"That the powerful play goes on, and you may contribute a verse." (Walt Whitman) Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Comittee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals in Index Medicus.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de Figuras Lista de Tabelas Resumo

Abstract

1. INT	RODUÇÃO	2
1.1.	Tumores neuroendócrinos pancreáticos (TNPs)	2
1.2.	Insulinomas	3
1.3.	Aspectos moleculares dos insulinomas	5
1.3.	1. Tumorigênese e progressão tumoral	6
1.3.	2. Transformação maligna e formação metastática	6
1.4.	Via de sinalização HGF/MET	8
1.5.	HGF/MET e suas implicações no câncer	13
2. OBJ	IETIVOS	17
3. JUS	TIFICATIVA	19
 JUS⁴ 	TIFICATIVA TERIAL E MÉTODOS	19 21
 JUS⁴ MA⁷ 4.1. 	TIFICATIVA TERIAL E MÉTODOS Casuística	19 21 21
 JUS MA 4.1. 4.2. 	TIFICATIVA TERIAL E MÉTODOS Casuística Metodologia	19 21 21 23
 JUS⁴ MA⁷ 4.1. 4.2. 	TIFICATIVA TERIAL E MÉTODOS Casuística Metodologia 1. Extração do RNA total	19 21 21 23
 JUS MA 4.1. 4.2. 4.2. 	TIFICATIVA TERIAL E MÉTODOS Casuística Metodologia 1. Extração do RNA total 2. Síntese do cDNA	19 21 21 23 23
 JUS MA 4.1. 4.2. 4.2. 4.2. 	TIFICATIVA TERIAL E MÉTODOS Casuística Metodologia 1. Extração do RNA total 2. Síntese do cDNA 3. Determinação dos genes de referência	19 21 23 23 25 26
 JUS MA 4.1. 4.2. 4.2. 4.2. 4.2. 4.2. 	TIFICATIVA TERIAL E MÉTODOS Casuística Metodologia 1. Extração do RNA total 2. Síntese do cDNA 3. Determinação dos genes de referência 4. Expressão dos genes da via HGF/MET	19 21 21 23 23 25 26 28

	4.2.6.	Sequenciamento do gene MET	31
	4.2.7.	Análise estatística	33
5.	RESU	LTADOS	35
Į	5.1. Aı	nálise da expressão gênica	
	5.1.1.	Expressão do mRNA do gene HGF	35
	5.1.2.	Expressão do mRNA do gene MET	36
	5.1.3.	Expressão do mRNA do gene HGFA	36
	5.1.4.	Expressão do mRNA do gene ST14	37
	5.1.5.	Expressão do mRNA do gene HAI-1	
	5.1.6.	Expressão do mRNA do gene HAI-2	
Į	5.2. Aı	nálise imuno-histoquímica	40
	5.2.1.	Expressão protéica de c-MET	40
	5.2.2.	Expressão protéica de HAI-1	45
Ę	5.3. Se	equenciamento do gene <i>MET</i>	
Į	5.4. Co	orrelação entre expressão gênica e dados histopatológicos	54
6.	DISCU	JSSÃO	57
7.	CONC	LUSÕES	
8.	ANEX	OS	68
9.	REFE	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

Figura 1. Ativação do HFG9
Figura 2. Via de sinalização HGF/MET 10
Figura 3. Estrutura do receptor c-MET 12
Figura 4. Mutações no gene <i>MET</i>
Figura 5. Géis de agarose 1% agrupados e representativos dos RNAs isolados de
insulinomas
Figura 6. Análise da qualidade dos RNAs extraídos de insulinomas
Figura 7. Placa utilizada na determinação do segundo gene de referência
Figura 8. Gráfico representativo da determinação do segundo gene de referência
Figura 9. Expressão elevada do mRNA do gene HGF entre os insulinomas malignos
(G3) e metástases em relação aos insulinomas benignos G1
Figura 10. Expressão elevada do mRNA do gene MET entre os insulinomas
malignos (G3) e metástases em relação aos tumores benignos G1 e G2
Figura 11. Expressão do mRNA do gene <i>HGFA</i> nos insulinomas
Figura 12. Expressão elevada do mRNA do gene ST14 entre os insulinomas
malignos (G3) e metástases em relação aos tumores benignos G1
Figura 13. Expressão reduzida do mRNA do gene HAI-1 entre os insulinomas
malignos (G3) e metástases quando comparada aos insulinomas benignos G1
Figura 14. Ausência de expressão diferencial do mRNA do gene HAI-2 entre os
subgrupos de insulinomas

Figura 15. Expressão citoplasmática discreta para c-MET em insulinomas
benignos G1
Figura 16. Expressão discreta do c-MET em insulinomas G2 42
Figura 17. Marcação mais intensa para c-MET em insulinomas malignos G3 em
comparação aos G1 e G243
Figura 18. Aumento da expressão protéica de c-MET nos insulinomas malignos
(G3) em relação aos tumores G1/G2 44
Figura 19. Intensa marcação do c-MET na membrana plasmática em células do
pâncreas exócrino nos insulinomas45
Figura 20. Expressão citoplasmática discreta para HAI-1 em insulinomas G1 46
Figura 21. Expressão citoplasmática discreta para HAI-1 em insulinomas G2 47
Figura 22. Expressão citoplasmática discreta para HAI-1 em insulinomas G3 48
Figura 23. Ausência de expressão diferencial da protéina HAI-1 entre os subtipos
tumorais de insulinomas
Figura 24. Cromatografias representativas do sequenciamento do éxon 2 do gene
<i>MET</i>
Figura 25. Cromatografias representativas do sequenciamento do éxon 10 do gene
<i>MET</i>
Figura 26. Cromatografias representativas do sequenciamento do éxon 14 do gene
<i>MET</i>
Figura 27. Cromatografias representativas do sequenciamento do éxon 16 do gene
<i>MET</i>
Figura 28. Cromatografias representativas do sequenciamento do éxon 17 do gene
<i>MET</i>

Figura 29. Cromatografias representativas do sequenciamento do éxon 19 do gene

<i>ET</i>	MET
-----------	-----

LISTA DE TABELAS

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sumário de expressão gênica da via HGF/MET em linhagens celulares	
humanas	15
Tabela 2. Dados demográficos, anatomopatológicos, bioquímicos e	
histopatológicos dos pacientes	22
Tabela 3. Identificação dos genes utilizados no estudo	28
Tabela 4. Sequência dos iniciadores do gene MET para sequenciamento	32
Tabela 5. Correlação de Spearman entre os valores de expressão gênica e os dad	los
clínicos dos pacientes com insulinomas	.55

RESUMO

Resumo

Murat CB. Estudo molecular dos componentes da via de sinalização HGF/MET em insulinomas [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Os insulinomas são os tumores neuroendócrinos pancreáticos funcionantes mais frequentes, entretanto, os aspectos moleculares envolvidos em sua tumorigênese precisam ser melhor esclarecidos. As características morfológicas e histoquímicas dos insulinomas não conseguem predizer completamente seu comportamento biológico, apenas o fenótipo invasivo local e a presença de metástase são as formas confiáveis do diagnóstico maligno. A presente investigação teve por objetivos analisar a expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e a expressão protéica por imuno-histoquímica dos componentes da via de sinalização do fator de crescimento hepatocítico (HGF) e seu receptor (c-MET) em 27 amostras de insulinomas, sendo: 16 tumores benignos grau 1 (G1), seis tumores benignos grau 2 (G2), dois insulinomas malignos grau 3 (G3) e três metástases hepáticas. Além disso, realizou-se a pesquisa de mutações somáticas no gene MET. Observou-se (1) o aumento da expressão dos genes HGF, MET e ST14 (codificante para a matriptase) e a baixa expressão do gene HAI-1 (codificante para a protease inibidora tipo-kunitz do tipo 1) nos insulinomas malignos e metástases quando comparados aos insulinomas benignos G1; (2) uma correlação positiva entre a expressão do mRNA do gene MET e o gene ST14 e índice proliferativo Ki-67, bem como uma correlação inversa entre a expressão do mRNA do gene HAI-1 e os genes MET, HGF, ST14 e o índice mitótico; (3) uma correlação positiva entre a expressão do gene ST14 e a expressão do mRNA do gene HGF; (4) maior expressão

protéica de c-MET nos insulinomas malignos G3 em relação aos insulinomas G1/G2 e (5) ausência de mutações nos éxons 2, 10, 14, 16, 17 e 19 do gene *MET*. Concluiu-se que os genes *HGF*, *MET*, *ST14* e *HAI-1* estão diferencialmente expressos entre insulinomas malignos e benignos, o que pode ter implicações diagnósticas e terapêuticas.

Descritores: Insulinoma, Vias de sinalização, Fator de crescimento de hepatócito, Proteínas proto-oncogênicas c-met, Expressão gênica, Análise mutacional de DNA.

ABSTRACT

Abstract

Murat CB. *Molecular study of the HGF/MET system in insulinomas* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

In an attempt to better understand the molecular processes involved in the tumourigenesis of islet beta-cells, the present study evaluated the expression of genes belonging to the hepatocyte growth factor and its receptor (HGF/MET) system, namely, MET, HGF; HGFAC and ST14 (encode HGF activator and matriptase, respectively, two serine proteases that catalyze conversion of pro-HGF to active HGF); and SPINT1 and SPINT2 (encode serine peptidase inhibitors Kunitz type 1 and type 2, respectively, two potent inhibitors of HGF activator and of matriptase) in 27 sporadic insulinomas; 16 grade 1 (G1), six grade 2 (G2), two grade 3 (G3) and three hepatic metastases. Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction was employed to assess RNA expression of the target genes and immunohistochemical analysis was used to evaluate the expression of MET and SPINT1. Somatic mutations of MET gene were searched by direct sequencing of exons 2, 10, 14, 16, 17 and 19. Overexpression of MET was observed in grouped G3 insulinomas and metastases concomitantly with upregulation of the genes encoding HGF and matriptase and downregulation of SPINT1. Positive correlations were observed between MET RNA expression and Ki-67 proliferation index while a negative correlation was detected between SPINT1 expression and the mitotic index. No somatic mutations were found in MET gene. The final effect of the increased expression of HGF, its activator (matriptase) and its specific receptor (MET) together with a decreased expression of one potent inhibitor of matriptase (SPINT1) is probably a contribution to tumoural progression and malignancy in insulinomas.

Descriptors: Insulinoma, Signaling transduction, Hepatocyte growth factor, Protooncogene proteins c-met, Gene expression, DNA mutational analysis.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tumores neuroendócrinos pancreáticos (TNPs)

Os tumores neuroendócrinos pancreáticos (TNPs) são neoplasias raras com incidência anual de quatro casos para cada 1.000.000 de pessoas na população global [1-6] e representam apenas 2% de todas as neoplasias pancreáticas [7, 8], entretanto, estudos de autópsia encontram TNPs em até 10% dos indivíduos [9, 10].

Tipicamente acometem adultos, com maior incidência entre 30 e 60 anos de idade e ocorrência crescente no número de casos nas últimas décadas [4, 11]. Normalmente, são de natureza esporádica, solitários, pequenos, medindo de 0,5 a 5cm de diâmetro e bem-demarcados, porém, carecem de uma cápsula bem-definida [12].

Os TNPs podem ser descritos como funcionantes quando secretam um determinado tipo hormonal, causando síndromes clínicas características, sendo os mais comuns: tumores secretores de insulina (insulinomas), gastrina (gastrinomas), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (VIPomas), glucagon (glucagonomas) e somatostatina (somatostatinomas), respectivamente listados em ordem decrescente de incidência [5, 13]. Também podem co-secretar múltiplos hormônios, mas, normalmente, apenas um destes determina os sintomas clínicos [14].

Os tumores não-funcionantes, que compreendem aproximadamente 70% dos TNPs, são caracterizados pela ausência de secreção ou pela quantidade excessiva de hormônios secretados, estando apenas associados à expansão da massa tumoral e não cursam manifestações clínicas endócrinas [5, 15, 16].

Os TNPs também podem estar associados a síndromes genéticas, como a Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM-1), Doença de von Hippel-Lindau (VHL), Doença de von Recklinghausen (VHD) e esclerose tuberosa [17, 18]. A maioria dos pacientes portadores de NEM-1 apresentam algum subtipo de TNP durante o curso da doença [19], sendo esses responsáveis por mortes prematuras nestes pacientes [20].

Em 2010, uma atualização do sistema de classificação proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) dividiu os TNPs em três categorias de acordo com o índice proliferativo Ki-67 e o índice de mitose (/10HPF): (1) tumor neuroendócrino pancreático bem-diferenciado grau 1 (G1; <2 mitoses/10HPF e <3% de índice Ki-67); (2) tumor neuroendócrino pancreático bem-diferenciado grau 2 (G2; 2 a 20 mitoses/10HPF ou 3 a 20% de índice Ki-67) e (3) carcinoma neuroendócrino pancreático pouco-diferenciado grau 3 (G3; >20 mitoses/HPF e >20% de índice Ki-67) [21].

A malignidade nos diferentes tipos de TNPs é bem variada, sendo os glucagonomas e gastrinomas os tumores com maior índice e os insulinomas os de menor malignidade (apenas 10% dos casos) [13, 22].

A ablação cirúrgica é o tratamento de escolha [23]. Pacientes com TNPs apresentam taxas de sobrevida em 5 anos que variam de 97% em insulinomas benignos a menos de 30% em tumores não-funcionantes metastáticos [5, 13].

1.2. Insulinomas

Os insulinomas são tumores das células- β das ilhotas pancreáticas que hipoglicemia devido à hiperinsulinemia endógena [24]. Embora raros, são os TNPs funcionantes mais comuns (70 a 80%) [25, 26], apresentando incidência de um a quatro casos em 1.000.000 de pessoas por ano na população global [27-29]; sua maior incidência ocorre entre a terceira e a quinta décadas de vida, com pico aos 47 anos, e as mulheres são um pouco mais afetadas que os homens [7, 25].

Em sua maioria, os insulinomas são benignos, pequenos (86% sendo <2cm e 47% sendo <1cm), solitários, hipervascularizados e de natureza esporádica; aproximadamente, 10% são malignos, 10% múltiplos e de 5 a 16% associados à NEM-1 [30, 31].

A hipoglicemia é a principal manifestação clínica dos insulinomas [8]. O ganho de peso e a obesidade observados em alguns pacientes são resultantes do aumento da ingestão de carboidratos simples ou complexos usados para atenuar o quadro de hipoglicemia [32].

O diagnóstico é definido segundo a Tríade de Whipple [33]: (1) sintomas consistentes com hipoglicemia; (2) baixa concentração de glicose plasmática (<45mg/dL) e (3) alívio dos sintomas e normalização da glicemia após administração de glicose [34].

O teste de jejum prolongado (até 72 horas) é o teste diagnóstico clássico para avaliação de doenças hipoglicêmicas e deve ser conduzido quando a detecção de hipoglicemia espontânea não é praticável. O diagnóstico de hipoglicemia hiperinsulinêmica endógena exige a demonstração de hiperinsulinemia (concentração de insulina $\geq 6\mu U/_{mL}$ por radioimunoensaio e $\geq 3\mu U/_{mL}$ por dosagens imunométricas em vigência de hipoglicemia [35].

A localização tumoral é realizada por meio da ultrassonografia transabdominal, tomografia computadorizada ou imagem de ressonância magnética, as quais são limitadas, pois falham na detecção de insulinomas menores que 1cm de diâmetro [36, 37]. A laparoscopia com ultrassonografia intraoperatória, associada à palpação do pâncreas, apresenta sensibilidade >85% na detecção tumoral [38]. Os tumores podem estar localizados na cabeça, corpo ou cauda do pâncreas, sempre no interior do órgão [39]. A cirurgia para retirada do tumor é o tratamento mais indicado e possui alta taxa de sucesso [28], com uma cura em 70 a 90% dos casos [40, 41]. O tratamento clínico medicamentoso fica reservado para pacientes que não podem se submeter aos procedimentos cirúrgicos, para controle pré-operativo das glicemias ou para tumores metastáticos irressecáveis [39].

As características morfológicas e histoquímicas não conseguem predizer completamente o comportamento biológico dos insulinomas. Geralmente, o fenótipo invasivo local e a presença de metástases são as formas mais confiáveis de diagnosticar um tumor maligno [42, 43].

As metástases ocorrem com maior frequência no fígado e em linfonodos, mas também podem ser encontradas nos tecidos peritoneal e ósseo [30, 44, 45]. Nestes casos, os pacientes possuem taxa de sobrevida menor que dois anos, com recorrência tumoral em 60% dos casos [46]; apesar desta agressividade tumoral, existem pacientes com doença metastática que apresentam boa evolução clínica [25].

1.3. Aspectos moleculares dos insulinomas

Muito pouco se sabe a respeito das bases moleculares dos insulinomas. Alguns podem ter influência hereditária; por exemplo, cerca de 10% dos insulinomas estão associados à NEM-1 [31, 47], síndrome autossômica dominante que resulta da inativação do gene supressor de tumor *MEN1*, localizado na região cromossômica 11q13 [45, 48]. O produto do gene *MEN1*, a *menin*, está envolvida na regulação da transcrição gênica, proliferação celular, apoptose e instabilidade genômica [49].

A grande maioria dos insulinomas, no entanto, é esporádica e não está associada a síndromes genéticas.

1.3.1. Tumorigênese e progressão tumoral

Em estágios iniciais, já foram relatadas aneuploidias (trissomias ou tetrassomias) do cromossomo 6 [50], bem como a ativação de proto-oncogenes clássicos como *MYC* e $TGF-\alpha$ (fator de crescimento transformante-alfa) [51]. Em um modelo de roedor com hiperativação de Myc, após sete dias, as células das ilhotas pancreáticas apresentaram hiperplasia e aumento na vascularização e invasividade. Em outro estudo, a elevação dos níveis da proteína antiapoptótica BCL-2 também se mostrou relacionada à iniciação tumoral em um terço dos insulinomas [52].

Alterações gênicas no cromossomo 9 são relatadas em alguns estudos, como a perda da expressão do gene $p16^{INK4a}$ devido à deleção homozigótica ou hipermetilação na região 5' do gene, localizado em 9p21 [53]. Ganho no *locus* 9q34 também já foi observado em estágios iniciais em 50% dos insulinomas estudados [54].

Altos índices de perda de heterozigosidade (LOH) (93%) para marcadores no cromossomo 22q foram observados tanto em insulinomas malignos como benignos, dos quais 37% em 22q12, podendo, assim, existir um gene supressor de tumor nesta região [55].

A metilação das ilhas CpG da região promotora dos genes *ER* (receptor de estrógeno), *MINT1* e *MINT31* (codificantes para proteínas precursoras da amilóide-beta) p14 e p16 já foi encontrada em insulinomas [56]. Alterações durante a fase póstranscricional também já foram relatadas; o aumento da expressão do micro-RNA (miRNA) miR-204 está associado à tumorigênese de insulinomas [57].

1.3.2. Transformação maligna e formação metastática

Alguns genes implicados na tumorigênese de outras neoplasias também estão envolvidos na transformação maligna dos insulinomas; mutações no proto-oncogene *KRAS*, aumento da expressão do gene p53, expressão acentuada de TGF-α, bem como a ausência do gene supressor de tumor *PTEN* (fosfatase homóloga à tensina), são algumas das alterações já descritas [58, 59].

Recentemente, um novo gene potencialmente oncogênico foi identificado. A expressão elevada da proteína de adesão epitelial EpCAM (CD326) foi observada em 38% dos insulinomas benignos, 78% dos insulinomas malignos e 80% das suas respectivas metástases [60]. Esta glicoproteína também está associada a um prognóstico desfavorável em outros tipos tumorais [61], mas seu mecanismo de contribuição à malignidade não está claro.

A alta frequência de instabilidade de microssatélites (MSI) e expressão reduzida da proteína de reparo *mismatch* MLH1 devido à metilação do gene *MLH1* já foram relatadas em insulinomas, sendo estatisticamente significativos na distinção entre tumores malignos e benignos [62]. No entanto, a presença de metilação no gene *MLH1* não foi encontrada em um estudo envolvendo 25 insulinomas realizado por outro grupo de pesquisa [63].

Em suma, nota-se que diversas alterações genéticas como a ativação de protooncogenes, inativação de genes supressores de tumor, mutações somáticas, LOH e MSI, bem como mecanismos moleculares epigenéticos, estão associadas aos insulinomas.

A presente investigação iniciou-se a partir de um estudo realizado em nosso laboratório que identificou genes diferencialmente expressos entre insulinomas malignos e benignos por meio da técnica de microarranjos de cDNA (*CodeLink Human 20K I Bioarray*, GE Healthcare Biosciences) [64]. Dentre os resultados, o gene *MET*, que codifica para c-MET, foi observado com expressão aumentada nos insulinomas malignos. Posteriormente, uma investigação abordou individualmente as amostras de insulinomas e confirmou a expressão aumentada do gene *MET*, bem como o aumento da expressão do gene *HGF* (codificante para o fator de crescimento hepatocítico – ligante de c-MET) em insulinomas malignos e metástases quando comparados aos tumores benignos [65].

À luz destes conhecimentos, selecionamos as moléculas que compõem a via HGF/MET para estudos adicionais, uma vez que esta via de sinalização está envolvida em processos celulares proliferativos e na tumorigênese de diferentes neoplasias [66, 67].

1.4. Via de sinalização HGF/MET

O HGF, também conhecido como fator de dispersão (SF), é secretado pelas células mesenquimais e exerce efeito parácrino sobre células de origens epitelial e endotelial [68], com importante função na organogênese, desenvolvimento embrionário, regeneração hepática e cicatrização tecidual [69-71], através da interação com seu receptor c-MET, da família dos receptores tirosinocinase transmembrana e seu único receptor conhecido [72].

No pâncreas, o HGF promove a proliferação e funcionalidade das ilhotas, tornando as células- β resistentes à morte celular, além de induzir a expressão de insulina, glucoquinase e do transportador de glicose (GLUT-2) [73-75].

Em um estudo realizado durante o período gestacional em camundongos *knockout* condicionais para *Met* no pâncreas, observou-se diminuição da proliferação das células- β e aumento dos índices apoptóticos, levando à baixa expansão da massa celular, hiperglicemia, hipoinsulinemia e intolerância à glicose [76].

Apesar das funções atribuídas ao *HGF* e *MET* no pâncreas, os níveis de mRNA e proteína destes genes são baixos no tecido pancreático normal humano, com índices ainda menores nas ilhotas, muitas vezes com o transcrito indetectável [77].

O HGF (105-kD) é secretado em uma forma precursora inativa (pró-HGF) de cadeia única (92-kD) de 728 aminoácidos e permanece nesta condição associado à matriz extracelular. Sob estímulo, o HGF torna-se ativo por meio da catalisação proteolítica que resulta em uma molécula de duas subunidades, consistindo de uma cadeia- α pesada (69-kD) e uma cadeia- β leve (34-kD) ligadas por uma ponte dissulfeto [78], como mostrado na Figura 1, a seguir:



Figura 1. Ativação do HFG. O pró-HGF é secretado e clivado em Arg²⁹⁴ e Val⁴⁹⁵ por algumas moléculas, tornando-se ativo. (Adaptado de Nakamura, 2010 [68]).

Uma proteinase plasmática circulante tipo XII, denominada de ativadora do HGF (HGFA), codificada pelo gene *HGFA*, é a molécula mais potente envolvida no processo de ativação do HGF [78], embora outras proteínas também possuam esta habilidade de conversão, como matriptase – uma serinoproteinase transmembrana tipo II codificada pelo gene *ST14* –, além de hepsina e uPA (ativador de plasminogênio tipo-urokinase) [79, 80].

A atividade da HGFA e da matriptase é altamente regulada por duas proteínas transmembranas tipo I, denominadas protease inibidora tipo-kunitz do tipo 1 (HAI-1) e do tipo 2 (HAI-2); elas são moléculas recém-descobertas com dois domínios serinoprotéicos tipo-kunitz na porção extracelular [78]. Interessantemente, o cDNA clonado de HAI-2 revelou que esta proteína é idêntica à bicunina placentária [81].

Em tecidos epiteliais, apenas HAI-1 forma um complexo com HGFA na superfície celular e atua na inibição de matriptase, enquanto HAI-2 permanece no citoplasma celular [82].





Figura 2. Via de sinalização HGF/MET. A ativação do HGF é catalisada por HGFA e matriptase, permitindo, assim, sua ligação com c-MET. As serinoproteinases HAI-1 e HAI-2 atuam na inibição de HGFA e matriptase.
O receptor c-MET (190-kD), originado de um precursor de cadeia única por clivagem proteolítica após glicosilação, possui uma estrutura heterodimérica incomum composta de uma subunidade- α extracelular (50-kD), contendo um domínio Sema, um domínio rico em cisteína e quatro domínios tipo-imunoglobulina, e uma subunidade- β (145-kD), constituída de um domínio transmembrana, um domínio justamembrana e um domínio cinase intracelular [83].

A ligação de HGF ao receptor c-MET promove a dimerização e fosforilação dos resíduos de tirosina na porção C-terminal (Y1349 e Y1356), resultando em sua ativação. Este substrato, permite a exposição de sítios de fosforilação de c-MET a proteínas adaptadoras, como Grb2 e Shc, ou à subunidade p85 da cinase do fosfatidilinositol-3 (PI3K), desencadeando sinais das vias MAPK e Akt, respectivamente [84]. A proteínocinase-C (PKC) fosforila c-MET no resíduo S985, atuando como um regulador negativo [84].

A estrutura de c-MET e as vias de sinalização induzidas após sua ativação são demonstradas na Figura 3, a seguir:



Figura 3. Estrutura do receptor c-MET. A porção extracelular se caracteriza por um domínio Sema, um domínio rico em cisteína e quatro domínios tipo-imunoglobulina. A porção intracelular contém um domínio cinase e resíduos de tirosina. Entre as porções, há também um domínio transmembrana. A fosforilação de resíduos específicos desencadeiam vias de sinalização positivas, como migração, sobrevivência e invasão celular, como negativas, que resultam na degradação de c-MET. Os número nos parênteses à esquerda demonstram os limites dos aminoácidos em cada domínio. (Adaptado de Lai, 2009 [84]).

A ativação de c-MET leva a uma variedade de respostas celulares, como indução da mitogênese, motilidade, sinais de sobrevivência, invasão da matriz extracelular e angiogênese [85, 86]. Logo, o equilíbrio dos componentes da via HGF/MET mostra-se importante na manutenção das condições celulares normais.

1.5. HGF/MET e suas implicações no câncer

Diversos estudos relatam que alterações moleculares na via de sinalização HGF/MET participam da patogênese de alguns tipos de cânceres humanos [67, 87], cuja ativação imprópria de c-MET resulta em proliferação, mecanismos antiapoptóticos, migração, angiogênese, invasividade e formação metastática [66, 88].

O aumento da expressão de HGF e c-MET está relacionado a diversos tipos tumorais, como carcinoma de cólon, mama, pulmão e rins. Expressão aumentada de *HGF* e *MET* já foi detectada em tumores tireoideanos [72] e seus índices de expressão estão correlacionados com o estágio tumoral e com o prognóstico [89]. Concentrações elevadas de HGF circulante foram associadas ao tamanho tumoral, metástases à distância e menor sobrevida de pacientes com câncer de mama [90].

Mutações somáticas no gene *MET* já foram descritas em alguns tipos de câncer, restritas aos éxon 2 (domínio SEMA), éxon 10 (domínio tipo-imunoglobulina), éxon 14 (domínio justamembrana), éxon 16 (sítio de ligação ao ATP), éxon 17 e 18 (domínio tirosinocinase) e éxon 19 (sítio de autofosforilação) [91-101]; estas mutações encontram-se resumidas na Figura 4.



Figura 4. Mutações no gene *MET*. Esquema de mutações já descritas no gene *MET*, nos seus diferentes domínios. (Adaptado de Ma, 2008 [72]).

Em 2004, um grande estudo envolvendo 100 pacientes com câncer pulmonar, acompanhados por 72 meses, demonstrou que os níveis de mRNA de *HGF*, *MET*, *HGFA*, *HAI-1* e *HAI-2*, mas não *ST14*, encontravam-se alterados. Ambas HAIs mostraram-se com expressão protéica reduzida em tumores avançados em relação a tumores em estágios iniciais [102]. Há evidências da ativação autócrina da via HGF/MET na linhagem celular de carcinoma pulmonar H460 [103].

Em câncer de próstata, as concentrações plasmáticas de HAI-1 foram elevadas em pacientes com metástases à distância em comparação aos pacientes com tumor confinado ao órgão. Os autores também implicam HAI-1 como um potencial marcador para este tipo de tumor, enquanto a expressão de HAI-2 não mostrou diferenças significantes [104]. Um outro estudo do mesmo grupo de pesquisa encontrou concentrações elevadas de HGFA no estágio mais avançado de câncer de próstata (D3) em relações aos outros subgrupos [105].

Estudos também já constataram a baixa expressão gênica de *HAI-2* em glioblastoma, carcinoma renal e carcinoma hepatocelular, assim como eventos de hipermetilação em sua região promotora [106-109].

A Tabela 1 resume os resultados de estudos de expressão gênica da via HGF/MET em diversas linhagens celulares humanas de diferentes tipos tumorais.

TIPO	LINHAGEM	ПСЕ	. MET	ПСЕА		TTAT 1	TIAL 2
TUMORAL	CELULAR	HGF C-MEI		HGFA	MATRIPTASE	ASE HAI-I	HAI-2
câncer de próstata	LN-CAP	-	-	**	***	***	***
câncer de próstata	DU-145	*	*	*	* * *	***	***
câncer de próstata	PC-3	*	***	*	***	***	***
câncer de mama	MCF-7	*	*	*	* * *	***	***
câncer de mama	MDA MB-231	-	***	***	*	*	***
câncer colorretal	HT-115	-	***	**	* * *	***	***
câncer colorretal	HRT-18	-	***	***	**	***	***
câncer de bexiga	T-24	*	*	*	-	***	***
câncer de bexiga	EJ-138	*	***	*	-	*	***
câncer pancreático	MIA PACA-2	*	*	*	-	*	***
câncer pulmonar	A-549	*	-	***	**	*	***
câncer de fígado	PLC PRF-5	*	*	*	-	*	***
melanoma	G-361	-	**	-	-	***	*
fibroblasto	MRC-5	***	**	**	*	-	*
câncer epitelial	ECV-304	-	***	*	-	***	***

Tabela 1. Sumário de expressão gênica da via HGF/MET em linhagens celulares humanas.

Legenda. -, não detectado; *, expressão fraca; **, expressão moderada; ***, expressão forte. (Adaptado de Parr, 2010 [110]).

Em resumo, são diversas as alterações reportadas nos componentes da via de sinalização HGF/MET em diversos tipos de câncer. Entretanto, não há estudos desta via em insulinomas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Visto que a as características morfológicas e imuno-histoquímicas não conseguem predizer completamente o comportamento biológico dos insulinomas e devido à importante função da via HGF/MET na proliferação, invasividade celular e formação metastática em diversos tipos de câncer humano, este estudo teve por objetivo:

- avaliar a expressão do mRNA dos genes HGF, MET, HGFA, ST14, HAI-1 e
 HAI-2 em insulinomas benignos e malignos;
- 2- confirmar a expressão do(s) gene(s) que se apresentarem diferencialmente expressos entre tumores malignos e benignos por imuno-histoquímica;
- 3- analisar a presença de mutações somáticas nos éxons 2, 10, 14, 16, 17 e 19 do gene *MET*;
- 4- correlacionar os resultados da expressão gênica com os dados anatomopatológicos dos pacientes.

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

Na abordagem dos insulinomas, as características histopatológicas não conseguem predizer completamente o comportamento biológico tumoral e a presença de fenótipo invasivo local e de metástase são as formas mais confiáveis de diagnosticar um tumor maligno.

Neste cenário, o melhor entendimento molecular se faz necessário na tentativa de buscar marcadores que possam auxiliar no reconhecimento do potencial maligno dos insulinomas.

Tendo em vista a contribuição ativa da via HGF/MET em processos oncogênicos em diversos tipos de câncer humano, consideramos relevante seu estudo nos insulinomas.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Casuística

Vinte e sete amostras foram obtidas após ablação cirúrgica de pacientes com diagnóstico de neoplasia endócrina pancreática produtora de insulina; todos internados sob supervisão do Grupo Geral de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP).

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Pesquisa e Pós-Graduação do Departamento de Clinica Médica da FMUSP e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP.

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM-25) da FMUSP.

As 27 amostras de insulinomas foram constituídas de: 16 tumores neuroendócrinos pancreáticos produtores de insulina bem-diferenciados grau 1 (G1; <2 mitoses/10HPF e <3% de índice Ki-67), seis tumores neuroendócrinos pancreáticos produtores de insulina grau 2 (G2; 2 a 20 mitoses/10HPF ou 3 a 20% de índice Ki-67), dois carcinomas neuroendócrinos produtores de insulina pouco-diferenciados grau 3 (G3; >20 mitoses/HPF e >20% de índice Ki-67) e três metástases hepáticas produtoras de insulina, dentre as quais, apenas um destes tecidos metastáticos corresponde a um dos carcinomas primários estudados.

A Tabela 2 demonstra os dados demográficos, anatomopatológicos, bioquímicos e histopatológicos dos pacientes portadores de insulinoma.

N°	SEXO	IDADE (anos)	Ki-67 % (IMH)	MITOSE (/10HPF)	TAMANHO TUMORAL (cm)	DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO
1	М	42	1	1	12.0	metástase hepática
2	М	60	1	0	1.0	G1
3	F	42	1	1	0.8	G1
4	М	51	1	2	1.5	G2
5	М	73	5	0	2.0	G2
6	М	25	5	0	2.0	G2
7	М	ND	2	1	2.5	metástase hepática
8	М	19	1	1	2.0	G1
9	М	28	1	1	1.5	G1
10	F	42	1	0	2.0	G1
11	F	ND	ND	ND	ND	G1
12	F	71	1	1	0.8	G1
13	М	40	2	1	2.4	G1
14	F	57	5	1	2.6	G2
15	F	ND	1	1	1.0	G1
16	М	54	1	0	1.7	G1
17	F	28	5	4	0.7	G2
18	F	35	1	0	0.8	G1
19	F	37	2	0	1.2	G1
20	F	58	5	1	2.6	G3*
21	F	44	1	0	1.4	G1
22	F	42	1	0	0.9	G1
23	F	ND	ND	ND	ND	G2
24	М	73	1	0	1.8	G1
25	F	44	1	0	1.5	G1
26	М	43	ND	1	2.0	G3*
27	М	43	5	3	1.0	metástase hepática

Tabela 2. Dados demográficos, anatomopatológicos, bioquímicos e histopatológicos dos pacientes.

Legenda. * diagnóstico G3 baseado na presença de metástase hepática; F, feminino; G1, grau 1; G2, grau 2; G3, grau 3; HPF,

high-power fields; M, masculino; ND, não-disponível.

4.2. Metodologia

4.2.1. Extração do RNA total

Os tecidos tumorais foram armazenados imediatamente, após ressecção cirúrgica, em tubos criogênicos de 2mL contendo 1mL de *RNAlater (Ambion Inc., Austin, TX, USA)* e acondicionados em geladeira a -4°C por um período máximo de uma semana até o processamento. O RNA total de cada uma das amostras foi extraído pelo método de isotiocianato de guanidina com *TRIzol Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)*.

Inicialmente, um pequeno fragmento do tecido (aproximadamente 20mg) foi congelado em nitrogênio e, então, pulverizado no equipamento *Mikro-Dismembrator U* (*B. Braun Biotech, Melsungen, Hesse, Alemanha*). Ao tecido pulverizado, foi adicionado 1mL de *TRIzol*. Após homogeneização, a mistura foi transferida para um tubo de 1,5mL estéril e repousada à temperatura ambiente por um período de cinco minutos. Então, adicionou-se 200µL de clorofórmio à solução, a qual foi agitada vigorosamente no *Vortex Genie 2T* (*Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA*) por 15 segundos. Mais uma vez, repousada à temperatura ambiente por 3 minutos e, em seguida, centrifugada à 12.000g por 15 minutos a 4°C.

Posteriormente, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 1,5mL estéril e o RNA precipitado com 500µL de isopropanol. A solução foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C. Conservado o *pellet* de RNA formado, adicionou-se 1mL de etanol 75% para lavagem; a solução foi homogeneizada e centrifugada a 7.500g por 5 minutos a 4°C e, então, o RNA foi dissolvido em água estéril livre de RNAse e o tubo armazenado a - 80°C até o momento do uso.

As concentrações de RNA foram determinadas por espectrofotometria no equipamento *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (*NanoDrop Technologies. Wilmington, DE, USA*) em comprimento de onda de 260nm, adotando como valor padrão 1 OD260 = 40ng/µL de RNA e então, avaliados quanto ao seu grau de pureza pela relação OD 260/280 \geq 1,8 e quanto à sua integridade por eletroforese em gel de agarose 1%, apresentado na Figura 5. A qualidade dos RNAs também foi analisada pela plataforma *Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc. Huntsville, AL, USA*), adotando-se RIN (*RNA Integrity Number*) > 7, conforme mostra a Figura 6.

Então, todas as amostras de RNA foram ajustadas a uma concentração de 100ng/µL para síntese de cDNA.



Figura 5. Géis de agarose 1% agrupados e representativos dos RNAs isolados de insulinomas, demonstrando a integridade do material. As setas indicam as subunidades 28S e 18S dos RNAs ribossomais.



Figura 6. Análise da qualidade dos RNAs extraídos de insulinomas demonstrada pelo valor de RIN superior a 7. Os picos em cada gráfico corresponde às subunidades 5.8S, 18S e 28S do RNA ribossomal.

4.2.2. Síntese do cDNA

Para a síntese do cDNA foi utilizado 1 µg de cada amostra de RNA. Foi utilizado o conjunto de reagentes *SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA*) de acordo com o manual do fabricante, com algumas modificações; primeiramente, em um tubo foi adicionado 1µL (100ng/mL) de RNA, 1µL de Oligo(dT) (500μ g/µL), 1µL de dNTP (10mM) e água estéril para 20µL. Este tubo foi levado ao termociclador a 65°C por cinco minutos e, rapidamente resfriado em gelo por um minuto. Em seguida foi centrifugado e adicionados 4µL de tampão *5X First-Strand*, 1µL de DTT (0,1M), 1µL de *SuperScript II RT* (200U) e 1µL de água estéril. Após homogeneização, o tubo foi mantido no termociclador a 50°C por uma

hora e 75°C por 15 minutos. Posteriormente, as amostras de cDNA foram diluídas para concentração de 100ng/µL para posterior utilização no estudo.

4.2.3. Determinação dos genes de referência

Antes de iniciar as reações necessárias para a determinação da expressão do mRNA dos genes-alvo, efetuou-se a escolha dos genes de referência, ou seja, aqueles cujo mRNA apresentava menor variação de expressão entre os diferentes tipos teciduais analisados. Uma vez que o gene *PSMC6* já havia sido validado em estudos anteriores do nosso laboratório, foi utilizado o produto comercial *TaqMan Express Endogenous Control Plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*, como evidenciado na figura abaixo, para a determinação do segundo gene de referência.

A	18S	Gapdh	HPRT1	GUSB
В	ACTB	B2M	HMBS	IPO8
C	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC
D	UBC	YWHAZ	PPIA	Polr2a
E	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADD45A
F	PUM1	PSMC4	EIF2B1	PES1
G	ABL1	ELF1	MT-ATP6,LOC1001	MRPL19
Н	POP4	RPL37A	RPL30	RPS17

Figura 7. Placa utilizada na determinação do segundo gene de referência.

As amostras de cDNA foram aplicadas nas duas placas utilizadas no estudo da seguinte forma: no primeiro grupo de genes de ambas as placas foi depositado um *pool* de cDNA constituído por 10 amostras de insulinomas benignos G1 e G2; no segundo grupo, um *pool* de quatro amostras de insulinomas malignos G3 e metástases e; por fim, no terceiro grupo, um *pool* de 5 tecidos peritumorais.

Cada umas das misturas descritas acima foi elaborada com o reagente *TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)* de modo que cada poço da placa apresentasse a quantidade final de 80ng de cDNA em 20µL de solução. Uma vez finalizado o procedimento de preparo, a placa foi depositada no equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* para a realização da reação nas condições recomendadas pelo fabricante.

A análise dos dados foi realizada no site <u>http://www.leonxie.com/referencegene.php</u> a partir dos valores de Ct (*threshold cycle*), no qual o aumento do sinal associado à fase exponencial de amplificação do produto de PCR começa a ser detectado.

O gene *RPL30*, que codifica a proteína ribossomal L30, foi eleito como melhor gene de referência para esta pesquisa, pois mostrou-se mais estável em relação aos demais genes analisados (Figura 8). A classificação abrangeu o conjunto de análises *BestKeeper*, *Normfinder*, *GeNorm* e *Delta CT*.



Figura 8. Gráfico representativo da determinação do segundo gene de referência. O gene *RPL30* demonstrou a menor variação de expressão entre os tecidos analisados.

4.2.4. Expressão dos genes da via HGF/MET

Uma vez determinados os genes de referência, a análise da expressão gênica de cada amostra foi determinada por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), realizadas no equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* utilizando o sistema *TaqMan (Applied Biosystems)*.

As reações de RT-qPCR foram realizadas com volume final de 20μ L contendo os seguintes componentes: 1μ L de cDNA, 1μ L da sonda *TaqMan Gene Expression Assay (20X)*, 10μ L de *TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)* e 8μ L de água estéril.

A Tabela 3 mostra a identificação dos genes-alvo (*HGF*, *MET*, *HGFA*, *ST14*, *HAI-1* e *HAI-2*) e dos genes endógenos (*PSMC6* e *RPL30*), utilizados como referência para as reações de amplificação. Como controle positivo, uma amostra de tecido hepático normal foi utilizada para os genes *HGF*, *MET*, *HGFA* e *ST14*, e uma amostra de tecido placentário normal utilizada para os genes *HAI-1* e *HAI-2*.

GENE	GENE ID (sonda)	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	TAMANHO DO PRODUTO DA RT-qPCR
HGF	3082 (Hs00300159_m1)	7q21.1	92pb
MET	4233 (Hs01565584_m1)	7q31	73pb
HGFA	3083 (Hs00173526_m1)	4p16	70pb
<i>ST14</i>	6768 (Hs01058386_m1)	11q24-q25	85pb
HAI-1	6692 (Hs00173678_m1)	15q15.1	72pb
HAI-2	10653 (Hs01070442_m1)	19q13.1	64pb
PSMC6	5706 (Hs01652481_g1)	14q22.1	147pb
RPL30	6156 (Hs00265497_m1)	8q22	149pb

Tabela 3. Identificação dos genes utilizados no estudo.

De acordo com o fabricante, não é necessário realizar as curvas de eficiência da amplificação entre os genes-alvo e os genes endógenos, uma vez que as sondas utilizadas nos ensaios de expressão gênica do sistema TaqMan (*Applied Biosystems*) foram validados com 100% de eficiência quando testados em uma amplitude de diluição de 6-log em amostras livres de inibidores de PCR.

Os valores quantitativos foram obtidos pelo valores de Ct, no qual o aumento do sinal associado à fase exponencial de amplificação do produto da PCR começa a ser detectado. O cálculo matemático utilizado para aferir a quantificação da expressão (Qe) dos genes analisados foi uma variação do Método Comparativo descrito por Livak e Schmittgen em 2001 [111], definida como $2^{-_{\Lambda}Ct}$, levando-se em consideração a igualdade na eficiência de amplificação das sondas dos genes do estudo, demonstrado pela seguinte fórmula:

$$Qe = 2^{-(Ct \text{ do gene-alvo} - Ct \text{ do gene de referência})}$$

4.2.5. Análise imuno-histoquímica

Após o levantamento de 19 casos de insulinomas (11 tumores G1, seis G2 e dois G3) por imuno-histoquímica e preparo das lâminas histológicas pelo Departamento de Anatomia Patológica do HCFMUSP com corte tecidual a 3µm de espessura, o material foi desparafinizado em um banho de xilol por 10 minutos, seguidos de mais três banhos de cinco minutos do mesmo reagente e reidratado com banhos descrescentes de álcool absoluto, álcool 95% e álcool 70% por cinco minutos cada. Então, o material foi colocado embebido com ácido fórmico por três minutos, lavado por água corrente e água deionizada e colocado em tampão PBS.

A recuperação antigênica foi realizada a 125°C em panela de pressão Pascal por um minuto com tampão de citrato (pH 6,0). Para bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram colocadas em banhos de água oxigenada 10V por cinco minutos por sete vezes. Então, lavadas em água corrente e banhadas três vezes com PBS por cinco minutos. Tomou-se o cuidado de bloquear reações inespecíficas; para tanto, o material foi colocado em solução de leite desnatado 2% por 20 minutos.

Os anticorpos primários para c-MET (ab51067) e HAI-1 (ab128492) (*Abcam, Cambridge, USA*) foram diluídos a 1:500 e 1:350 respectivamente e incubados sob os cortes separadamente em câmara úmida por 20 horas. Então, o material foi lavado em PBS por três minutos por três vezes e incubados com o uso do *kit Novolink Polymer Detection System (Leica Biosystems, Alemanha)*. Após o período, as lâminas foram lavadas novamente com PBS por três minutos por três vezes. A revelação foi realizada com o uso do DAB (*Leica*) por cinco minutos. O material foi então lavado em água corrente por cinco minutos, contracorado com Hematoxilina de Harris e lavado novamente em água corrente por cinco minutos.

As lâminas foram desidratadas com banhos sequências de álcool 70%, álcool 95% e três banho de álcool absoluto por cinco minutos cada. Em seguida, diafanizado com três banhos de xilol por cinco minutos e selado com resina sintética e lamínula.

Foi realizada captura das imagens utilizando o microscópio óptico de luz convencional Leica DM2500 (*Leica*), com objetiva de 40x, acoplado à câmera fotográfica Leica DFC295 (*Leica*), utilizando-se o programa LAS v4.1 (*Leica*). Para cada lâmina, foram fotografados 10 campos aleatórios contendo a massa tumoral. A área com imunorreatividade positiva para cada anticorpo foi quantificada com auxílio do programa ImageJ (*National Institutes of Health, USA*), como demonstrado a seguir.

Embora os corantes utilizados no processo de imuno-histoquímica possuam cores diferentes (marrom para DAB e azul para hematoxilina), existem espectros sobrepostos nas imagens obtidas; portanto, a contribuição relativa de cada corante deve ser separada. Para tanto, utilizou-se uma técnica de transformação de cor com base nas informações originais de cada foto, denominada *Color Deconvolution* [112]. Após a

separação das imagens em três canais distintos (hematoxilina, DAB e um terceiro componente gerado pela composição de cores residuais da hematoxilina e do DAB), foi realizada a seleção dos tons de marrom representativos de marcação positiva para o anticorpo utilizando a ferramenta *Threshold* do ImageJ. Essa ferramenta permite a visualização dos tons de marrom em um histograma, pelo qual, então, é feita a seleção. Procurou-se manter constante o intervalo de tons selecionados para cada anticorpo. A área marcada dos tons selecionados foi então normalizada pela área total do campo, obtendo-se um valor em porcentagem da área positiva para o anticorpo. A mediana dos valores obtidos dos 10 campos selecionados de cada lâmina foi utilizada como resultado final para análise.

4.2.6. Sequenciamento do gene MET

As reações de sequenciamento foram realizadas em 22 amostras de insulinomas para os éxons 2, 10, 14, 16, 17 e 19 do gene *MET*, de modo que cada éxon foi delimitado por dois pares de oligonucleotídeos, exceto para o éxon 2, onde foram sintetizados três primers, os quais estão representados na Tabela 4, a seguir:

ÉXON	INICIAI	TAMANHO DO	
	SENSO	ANTISSENSO	RT-qPCR
2a	CGACACCTACTATGATGATCAACTC	ТСТСТБААСТСАББТААААСАТСАА	380pb
2b	TCCACAAAGAAGGAAGTGTTTAAT	TGCTGGAGACATCTCACATTG	250pb
2c	TCGAACAGAGTTTACCACAGC	CAGAAAGCACTTACCTGCATGA	200pb
10	TTGACTGTGCCTCTGACCTG	TGTGGCTTTCATGGTACCTG	289pb
14	GCCCATGATAGCCGTCTTTA	CAGTGGGTTGTGACATTGTTG	256pb
16	CGCAGTGCTAACCAAGTTCT	ACTTTTGTGGTTTGCAACCT	165pb
17	CCACCACTGGATTTCTCAGG	CCATCCCTTCAAAATAGGCC	269pb
19	TTCTATTTCAGCCACGGGTAA	TTGGTTATCTCTGAGTTTCTCCTC	240pb

Tabela 4. Sequência dos iniciadores do gene *MET* para sequenciamento.

Primeiramente, as reações de amplificação para cada éxon do gene *MET* foram realizadas obedecendo as seguintes condições: 94°C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguidos de 72°C por 10 minutos.

Antes de efetuar a reação de sequenciamento, 5µL do produto de PCR de cada região exônica estudada foram purificados com 2µL de *ExoSAP-IT (USB, Cleveland, OH, USA)*. Para isso, a mistura foi incubada em termociclador por dois períodos de 15 minutos, o primeiro em temperatura de 37°C, e, o segundo, em temperatura de 80°C.

Os produtos de PCR tratados com *ExoSAP-IT* foram sequenciados em sequenciador automático *3130X/Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* de acordo com os procedimentos recomendados no manual do *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)*. Desse modo, a reação de sequenciamento foi feita em volume final de 10µl contendo 5µL do produto de PCR purificado, 1µl do BigDye

Terminator, 1 μ L da solução 5,0 ρ mol/ μ L do oligonucleotídeo iniciador senso, 1,5 μ l do tampão contendo TrisHCl 1M pH 9.0 e MgCl₂ 50mM e 1,5 μ L de água estéril. As reações de amplificações foram realizados de forma idêntica à descrita anteriormente.

Em seguida, os produtos da reação descrita acima foram purificados por precipitação. Nesta etapa, 40µL de isopropanol 65% foram acrescidos ao produto de cada reação de sequenciamento, com posterior incubação a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos em rotação de 3000g; o isopropanol foi removido e 200µL de etanol 60% adicionados. Uma nova centrifugação foi executada, desta vez por 5 minutos, e então o etanol foi removido. Por fim, as amostras foram secas, dissolvidas em 10µL de formamida e aplicadas no sequenciador automático.

A leitura do sequenciamento de cada éxon foi realizada utilizando-se a ferramenta Sequencher 5.1 (Gene Codes Corporation, Ann Harbor, MI, USA).

4.2.7. Análise estatística

Os testes estatísticos foram bicaudais, com significância fixada em 0,05. As variáveis contínuas foram avaliadas usando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste não-paramétrico de comparações múltiplas Dunn e coeficiente de correlação Spearman. Os valores foram expressos em medianas, valores mínimos e máximos. Os dados foram compilados em planilhas de cálculos e analisados utilizando-se o programa *JMP 10* (*SAS Institute Inc., NC, USA*).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Análise da expressão gênica

No presente estudo, avaliou-se a expressão do mRNA dos genes *HGF*, *MET*, *HGFA*, *ST14*, *HAI-1* e *HAI-2* nos diferentes subtipos de insulinomas por RT-qPCR. Os genes endógenos *PSMC6* e *RPL30* foram utilizados como referência, já validados em estudos anteriores do nosso laboratório. Como controle positivo, uma amostra de tecido hepático normal foi utilizada para os genes *HGF*, *MET*, *HGFA* e *ST14*, e uma amostra de tecido placentário normal foi utilizada para *HAI-1* e *HAI-2*. A expressão de cada gene-alvo foi representada pela média dos valores de Ct (*threshold cycle*) e considerada relevante apenas quando apresentaram significância estatística (p<0,05).

5.1.1. Expressão do mRNA do gene HGF

Para o gene *HGF*, os insulinomas malignos (G3) e metástases apresentaram maior expressão em relação ao tumores benignos G1 (p=0,0088), como demonstra a Figura 9.



Figura 9. Expressão elevada do mRNA do gene *HGF* entre os insulinomas malignos (G3) e metástases em relação aos insulinomas benignos G1. Metástases estão indicadas como círculos vermelhos preenchidos.

5.1.2. Expressão do mRNA do gene MET

Para o gene *MET*, os insulinomas malignos e metástases apresentaram maior expressão tanto em relação ao tumores benignos G1 (p=0,0026) quanto em comparação aos benignos G2 (p=0,0387), conforme demonstra a Figura 10.



Figura 10. Expressão elevada do mRNA do gene *MET* entre os insulinomas malignos (G3) e metástases em relação aos tumores benignos G1 e G2. Metástases estão indicadas como círculos vermelhos preenchidos.

5.1.3. Expressão do mRNA do gene HGFA

Nenhuma amostra de insulinoma apresentou expressão detectável do mRNA do gene *HGFAC*. Demonstrada na Figura 11A, apenas a amostra de tecido hepático normal, utilizado como controle positivo, apresentou curva de amplificação. A ausência do produto da RT-qPCR das amostras de insulinomas foi confirmada em gel de agarose 2% com o uso do *GelRed (Biotium Inc., San Francisco, USA)* para coloração dos ácidos nucléicos, como mostra a Figura 11B.



Figura 11. Expressão do mRNA do gene *HGFA* nos insulinomas. Não houve expressão detectável em nenhuma das amostras de insulinoma analisadas. **A**, curva de amplificação da RT-qPCR demonstra ausência de expressão dos insulinomas; **B**, gel de agarose 2% confirma a ausência do produto de 70pb da RT-qPCR nas amostras de insulinoma. CP, controle positivo; CN, controle negativo.

5.1.4. Expressão do mRNA do gene ST14

Para o gene *ST14*, os insulinomas malignos e metástases apresentaram maior expressão em relação ao tumores benignos G1 (p=0,0018), conforme demonstra a Figura 12.



Figura 12. Expressão elevada do mRNA do gene *ST14* entre os insulinomas malignos (G3) e metástases em relação aos tumores benignos G1. Metástases estão indicadas como círculos vermelhos preenchidos.

5.1.5. Expressão do mRNA do gene HAI-1

A expressão reduzida nos níveis do mRNA do gene *HAI*-1 foi constatada nos insulinomas malignos quando comparados aos tumores benignos G1 (p=0,0011), conforme Figura 13.



Figura 13. Expressão reduzida do mRNA do gene *HAI-1* entre os insulinomas malignos (G3) e metástases quando comparada aos insulinomas benignos G1. Metástases estão indicadas como círculos vermelhos preenchidos.

5.1.6. Expressão do mRNA do gene HAI-2

Para o gene *HAI-2*, não houve diferença na expressão do mRNA entre os insulinomas malignos e benignos, conforme mostra Figura 14.



Figura 14. Ausência de expressão diferencial do mRNA do gene *HAI-2* entre os subgrupos de insulinomas. Metástases estão indicadas como círculos vermelhos preenchidos.

5.2. Análise imuno-histoquímica

5.2.1. Expressão protéica de c-MET

Foi observada discreta positividade para c-MET nos insulinomas G1 (Figura 15) e G2 (Figura 16), com a marcação visível no citoplasma. Nos insulinomas malignos G3, notou-se imunorreação mais intensa, abrangendo o citoplasma e a membrana plasmática (Figura 17). A porcentagem de área de marcação positiva do c-MET nos insulinomas malignos G3 foi estatisticamente maior em relação aos insulinomas G1/G2 agrupados (p=0,0284), conforme demonstra a Figura 18. Observou-se também expressão intensa do c-MET na membrana plasmática das células acinares e ductais do pâncreas exócrino (Figura 19) em todos os subtipos tumorais.



Figura 15. Expressão citoplasmática discreta para c-MET em insulinomas benignos G1. **A**, aumento de 100x. **B**, detalhe do campo anterior em que se notam células acinares com marcação nítida na membrana plasmática e células tumorais (no centro) exibindo expressão discreta, em sua maioria citoplasmática (aumento de 400x).



Figura 16. Expressão discreta do c-MET em insulinomas G2. **A**, aumento de 100x. **B**, detalhe do campo anterior, em que se observam células acinares exibindo forte expressão na membrana plasmática e células tumorais (no centro) com marcação discreta no citoplasma da maioria das células; poucos elementos celulares exibem expressão na membrana plasmática (aumento de 400x).



Figura 17. Marcação mais intensa para c-MET em insulinomas malignos G3 em comparação aos G1 e G2. **A**, aumento de 100x. **B**, as setas indicam algumas imunorreação positiva na membrana plasmática das células tumorais (aumento de 400x).



Figura 18. Aumento da expressão protéica de c-MET nos insulinomas malignos (G3) em relação aos tumores G1/G2.





Figura 19. Intensa marcação do c-MET na membrana plasmática em células do pâncreas exócrino nos insulinomas. **A**, células acinares (aumento de 400x). **B**, células ductais (aumento de 400x).

5.2.2. Expressão protéica de HAI-1

Observou-se discreta positividade para HAI-1 no citoplasma das células dos insulinomas G1 (Figura 20) e G2 (Figura 21). Nos insulinomas G3, a marcação foi bastante heterogênea, com células exibindo marcação moderada, outras marcação discreta e algumas células negativas para HAI-1 (Figura 22). As células do pâncreas exócrino exibiram marcação mais intensa para HAI-1 em relação àquelas com morfologia de células das ilhotas pancreáticas. Não houve diferença estatística da expressão protéica de HAI-1 entre os subtipos tumorais (Figura 23).



Figura 20. Expressão citoplasmática discreta para HAI-1 em insulinomas G1. **A**, nota-se a presença de células do pâncreas exócrino com marcação mais intensa do que as células das ilhotas pancreáticas (porção superior do campo); aumento de 100x. **B**, detalhe das ilhotas pancreáticas exibindo fraca expressão citoplasmática de padrão granuloso; aumento de 400x.


Figura 21. Expressão citoplasmática discreta para HAI-1 em insulinomas G2. **A**, nota-se a presença de células do pâncreas exócrino (porção direita do campo) com marcação mais intensa para HAI-1 do que as células das ilhotas pancreáticas (porção esquerda do campo); aumento de 100x. **B**, detalhe das células tumorais das ilhotas exibindo padrão discreto de marcação; aumento de 400x.



Figura 22. Expressão citoplasmática discreta para HAI-1 em insulinomas G3. **A**, nota-se a presença de células do pâncreas exócrino (porção direita do campo) com marcação mais intensa para HAI-1 do que as células das ilhotas pancreáticas (porção esquerda do campo); aumento de 100x.



Figura 23. Ausência de expressão diferencial da protéina HAI-1 entre os subtipos tumorais de insulinomas.

5.3. Sequenciamento do gene MET

Mutações somáticas não foram encontradas nos éxons 2, 10, 14, 16, 17 e 19 do gene *MET* nas amostras estudadas de insulinomas. As cromatografias das fitas senso e antissenso de DNA estão representadas nas Figuras 24, 25, 26, 27, 28 e 29, respectivamente para cada éxon mencionado acima.

A

В

10 тся а^в ТСЯ А А GAT G A <u>A A</u> 6 <u>A A A</u> 6 6 A 6 A C A G C TR C A T А 6 6 ΛΛΛ Λλλλ ΔΛ

T T	A 1 A 1	r	G		c i C F	- -	<u>6 C</u>	G G	•19 C	A A	T G	1	T C	A	6 G	C C	A	"28 6 6	C C	c C	T	Ĝ	Ğ	Ğ	Ğ	C	c "30 C C	9 A 1	6 G	c C	T I	т <u>с</u>	c C	T	A 6 1 G	e 	A C A C	A A	A A	T	A	G	Ğ	50 A A
		<	\cap	\geq	\rightarrow	\sim	160	\sim		\geq	\leq	$\mathbf{\lambda}$	\times	\sim	\sim	\propto	\bigcirc	X	\sim	\sim	\sim	\land	\sim	<u></u>	Л	\sim	\sim	\sim	\sim	\sim	\sim	\wedge	\sim	Λ	χ	V	λ	~	\sim		\sim	\wedge	\wedge	γ
	c c	A	GC	Ć	Ŧ	G	A	A T	G A	ÂT	ć	Â	C	Å 1	۳ ۱		Ŧ	ł	Ŧ	Ŧ	Ĉ	G	Ĝ	Ñ		ĥ	Ŧ	+ i	G	Ċ	Â	<u>с</u> н л	A	A	6 G (<u>c</u> A	A	G	ĉ	C	A	Ĝ	ł	Ŧ
V	\mathcal{N}	\sim	\checkmark	\bigvee	\bigwedge	\square	\bigwedge	\mathcal{N}	$\langle \rangle$	\sum	V	V	\wedge		V	V	V	\bigvee	\mathbb{V}	\mathbb{N}	\wedge	Δ	\mathbb{N}	IV	V	V	\bigwedge	N	\backslash	\mathbb{N}	N	\mathbb{N}	Λ	N	V	V	\mathbb{N}	\bigwedge	\bigwedge	\bigwedge	\wedge	V	\mathbb{N}	Λ
C	T	6 (•110 C	Ĝ	A	A C	C	A	A T	Ĝ	-120 G	<u>R</u>	T	Ĉ	6 I	A T	Č	T	Ĝ	•130 C	C	A 1 A 1	Ģ	Ţ	Ĝ	T	Ĝ	C A	T	T	Ĉ	c c C C	Ŧ	A	T	C F	50 1 A	A	Ť	A	Ŧ	G T	C	A
\bigwedge	\bigwedge	\bigwedge	\mathbb{N}	Λ	N	V	\mathbb{N}	N	\mathbb{V}	\bigwedge	\wedge	\bigwedge	\mathbb{N}	\mathbb{Z}		\mathbb{N}	\bigwedge	\bigwedge	\wedge	Λ	\bigwedge	\mathcal{V}	$\mathbb{V}^{\mathbb{N}}$	\mathbb{N}	\wedge	\wedge	\mathbb{V}	\mathbb{N}	Λ	\bigwedge	\mathbb{N}	\mathbb{N}	\wedge	\wedge	\mathbb{N}	V	\backslash	\wedge	\wedge	\wedge	\mathbb{A}	\bigvee	\backslash	\wedge
160 A	C C	6 A	C C	T	Ŧ	Ī	Ŧ	*120 C	A A	c C	A	A G	-	Ŧ	C	=1,89 G	Ŧ	C C	A I	a c a c	A	A	A	A ∎1	an c	A	A A	T G	Ŧ	G G	A	6 "2 G	ľ	3 G 5 G	Ŧ	C	T	Ĉ	C F	G	21 C	A A	Å Å) A I A
\bigwedge	\bigwedge		\bigwedge	Λ	\mathbb{N}	\bigvee	\backslash	\bigwedge	\mathbb{A}	\wedge	\mathbb{N}	\mathcal{N}		\mathbb{N}	Λ	Δ	Λ	\wedge		\bigvee	M	\wedge	\bigwedge	\mathbb{N}	\mathbb{V}	Δ	\wedge	\mathbb{N}	\mathbb{N}	Δ	Λ	\mathbb{N}		2	Ą	Д	A	Δ	Λ		\backslash	Λ		Λ

D

TACOTCTTO TACGTCTTG TTOROROTCOTTORCATATT TTOROROTCOTTORCATATT TTOROROTCOTTORCATATT •39 -<u>6</u> G A T C G A T C C A T T G G T T C Ĝ Λ TCA AGCAAG 6 6 C C A G 6 ' <u>A A G T A T A T T A A A C A C</u> A A **G T A T A T T A A A A C A C** T C C G T C T T C G T G G A Λ / Λ

E

Ŧ TAA 6 C T A G C 0 0 0 0 C A 6 6 6 -120 G A T G A T T A A G A G G C



Figura 24. Cromatografias representativas do sequenciamento do éxon 2 do gene *MET*. **A**, fita senso 2a. **B**, fita antissenso 2a. **C**, fita senso 2b. **D**, fita antissenso 2b. **E**, fita senso 2c. **F**, fita antissenso 2c.

A



B





A



Figura 26. Cromatografias representativas do sequenciamento do éxon 14 do gene *MET*. **A**, fita senso. **B**, fita antissenso.

A





Figura 27. Cromatografias representativas do sequenciamento do éxon 16 do gene *MET*. **A**, fita senso. **B**, fita antissenso.

A



B



Figura 28. Cromatografias representativas do sequenciamento do éxon 17 do gene *MET*. **A**, fita senso. **B**, fita antissenso.



Figura 29. Cromatografias representativas do sequenciamento do éxon 19 do gene *MET*. **A**, fita senso. **B**, fita antissenso.

5.4. Correlação entre expressão gênica e dados histopatológicos

A correlação de Spearman foi realizada no programa *JMP 10 (SAS Institute)* para fazer a correlação entre os valores de expressão dos seis genes-alvo estudados (Tabela 3) e os dados bioquímicos e histopatológicos dos pacientes com insulinomas (Tabela 2).

A Tabela 5 demonstra todas as correlações significativas (p<0,05) entre as diversas variáveis.

Rho SPEARMAN VARIÁVEIS Р TIPO (**ρ**=) 0,4682 0,0210 Direta *MET* x Ki-67 MET x HGF 0,7827 < 0,0001 Direta MET x HAI-1 -0,4493 0,0187 Inversa MET x ST14 0,8272 < 0,0001 Direta HAI-1 x MITOSE (/10 HPF) -0,4721 0,0172 Inversa HAI-1 x HGF -0,3962 0,0408 Inversa -0,4915 0,0092 HAI-1 x ST14 Inversa 0,5311 0,0044 Direta $ST14 ext{ x HGF}$

Tabela 5. Correlação de Spearman entre os valores de expressão gênica e os dados clínicos dos pacientes cominsulinomas.

Legenda. HPF, high-power fields.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Este trabalho iniciou-se a partir de um estudo anterior realizado em nosso laboratório que identificou genes diferencialmente expressos entre insulinomas malignos e benignos utilizando-se de microarranjos de cDNA. Dentre os resultados, o gene *MET*, que codifica a tirosinocinase c-MET, foi identificado com expressão aumentada nos insulinomas malignos [64]. Posteriormente, ao analisar individualmente as amostras, confirmou-se tanto a expressão elevada do gene *MET*, como o aumento da expressão do mRNA do proto-oncogene *HGF* (codificante para o ligante de c-MET) nos insulinomas malignos [65].

Portanto, decidimos analisar a expressão do mRNA dos demais componentes da via de sinalização HGF/MET na tentativa de identificar potenciais marcadores moleculares que poderiam ser úteis na avaliação clínica dos pacientes, sendo eles: dois genes que codificam para proteínas ativadoras do HGF (*HGFA* e *ST14*), dois genes que codificam para proteínas inibidoras destes ativadores citados (*HAI-1* e *HAI-2*), além do próprio *HGF* e *MET*.

Na presente investigação, foi observado o aumento da expressão do mRNA do gene *MET* nos insulinomas malignos G3 e metástases quando comparados tanto ao subgrupo dos insulinomas benignos G1 quanto em relação ao subgrupo G2; dados confirmados por imuno-histoquímica quando agrupados G1/G2. Ainda, o índice proliferativo Ki-67 se correlaciona positivamente com a expressão de *MET*. O gene *HGF* também apresentou aumento de sua expressão nos insulinomas malignos G3 e metástases quando comparados aos tumores benignos G1. Logo, a ativação destes proto-oncogenes poderia contribuir para a progressão tumoral e malignidade nos insulinomas, já que esse aumento de expressão poderia potencializar as funções proliferativas nas ilhotas pancreáticas.

Diferentemente de nossos achados, um estudo de 1998 envolvendo apenas 10 casos de insulinomas reportou a ausência de expressão do gene *MET* [113]. A pequena casuística e a utilização de uma metodologia menos sensível, ao contrário do uso de sondas empregadas no presente estudo, podem ter contribuído para estes achados discrepantes.

O aumento da expressão do mRNA dos genes *HGF* e *MET* associado à malignidade dos insulinomas vão ao encontro de diversos achados em outros tipos tumorais humanos. Em cânceres gástricos, a expressão elevada de ambos os genes está relacionada com o desenvolvimento de metástases; neste tumor, o HGF mostra-se como um potente fator angiogênico linfático [114]. Na linhagem de carcinoma pulmonar H460, tanto HGF como c-MET apresentaram aumento da expressão protéica e sua co-hiperatividade elevou o potencial metastático das células [103]. O aumento da expressão de *MET* está associado com altos níveis do mRNA de *HGF* em células de adenocarcinoma ductal pancreático [77].

Mutações ativadoras no gene *MET* podem promover a hiperatividade desta via de sinalização [115]. Potencialmente, três principais mutações oncogênicas foram descritas para esse gene [67]: mutações pontuais que levam a um *splicing* alternativo, gerando uma proteína pequena com ausência de um sítio de degradação de ligação à PKC [116]; mutações pontuais no domínio tirosinocinase, mantendo a enzima constitutivamente ativa [117] e; mutações Y1003, que inativam o sítio de ligação à proteína Cbl, tornando a expressão protéica de *MET* ininterrupta [97].

Assim, decidimos investigar a presença de mutação nos éxons que codificam regiões estruturais importantes da proteína c-MET já previamente descritos com mutação em outros tipos de câncer, sendo eles: os éxons 2, 10, 14, 16, 17 e 19, para

tentar explicar esta hiperativação da via HGF/MET. Nenhuma mutação foi observada nos insulinomas estudados, independente do subgrupo tumoral.

O aumento dos níveis de mRNA do gene *MET* poderia ser consequência da amplificação gênica, como reportado em carcinoma pulmonar de células grandes (NSCLC) [118], adenocarcinoma ovariano [119] e em estágios avançados de câncer gástrico e suas metástases hepáticas [120, 121]. O ganho no número de cópias deste proto-oncogene, bem como de *HGF*, resultaria em maior síntese de transcritos, possibilitando um aumento na síntese protéica e consequente progressão tumoral. Inclusive, nestes tipos tumorais mencionados acima, c-MET é implicado como um marcador de prognóstico desfavorável.

Estudos epigenéticos também poderiam esclarecer processos de modulação nos genes envolvidos desta via, uma vez que eventos de metilação já foram encontrados em insulinomas e são comuns em diversos tipos de câncer humano [56]. A mudança nos padrões de metilação do DNA, como a desmetilação em regiões promotoras de protooncogenes, facilitaria a ligação de fatores de transcrição ao sítio, possibilitando um aumento na síntese de transcritos. Recentemente, um estudo na região promotora do gene *Met* identificou perda significativa na metilação do DNA de linhagem de células tumorais circulantes oriundas de um modelo de camundongo para carcinoma hepatocelular em relação ao aumento da expressão de c-Met e HGF, o que implica c-MET na promoção metastática deste tipo tumoral [122].

Futuramente, um estudo usando a técnica de MLPA (do inglês, *Multiplex ligation-dependent probe amplification*), que permite a detecção de amplificação gênica e regiões metiladas, poderia auxiliar na elucidação do aumento da expressão de *MET* observado.

Interessantemente, já foi demonstrado que *HGF* participa na resistência de um tipo de morte celular programada denominada *anoikis* (do grego, sem casa) em algumas linhagens de células tumorais cultivadas sob condições não-aderentes [123, 124], as quais incluem linhagens da série PCI, a partir de tecidos de adenocarcinomas pancreáticos primários humanos [125]. Este processo de apoptose é induzido pela ausência de interações célula-célula e célula-matriz extracelular, prevenindo, assim, que células destacadas de um tecido colonizem outros sítios [126]. Este mecanismo citado é justamente o que ocorre na transformação maligna do câncer, onde as células tumorais adquirem habilidade de migrar e invadir tecidos adjacentes e distantes. Portanto, nota-se que os efeitos antianóicos promovidos pelo HGF poderiam contribuir para a resistência apoptótica da célula, permitindo, assim, o processo de formação metastática.

Em relação às proteínas ativadoras do HGF objetos deste estudo, nenhuma amostra de insulinoma apresentou expressão do mRNA do gene que codifica o ativador do HGF (*HGFA*). Este é um dado interessante, já que esta molécula é tida como a mais potente catalisadora do pró-HGF [78]. Logo, parece que HGFA não é um requisito para a ativação do HGF em insulinomas.

Em contraste, o aumento da expressão do mRNA do gene *HGFA* já foi observado em cânceres pulmonares quando comparados aos tecidos normais [102]. O aumento das concentrações séricas de HGFA está relacionado a estágios avançados de câncer de próstata e diretamente correlacionado com as concentrações de HGF [127]. Por outro lado, em pacientes com mieloma múltiplo, HGFA não se correlaciona com HGF apesar do aumento de seus níveis protéicos [105].

Uma vez que a expressão de *HGFA* não foi detectada nos insulinomas, decidimos investigar a expressão do mRNA de matriptase, outra molécula ativadora do HGF. Na literatura, hepsina e uPA também estão relacionadas com a catalisação

proteolítica do HGF, mas devido aos achados serem mais consistentes em relação à matriptase neste papel de ativação, preferimos estudar apenas o gene codificante desta proteína, o *ST14*.

Observamos o aumento da expressão de *ST14* nos insulinomas malignos G3 e metástases quando comparados aos insulinomas benignos G1. Além disso, os níveis de mRNA do gene *ST14* se correlacionaram positivamente com a expressão dos genes *HGF* e *MET*. Houve também correlação inversa entre a expressão gênica de *ST14* e a de *HAI-1*. Estes resultados sugerem que nos insulinomas apenas a matriptase participe da ativação do HGF.

Um estudo *in vitro* mostra o envolvimento de matriptase na degradação da matriz extracelular em consequência do aumento da expressão do gene *ST14* e consequente ativação do HGF, resultando no aumento da invasão celular em cânceres colorretais [128]. O potencial oncogênico de matriptase é completamente eliminado por meio da ablação genética de c-Met em queratinócitos primários que expressam matriptase isolados de cultura celular derivada do camundongo K5-matriptase^{+/0} [129], o que demonstra sua participação efetiva na indução desta via de sinalização.

Diferentemente, em câncer de mama, a baixa expressão do *ST14* está relacionada a um prognóstico desfavorável, tumores grandes e estágios avançados, enquanto o aumento dos níveis do mRNA estão associados a tumores pequenos e estágios iniciais da doença [130]. Outro estudo envolvendo 17 linhagens de tumores primários de câncer de mama demonstrou o aumento da expressão do mRNA do gene *ST14* em 11 linhagens [131]. Esses achados sugerem que a *ST14*/matriptase esteja envolvida tanto na indução de mecanismos proliferativos como observados no presente estudo com insulinomas, quanto na regulação negativa, conforme observado em outros tipos de câncer.

Em relação aos genes que codificam as proteínas inibidoras do HGFA e matriptase, apenas *HAI-1* foi observada com diminuição da expressão do mRNA nos insulinomas malignos G3 e metástases quando comparados aos insulinomas em estágios iniciais (G1). Inclusive, seus dados de expressão gênica se correlacionam negativamente com os níveis de expressão dos genes *ST14* e *MET* e com o índice mitótico. Estes dados sugerem a importante regulação de HAI-1 na via HGF/MET em insulinomas, pois a baixa expressão desta molécula permitiria maior disponibilidade de matriptase em participar da ativação do HGF, promovendo a hiperativação de c-MET.

Os níveis diminuídos de expressão do mRNA de HAI-1 nos insulinomas malignos não foram corroborados pelos dados de imuno-histoquímica, dificultando sua utilização na rotina de avaliação do insulinomas.

Apesar de não ter sido observada diferença na expressão do mRNA do gene *HAI-2* entre os subgrupos tumorais no presente estudo, sua baixa expressão já foi descrita como um marcador prognóstico relacionado à malignidade em outros tipos celulares, como glioblastoma [106] e câncer cervical [132]. Inclusive, *HAI-2* é tido como um gene supressor de tumor em meduloblastomas, já que os investigadores demonstraram o papel desta proteína na redução da proliferação *in vitro* através da metilação do seu promotor [133].

Em linhagens celulares de câncer de ovário, a redução dos níveis de matriptase devido aos efeitos inibitórios de ambas as HAIs levam as células a processos apoptóticos pelo do aumento dos níveis protéicos de BAK e redução de BCL-2. Ademais, estas proteínas inibidoras estão associadas ao prognóstico maligno e baixa taxa de sobrevivência [134]. Em adenocarcinoma de próstata [135] e câncer de mama [102], há correlação entre baixa expressão de *HAI-1* e prognóstico desfavorável.

Parr C et al. suprimiram a atividade de HAI-1 e HAI-2 utilizando um sistema de expressão retroviral em uma linhagem de fibroblastos humanos e constataram o aumento da influência metastática do HGF em células de câncer de mama [136], o que evidencia o papel das HAIs no processo maligno, tornando-as possíveis alvos terapêuticos.

Outro fato interessante visto no presente estudo foi a imunorreação positiva visualizada nas células de origem exócrina presentes na massa tumoral dos insulinomas. Independente do subtipo do tumor, estas células encontram-se mais intensamente marcadas em relação às ilhotas pancreáticas. Atenta-se para o fato da expressão das proteínas c-MET e HAI-1 pelas células acinares e ductais pancreáticas na possível contribuição para o desenvolvimento da massa tumoral em insulinomas

Em suma, os dados do presente estudo sugerem a participação da via HGF/MET na malignidade dos insulinomas, uma vez que os níveis de transcritos e expressão protéica do gene *MET* aumentam nos tumores malignos em relação aos insulinomas em estágios benignos. Esta hiperativação de c-MET pode ser decorrente da baixa expressão de HAI-1 demonstrada, pois níveis elevados de matriptase promoveriam maior ativação de HGF.

Estudos funcionais adicionais podem auxiliar na elucidação dos papéis das moléculas da via HGF/MET no desenvolvimento maligno dos insulinomas. Por exemplo, investigar se a inibição dos genes *HGF* e/ou *MET* por meio da técnica de RNA de interferência (RNAi) em cultura celular de insulinoma maligno resultaria na diminuição da migração, proliferação, sobrevivência e invasão celular. A utilização de vetores para aumentar a expressão protéica destes genes também poderia auxiliar na compreensão do papel desses proto-oncogenes nos mecanismos associados à progressão e formação metastática. Estas abordagens poderiam ser muito úteis na elucidação do

papel de HAI-1, pois também seria possível analisar estas alterações em decorrência do aumento ou diminuição desta proteína inibidora.

Também seria de grande interesse analisar se as concentrações séricas das proteínas HGF e HAI-1 nos pacientes com insulinoma, já que estas moléculas estão presentes na corrente sanguínea e possibilitariam a quantificação protéica de forma rápida. Futuramente, o desenvolvimento de um kit comercial para uso na prática clínica seria de enorme auxílio no diagnóstico tumoral maligno.

Ainda, a identificação de padrões de expressão de miRNAs poderia trazer contribuição, já que o desequilíbrio deste mecanismo regulatório poderia contribuir para o desenvolvimento dos insulinomas. Um estudo publicado em 2010, identificou três miRNAs (miR-34b, miR-34c e miR-199^a) que regulam negativamente a expressão de *MET* em diversas linhagens tumorais, incluindo A549 (adenocarcinoma pulmonar), GLT16 (câncer gástrico) e MDA-MB-435 (melanoma). Na linhagem celular HT-29 (adenocarcinoma de cólon), estes mesmos miRNAs possuem papel na regulação de processos invasivos induzidos por *MET* [137].

A utilização de técnicas que visam o aumento da expressão de miRNAs envolvidos na regulação de oncogenes, como por exemplo *HGF* e *MET*, bem como a construção de moléculas bloqueadoras *antisense* que tenham como alvo miRNAs relacionados à regulação de genes supressores de tumor descritos com baixa ou nenhuma expressão, como é o caso de HAI-1 no presente estudo, poderiam se tornar potenciais terapêuticos.

Portanto, a descoberta de novas moléculas que participam do equilíbrio dos componentes da via HGF/MET é relevante, já que influenciam diretamente o balanço protéico, podendo, assim, facilitar os processos oncológicos.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- A via HGF/MET participa da tumorigênese dos insulinomas, uma vez que:
 - os insulinomas malignos G3 e metástases apresentam maior expressão do gene *MET* e do mRNA dos genes *HGF* e *ST14* concomitantemente com a menor expressão do mRNA do gene *HAI-1* em comparação aos insulinomas G1 e G2;
 - a expressão do mRNA do gene *MET* correlacionou-se positivamente com o índice proliferativo Ki-67 e o mRNA do gene *HAI-1* correlacionou-se negativamente com o índice mitótico.
- Mutações somáticas nos éxons 2, 10, 14, 16, 17 e 19 do gene *MET* parecem não contribuir para a tumorigênese dos insulinomas.

ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação CAPPesq

SOSPITAL BAS CLINICAS

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa -CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 22/06/2011, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 0381/11, intitulado: "ESTUDO DA EXPRESSÃO DO mRNA DO ATIVADOR DO HGF (HGFA) E DAS PROTEÍNAS INIBIDORAS DO HGFA (HAI-1 E HAI-2) EM INSULINOMAS" apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

APROVAÇÃO

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c"].

Pesquisador (a) Responsável: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella Pesquisador (a) Executante: Cahuê De Bernardis Murat

Professaria Dra, Barenice Bilharinho de Mendonça Coordenadora do Programa de Pós-Graduação Em Endocrinologia CAPPesq. 28 de Junho de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO Coordenador Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das, Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:			
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :	SEXO : M] F 🗆	
DATA NASCIMENTO:/	NIO		ARTO
BAIRRO:	CIDADE		AFTO
CEP: TELEFONE: DDD ()		
2.RESPONSÁVEL LEGAL NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)		
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :	SEXO: M 🗆	F 🗆	
DATA NASCIMENTO .:			
BAIRRO:	CIDADE:	AP	10:
CEP: TELEFONE: DDD ()		

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA ESTUDO DA EXPRESSÃO DO mRNA DO ATIVADOR DO HGF (HGFA) E DAS PROTEÍNAS INIBIDORAS DO HGFA (HAI-1 E HAI-2) EM INSULINOMAS

PESQUISADOR : Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella

CARGO/FUNÇÃO: Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 62.926 - CRM

UNIDADE DO HCFMUSP: .Clínica Medica - Endocrinologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO		RISCO MÉDIO	
RISCO BAIXO	Х	RISCO MAIOR	

RISCO BAIXO X

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 26 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): Este estudo visa analisar a expressão de alguns genes com possíveis envolvimentos na formação e progressão dos insulinomas.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros; Será utilizado o RNA mensageiro das amostras de tumores obtidos durante o ato cirúrgico. Kits comerciais serão utilizados para analisar a magnitude de expressão dos RNAs nos diferentes tumores.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: Todos os tumores serão obtidos durante o ato cirúrgico.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: As amostras de tecidos tumorais coletadas para dosagem de RNA mensageiro farão parte da peça cirúrgica já prevista, sem lesão que possa significar risco de qualquer natureza ao paciente, exceto os inerentes do próprio ato cirúrgico.

5 – Benefícios para o participante: Não há previsão de ressarcimentos financeiros e nem de benefícios imediatos para os sujeitos da pesquisa. No entanto, os resultados obtidos poderão ser úteis para um melhor entendimento das alterações fisiopatológicas que ocorrem no desenvolvimento ou progressão dos insulinomas, o que poderá ter implicações em prognósticos e terapêuticas futuras.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: No momento não há. A compreensão dos aspectos moleculares é o objetivo deste estudo.
7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o *Dr Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella*. que pode ser encontrado no endereço *Av. Dr. Arnaldo, 455 – 4 andar, sala 4344* Telefone(s) *3066-7253* Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5° andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores; 11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ESTUDO DA EXPRESSÃO DO mRNA DO ATIVADOR DO HGF (HGFA) E DAS PROTEÍNAS INIBIDORAS DO HGFA (HAI-1 E HAI-2) EM INSULINOMAS

Eu discuti com o Dr *Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella* sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Buchanan KD, Johnston CF, O'Hare MM, Ardill JE, Shaw C, Collins JS, Watson RG, Atkinson AB, Hadden DR, Kennedy TL *et al*: Neuroendocrine tumors. A European view. *The American journal of medicine* 1986, 81(6B):14-22.
- Eriksson B, Oberg K, Skogseid B: Neuroendocrine pancreatic tumors. Clinical findings in a prospective study of 84 patients. *Acta Oncol* 1989, 28(3):373-377.
- 3. Watson RG, Johnston CF, O'Hare MM, Anderson JR, Wilson BG, Collins JS, Sloan JM, Buchanan KD: The frequency of gastrointestinal endocrine tumours in a well-defined population--Northern Ireland 1970-1985. *The Quarterly journal of medicine* 1989, 72(267):647-657.
- 4. Lepage C, Bouvier AM, Phelip JM, Hatem C, Vernet C, Faivre J: Incidence and management of malignant digestive endocrine tumours in a well defined French population. *Gut* 2004, 53(4):549-553.
- 5. Halfdanarson TR, Rabe KG, Rubin J, Petersen GM: Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2008, 19(10):1727-1733.
- 6. Machado MC, da Cunha JE, Jukemura J, Bacchella T, Penteado S, Abdo EE, Machado MA, Herman P, Montagnini AL, Pinotti H: Insulinoma:

diagnostic strategies and surgical treatment. A 22-year experience. *Hepato-gastroenterology* 2001, 48(39):854-858.

- 7. Oberg K, Eriksson B: Endocrine tumours of the pancreas. *Best practice* & research Clinical gastroenterology 2005, 19(5):753-781.
- 8. Metz DC, Jensen RT: Gastrointestinal neuroendocrine tumors: pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology* 2008, 135(5):1469-1492.
- 9. Grimelius L, Hultquist GT, Stenkvist B: Cytological differentiation of asymptomatic pancreatic islet cell tumours in autopsy material. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histology* 1975, 365(4):275-288.
- 10. Kimura W, Kuroda A, Morioka Y: Clinical pathology of endocrine tumors of the pancreas. Analysis of autopsy cases. *Digestive diseases and sciences* 1991, 36(7):933-942.
- 11. Varas M, Gornals J, Ponseti JM, Alastrue A, Duran C, Llevaria C, Ballesta C, Diez-Caballero A, Artigas V: Pancreatic endocrine tumors or apudomas. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva* 2011, 103(4):184-190.
- 12. Rindi G, Bordi C: Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: aetiology, molecular pathogenesis and genetics. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 2005, 19(4):519-534.
- 13. Ehehalt F, Saeger HD, Schmidt CM, Grutzmann R: Neuroendocrine tumors of the pancreas. *The oncologist* 2009, 14(5):456-467.

- 14. Kloppel G: Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2007, 21(1):15-31.
- 15. Gullo L, Migliori M, Falconi M, Pederzoli P, Bettini R, Casadei R, Delle Fave G, Corleto VD, Ceccarelli C, Santini D *et al*: Nonfunctioning pancreatic endocrine tumors: a multicenter clinical study. *The American journal of gastroenterology* 2003, 98(11):2435-2439.
- 16. Falconi M, Plockinger U, Kwekkeboom DJ, Manfredi R, Korner M, Kvols L, Pape UF, Ricke J, Goretzki PE, Wildi S *et al*: Well-differentiated pancreatic nonfunctioning tumors/carcinoma. *Neuroendocrinology* 2006, 84(3):196-211.
- 17. Zikusoka MN, Kidd M, Eick G, Latich I, Modlin IM: The molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer* 2005, 104(11):2292-2309.
- Jensen RT, Berna MJ, Bingham DB, Norton JA: Inherited pancreatic endocrine tumor syndromes: advances in molecular pathogenesis, diagnosis, management, and controversies. *Cancer* 2008, 113(7 Suppl):1807-1843.
- 19. Akerstrom G, Hessman O, Hellman P, Skogseid B: Pancreatic tumours as part of the MEN-1 syndrome. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 2005, 19(5):819-830.
- 20. Dean PG, van Heerden JA, Farley DR, Thompson GB, Grant CS, Harmsen WS, Ilstrup DM: Are patients with multiple endocrine neoplasia type I

prone to premature death? *World journal of surgery* 2000, 24(11):1437-1441.

- 21. Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S: The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas* 2010, 39(6):707-712.
- 22. Portela-Gomes GM, Hacker GW, Weitgasser R: Neuroendocrine cell markers for pancreatic islets and tumors. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 2004, 12(3):183-192.
- 23. Falconi M, Bettini R, Boninsegna L, Crippa S, Butturini G, Pederzoli P: Surgical strategy in the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *JOP : Journal of the pancreas* 2006, 7(1):150-156.
- 24. Service FJ, McMahon MM, O'Brien PC, Ballard DJ: Functioning insulinoma--incidence, recurrence, and long-term survival of patients: a 60-year study. *Mayo Clin Proc* 1991, 66(7):711-719.
- 25. Halfdanarson TR, Rubin J, Farnell MB, Grant CS, Petersen GM: Pancreatic endocrine neoplasms: epidemiology and prognosis of pancreatic endocrine tumors. *Endocrine-related cancer* 2008, 15(2):409-427.
- 26. Vanderveen K, Grant C: Insulinoma. *Cancer treatment and research* 2010, 153:235-252.
- 27. de Herder WW: Insulinoma. *Neuroendocrinology* 2004, 80 Suppl 1:2022.

- 28. Grant CS: Insulinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005, 19(5):783-798.
- 29. Vaidakis D, Karoubalis J, Pappa T, Piaditis G, Zografos GN: Pancreatic insulinoma: current issues and trends. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* 2010, 9(3):234-241.
- 30. Alexakis N, Neoptolemos JP: Pancreatic neuroendocrine tumours. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 2008, 22(1):183-205.
- 31. Espana-Gomez MN, Velazquez-Fernandez D, Bezaury P, Sierra M, Pantoja JP, Herrera MF: Pancreatic insulinoma: a surgical experience. *World journal of surgery* 2009, 33(9):1966-1970.
- 32. Placzkowski KA, Vella A, Thompson GB, Grant CS, Reading CC, Charboneau JW, Andrews JC, Lloyd RV, Service FJ: Secular trends in the presentation and management of functioning insulinoma at the Mayo Clinic, 1987-2007. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2009, 94(4):1069-1073.
- 33. Whipple AO, Frantz VK: Adenoma of Islet Cells with Hyperinsulinism: A Review. Annals of surgery 1935, 101(6):1299-1335.
- 34. Service FJ: Diagnostic approach to adults with hypoglycemic disorders.
 Endocrinology and metabolism clinics of North America 1999, 28(3):519-532, vi.
- 35. Service FJ: Hypoglycemic disorders. *The New England journal of medicine* 1995, 332(17):1144-1152.

- 36. Fedorak IJ, Ko TC, Gordon D, Flisak M, Prinz RA: Localization of islet cell tumors of the pancreas: a review of current techniques. *Surgery* 1993, 113(3):242-249.
- 37. Iwanaka T, Matsumoto M, Yoshikawa Y, Koda N, Mochizuki H, Aihara T, Imaizumi S: Accurate localization of an insulinoma by preoperative selective intra-arterial calcium injection and intraoperative glucose monitoring. *Pediatric surgery international* 2000, 16(1-2):118-120.
- 38. Grover AC, Skarulis M, Alexander HR, Pingpank JF, Javor ED, Chang R, Shawker T, Gorden P, Cochran C, Libutti SK: A prospective evaluation of laparoscopic exploration with intraoperative ultrasound as a technique for localizing sporadic insulinomas. *Surgery* 2005, 138(6):1003-1008; discussion 1008.
- 39. de Herder WW, Niederle B, Scoazec JY, Pauwels S, Kloppel G, Falconi M, Kwekkeboom DJ, Oberg K, Eriksson B, Wiedenmann B *et al*: Welldifferentiated pancreatic tumor/carcinoma: insulinoma. *Neuroendocrinology* 2006, 84(3):183-188.
- 40. Finlayson E, Clark OH: Surgical treatment of insulinomas. *The Surgical clinics of North America* 2004, 84(3):775-785.
- 41. Kaczirek K, Ba-Ssalamah A, Schima W, Niederle B: The importance of preoperative localisation procedures in organic hyperinsulinism-experience in 67 patients. *Wiener klinische Wochenschrift* 2004, 116(11-12):373-378.
- 42. House MG, Schulick RD: Endocrine tumors of the pancreas. *Current opinion in oncology* 2006, 18(1):23-29.

- 43. Nikfarjam M, Warshaw AL, Axelrod L, Deshpande V, Thayer SP, Ferrone CR, Fernandez-del Castillo C: Improved contemporary surgical management of insulinomas: a 25-year experience at the Massachusetts General Hospital. *Annals of surgery* 2008, 247(1):165-172.
- 44. Hirshberg B, Cochran C, Skarulis MC, Libutti SK, Alexander HR, Wood BJ, Chang R, Kleiner DE, Gorden P: Malignant insulinoma: spectrum of unusual clinical features. *Cancer* 2005, 104(2):264-272.
- 45. Callender GG, Rich TA, Perrier ND: Multiple endocrine neoplasia syndromes. *The Surgical clinics of North America* 2008, 88(4):863-895, viii.
- 46. Danforth DN, Jr., Gorden P, Brennan MF: Metastatic insulin-secreting carcinoma of the pancreas: clinical course and the role of surgery. *Surgery* 1984, 96(6):1027-1037.
- 47. Piecha G, Chudek J, Wiecek A: Multiple Endocrine Neoplasia type 1. European journal of internal medicine 2008, 19(2):99-103.
- 48. Agarwal SK, Lee Burns A, Sukhodolets KE, Kennedy PA, Obungu VH, Hickman AB, Mullendore ME, Whitten I, Skarulis MC, Simonds WF *et al*: Molecular pathology of the MEN1 gene. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004, 1014:189-198.
- 49. Yang Y, Hua X: In search of tumor suppressing functions of menin. Molecular and cellular endocrinology 2007, 265-266:34-41.
- 50. Barghorn A, Speel EJ, Farspour B, Saremaslani P, Schmid S, Perren A, Roth J, Heitz PU, Komminoth P: Putative tumor suppressor loci at 6q22

and 6q23-q24 are involved in the malignant progression of sporadic endocrine pancreatic tumors. *The American journal of pathology* 2001, 158(6):1903-1911.

- 51. Pavelic K, Hrascan R, Kapitanovic S, Karapandza N, Vranes Z, Belicza M, Kruslin B, Cabrijan T: Multiple genetic alterations in malignant metastatic insulinomas. *The Journal of pathology* 1995, 177(4):395-400.
- 52. Wang DG, Johnston CF, Buchanan KD: Oncogene expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: implications for pathogenesis. *Cancer* 1997, 80(4):668-675.
- Bartsch DK, Kersting M, Wild A, Ramaswamy A, Gerdes B, Schuermann M, Simon B, Rothmund M: Low frequency of p16(INK4a) alterations in insulinomas. *Digestion* 2000, 62(2-3):171-177.
- 54. Speel EJ, Scheidweiler AF, Zhao J, Matter C, Saremaslani P, Roth J, Heitz PU, Komminoth P: Genetic evidence for early divergence of small functioning and nonfunctioning endocrine pancreatic tumors: gain of 9Q34 is an early event in insulinomas. *Cancer research* 2001, 61(13):5186-5192.
- 55. Wild A, Langer P, Ramaswamy A, Chaloupka B, Bartsch DK: A novel insulinoma tumor suppressor gene locus on chromosome 22q with potential prognostic implications. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2001, 86(12):5782-5787.

- 56. Chan AO, Kim SG, Bedeir A, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A: CpG island methylation in carcinoid and pancreatic endocrine tumors. *Oncogene* 2003, 22(6):924-934.
- 57. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A *et al*: MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006, 24(29):4677-4684.
- 58. Pavelic K, Hrascan R, Kapitanovic S, Vranes Z, Cabrijan T, Spaventi S, Korsic M, Krizanac S, Li YQ, Stambrook P *et al*: Molecular genetics of malignant insulinoma. *Anticancer research* 1996, 16(4A):1707-1717.
- 59. Perren A, Komminoth P, Saremaslani P, Matter C, Feurer S, Lees JA, Heitz PU, Eng C: Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *The American journal of pathology* 2000, 157(4):1097-1103.
- 60. Raffel A, Eisenberger CF, Cupisti K, Schott M, Baldus SE, Hoffmann I, Aydin F, Knoefel WT, Stoecklein NH: Increased EpCAM expression in malignant insulinoma: potential clinical implications. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2010, 162(2):391-398.
- 61. Baeuerle PA, Gires O: EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *British journal of cancer* 2007, 96(3):417-423.

- 62. Mei M, Deng D, Liu TH, Sang XT, Lu X, Xiang HD, Zhou J, Wu H, Yang Y, Chen J *et al*: Clinical implications of microsatellite instability and MLH1 gene inactivation in sporadic insulinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2009, 94(9):3448-3457.
- 63. Arnold CN, Sosnowski A, Schmitt-Graff A, Arnold R, Blum HE: Analysis of molecular pathways in sporadic neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2007, 120(10):2157-2164.
- 64. Sá S: Perfil de expressão gênica em carcinoma neuroendócrino produtor de insulina: avaliação da agressividade tumoral. Universidade de São Paulo; 2004.
- 65. Rosa P: Análise quantitativa da expressão do mRNA do fator de crescimento hepoatocítico (HGF) e de seu receptor c-MET em insulinomas.: Universidade de São Paulo; 2005.
- Benvenuti S, Comoglio PM: The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *Journal of cellular physiology* 2007, 213(2):316-325.
- 67. Sierra JR, Tsao MS: c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Therapeutic advances in medical oncology* 2011, 3(1 Suppl):S21-35.
- 68. Nakamura T, Mizuno S: The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences* 2010, 86(6):588-610.
- 69. Brand-Saberi B, Muller TS, Wilting J, Christ B, Birchmeier C: Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) induces emigration of myogenic cells at interlimb level in vivo. *Developmental biology* 1996, 179(1):303-308.
- 70. Vasyutina E, Stebler J, Brand-Saberi B, Schulz S, Raz E, Birchmeier C: CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells. *Genes & development* 2005, 19(18):2187-2198.
- 71. Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C: Met provides essential signals for liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101(29):10608-10613.
- 72. Ma PC, Tretiakova MS, MacKinnon AC, Ramnath N, Johnson C, Dietrich S, Seiwert T, Christensen JG, Jagadeeswaran R, Krausz T *et al*: Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes, chromosomes & cancer* 2008, 47(12):1025-1037.
- 73. Garcia-Ocana A, Takane KK, Reddy VT, Lopez-Talavera JC, Vasavada RC, Stewart AF: Adenovirus-mediated hepatocyte growth factor expression in mouse islets improves pancreatic islet transplant performance and reduces beta cell death. *The Journal of biological chemistry* 2003, 278(1):343-351.
- 74. Vasavada RC, Wang L, Fujinaka Y, Takane KK, Rosa TC, Mellado-Gil JM, Friedman PA, Garcia-Ocana A: Protein kinase C-zeta activation markedly enhances beta-cell proliferation: an essential role in growth

factor mediated beta-cell mitogenesis. *Diabetes* 2007, 56(11):2732-2743.

- 75. Mellado-Gil J, Rosa TC, Demirci C, Gonzalez-Pertusa JA, Velazquez-Garcia S, Ernst S, Valle S, Vasavada RC, Stewart AF, Alonso LC *et al*: Disruption of hepatocyte growth factor/c-Met signaling enhances pancreatic beta-cell death and accelerates the onset of diabetes. *Diabetes* 2011, 60(2):525-536.
- 76. Demirci C, Ernst S, Alvarez-Perez JC, Rosa T, Valle S, Shridhar V, Casinelli GP, Alonso LC, Vasavada RC, Garcia-Ocana A: Loss of HGF/c-Met signaling in pancreatic beta-cells leads to incomplete maternal beta-cell adaptation and gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 2012, 61(5):1143-1152.
- 77. Ebert M, Yokoyama M, Friess H, Buchler MW, Korc M: Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Cancer research* 1994, 54(22):5775-5778.
- 78. Kataoka H, Miyata S, Uchinokura S, Itoh H: Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. *Cancer metastasis reviews* 2003, 22(2-3):223-236.
- 79. Lee SL, Dickson RB, Lin CY: Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *The Journal of biological chemistry* 2000, 275(47):36720-36725.

- 80. Kirchhofer D, Peek M, Lipari MT, Billeci K, Fan B, Moran P: Hepsin activates pro-hepatocyte growth factor and is inhibited by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B) and HAI-2. *FEBS letters* 2005, 579(9):1945-1950.
- 81. Marlor CW, Delaria KA, Davis G, Muller DK, Greve JM, Tamburini PP: Identification and cloning of human placental bikunin, a novel serine protease inhibitor containing two Kunitz domains. *The Journal of biological chemistry* 1997, 272(18):12202-12208.
- 82. Akiyama Y, Nagai M, Komaki W, Marutsuka K, Asada Y, Kataoka H: Expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in endothelial cells. *Human cell : official journal of Human Cell Research Society* 2006, 19(3):91-97.
- 83. Gherardi E, Sandin S, Petoukhov MV, Finch J, Youles ME, Ofverstedt LG, Miguel RN, Blundell TL, Vande Woude GF, Skoglund U *et al*: Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103(11):4046-4051.
- 84. Lai AZ, Abella JV, Park M: Crosstalk in Met receptor oncogenesis. *Trends in cell biology* 2009, 19(10):542-551.
- 85. Silvagno F, Follenzi A, Arese M, Prat M, Giraudo E, Gaudino G, Camussi G, Comoglio PM, Bussolino F: In vivo activation of met tyrosine kinase by heterodimeric hepatocyte growth factor molecule promotes angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1995, 15(11):1857-1865.

- 86. Yi S, Tsao MS: Activation of hepatocyte growth factor-met autocrine loop enhances tumorigenicity in a human lung adenocarcinoma cell line. *Neoplasia* 2000, 2(3):226-234.
- 87. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM: MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010, 11(12):834-848.
- 88. Danilkovitch-Miagkova A, Zbar B: Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *The Journal of clinical investigation* 2002, 109(7):863-867.
- 89. Kang JY, Dolled-Filhart M, Ocal IT, Singh B, Lin CY, Dickson RB, Rimm DL, Camp RL: Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer. *Cancer research* 2003, 63(5):1101-1105.
- 90. Maemura M, Iino Y, Yokoe T, Horiguchi J, Takei H, Koibuchi Y, Horii Y, Takeyoshi I, Ohwada S, Morishita Y: Serum concentration of hepatocyte growth factor in patients with metastatic breast cancer. *Cancer letters* 1998, 126(2):215-220.
- 91. Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA, Hansen M, Schaefer E, Naoki K, Lader A *et al*: Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer research* 2005, 65(4):1479-1488.

- 92. Kim IJ, Park JH, Kang HC, Shin Y, Lim SB, Ku JL, Yang HK, Lee KU, Park JG: A novel germline mutation in the MET extracellular domain in a Korean patient with the diffuse type of familial gastric cancer. *Journal of medical genetics* 2003, 40(8):e97.
- 93. Tjin EP, Groen RW, Vogelzang I, Derksen PW, Klok MD, Meijer HP, van Eeden S, Pals ST, Spaargaren M: Functional analysis of HGF/MET signaling and aberrant HGF-activator expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2006, 107(2):760-768.
- 94. Lee JH, Han SU, Cho H, Jennings B, Gerrard B, Dean M, Schmidt L, Zbar B, Vande Woude GF: A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. *Oncogene* 2000, 19(43):4947-4953.
- 95. Fumagalli D, Gavin PG, Taniyama Y, Kim SI, Choi HJ, Paik S, Pogue-Geile KL: A rapid, sensitive, reproducible and cost-effective method for mutation profiling of colon cancer and metastatic lymph nodes. *BMC cancer* 2010, 10:101.
- 96. Neklason DW, Done MW, Sargent NR, Schwartz AG, Anton-Culver H, Griffin CA, Ahnen DJ, Schildkraut JM, Tomlinson GE, Strong LC *et al*: Activating mutation in MET oncogene in familial colorectal cancer. *BMC cancer* 2011, 11:424.
- 97. Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, Zhu W, Bhawe K, Mendoza N, Holcomb T, Pujara K, Stinson J, Fu L *et al*: Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer research* 2006, 66(1):283-289.

- 98. Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, Kinjerski T, Weirich G, Miller M, Lubensky I, Neumann HP, Brauch H, Decker J *et al*: Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* 1999, 18(14):2343-2350.
- 99. Zbar B, Lerman M: Inherited carcinomas of the kidney. *Advances in cancer research* 1998, 75:163-201.
- 100. Lorenzato A, Olivero M, Patane S, Rosso E, Oliaro A, Comoglio PM, Di Renzo MF: Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion. *Cancer research* 2002, 62(23):7025-7030.
- 101. Schmidt L, Junker K, Weirich G, Glenn G, Choyke P, Lubensky I, Zhuang Z, Jeffers M, Vande Woude G, Neumann H *et al*: Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene. *Cancer research* 1998, 58(8):1719-1722.
- 102. Parr C, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG: The hepatocyte growth factor regulatory factors in human breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004, 10(1 Pt 1):202-211.
- 103. Navab R, Liu J, Seiden-Long I, Shih W, Li M, Bandarchi B, Chen Y, Lau D, Zu YF, Cescon D *et al*: Co-overexpression of Met and hepatocyte growth factor promotes systemic metastasis in NCI-H460 non-small cell lung carcinoma cells. *Neoplasia* 2009, 11(12):1292-1300.

- 104. Nagakawa O, Yamagishi T, Akashi T, Nagaike K, Fuse H: Serum hepatocyte growth factor activator inhibitor type I (HAI-I) and type 2 (HAI-2) in prostate cancer. *The Prostate* 2006, 66(5):447-452.
- 105. Nagakawa O, Yamagishi T, Fujiuchi Y, Junicho A, Akashi T, Nagaike K, Fuse H: Serum hepatocyte growth factor activator (HGFA) in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *European urology* 2005, 48(4):686-690.
- 106. Hamasuna R, Kataoka H, Meng JY, Itoh H, Moriyama T, Wakisaka S, Koono M: Reduced expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type-2/placental bikunin (HAI-2/PB) in human glioblastomas: implication for anti-invasive role of HAI-2/PB in glioblastoma cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2001, 93(3):339-345.
- 107. Fukai K, Yokosuka O, Chiba T, Hirasawa Y, Tada M, Imazeki F, Kataoka H, Saisho H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor 2/placental bikunin (HAI-2/PB) gene is frequently hypermethylated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 2003, 63(24):8674-8679.
- 108. Betsunoh H, Mukai S, Akiyama Y, Fukushima T, Minamiguchi N, Hasui Y, Osada Y, Kataoka H: Clinical relevance of hepsin and hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2 expression in renal cell carcinoma. *Cancer science* 2007, 98(4):491-498.
- 109. Morris MR, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, Kishida T, Yao M, Teh BT, Latif F, Maher ER: Functional epigenomics approach to

identify methylated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *British journal of cancer* 2008, 98(2):496-501.

- 110. Parr C, Sanders AJ, Jiang WG: Hepatocyte growth factor activation inhibitors - therapeutic potential in cancer. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 2010, 10(1):47-57.
- 111. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25(4):402-408.
- 112. Ruifrok AC, Johnston DA: Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001, 23(4):291-299.
- 113. Wulbrand U, Wied M, Zofel P, Goke B, Arnold R, Fehmann H: Growth factor receptor expression in human gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *European journal of clinical investigation* 1998, 28(12):1038-1049.
- 114. Zhang QH, Qian K, Li XJ, Pu J, Wu XT: [Experimental study of the hepatocyte growth factor contributing to lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in gastric cancer]. *Zhonghua wei chang wai ke za zhi = Chinese journal of gastrointestinal surgery* 2007, 10(3):212-216.
- 115. Clague MJ: Met receptor: a moving target. *Science signaling* 2011, 4(190):pe40.
- 116. Lutterbach B, Zeng Q, Davis LJ, Hatch H, Hang G, Kohl NE, Gibbs JB, Pan BS: Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. *Cancer research* 2007, 67(5):2081-2088.

- 117. Giordano S, Maffe A, Williams TA, Artigiani S, Gual P, Bardelli A, Basilico C, Michieli P, Comoglio PM: Different point mutations in the met oncogene elicit distinct biological properties. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2000, 14(2):399-406.
- 118. Go H, Jeon YK, Park HJ, Sung SW, Seo JW, Chung DH: High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2010, 5(3):305-313.
- 119. Yamamoto S, Tsuda H, Miyai K, Takano M, Tamai S, Matsubara O: Gene amplification and protein overexpression of MET are common events in ovarian clear-cell adenocarcinoma: their roles in tumor progression and prognostication of the patient. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2011, 24(8):1146-1155.
- 120. Zeng ZS, Weiser MR, Kuntz E, Chen CT, Khan SA, Forslund A, Nash GM, Gimbel M, Yamaguchi Y, Culliford ATt *et al*: c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer letters* 2008, 265(2):258-269.
- 121. Lee J, Seo JW, Jun HJ, Ki CS, Park SH, Park YS, Lim HY, Choi MG, Bae JM, Sohn TS *et al*: Impact of MET amplification on gastric cancer: possible roles as a novel prognostic marker and a potential therapeutic target. *Oncology reports* 2011, 25(6):1517-1524.

- 122. Ogunwobi OO, Puszyk W, Dong HJ, Liu C: Epigenetic Upregulation of HGF and c-Met Drives Metastasis in Hepatocellular Carcinoma. *PloS one* 2013, 8(5):e63765.
- 123. Zeng Q, McCauley LK, Wang CY: Hepatocyte growth factor inhibits anoikis by induction of activator protein 1-dependent cyclooxygenase2. Implication in head and neck squamous cell carcinoma progression. *The Journal of biological chemistry* 2002, 277(51):50137-50142.
- 124. Kanayama S, Yamada Y, Kawaguchi R, Tsuji Y, Haruta S, Kobayashi H: Hepatocyte growth factor induces anoikis resistance by up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in uterine endometrial cancer cells. *Oncology reports* 2008, 19(1):117-122.
- 125. Watanabe S, Kishimoto T, Yokosuka O: Hepatocyte growth factor inhibits anoikis of pancreatic carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Pancreas* 2011, 40(4):608-614.
- 126. Frisch SM, Francis H: Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology* 1994, 124(4):619-626.
- 127. Wader KF, Fagerli UM, Holt RU, Stordal B, Borset M, Sundan A, Waage A: Elevated serum concentrations of activated hepatocyte growth factor activator in patients with multiple myeloma. *European journal of haematology* 2008, 81(5):380-383.
- 128. Ding KF, Sun LF, Ge WT, Hu HG, Zhang SZ, Zheng S: Effect of SNC19/ST14 gene overexpression on invasion of colorectal cancer cells. *World journal of gastroenterology : WJG* 2005, 11(36):5651-5654.

- 129. Szabo R, Rasmussen AL, Moyer AB, Kosa P, Schafer JM, Molinolo AA, Gutkind JS, Bugge TH: c-Met-induced epithelial carcinogenesis is initiated by the serine protease matriptase. *Oncogene* 2011, 30(17):2003-2016.
- 130. Kauppinen JM, Kosma VM, Soini Y, Sironen R, Nissinen M, Nykopp TK, Karja V, Eskelinen M, Kataja V, Mannermaa A: ST14 gene variant and decreased matriptase protein expression predict poor breast cancer survival. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2010, 19(9):2133-2142.
- 131. Welman A, Sproul D, Mullen P, Muir M, Kinnaird AR, Harrison DJ, Faratian D, Brunton VG, Frame MC: Diversity of matriptase expression level and function in breast cancer. *PloS one* 2012, 7(4):e34182.
- 132. Nakamura K, Abarzua F, Hongo A, Kodama J, Nasu Y, Kumon H, Hiramatsu Y: Hepatocyte growth factor activator inhibitor-2 (HAI-2) is a favorable prognosis marker and inhibits cell growth through the apoptotic pathway in cervical cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2009, 20(1):63-70.
- 133. Kongkham PN, Northcott PA, Ra YS, Nakahara Y, Mainprize TG, Croul SE, Smith CA, Taylor MD, Rutka JT: An epigenetic genome-wide screen identifies SPINT2 as a novel tumor suppressor gene in pediatric medulloblastoma. *Cancer research* 2008, 68(23):9945-9953.

- 134. Nakamura K, Abarzua F, Kodama J, Hongo A, Nasu Y, Kumon H, Hiramatsu Y: Expression of hepatocyte growth factor activator inhibitors (HAI-1 and HAI-2) in ovarian cancer. *International journal* of oncology 2009, 34(2):345-353.
- 135. Saleem M, Adhami VM, Zhong W, Longley BJ, Lin CY, Dickson RB, Reagan-Shaw S, Jarrard DF, Mukhtar H: A novel biomarker for staging human prostate adenocarcinoma: overexpression of matriptase with concomitant loss of its inhibitor, hepatocyte growth factor activator inhibitor-1. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2006, 15(2):217-227.
- 136. Parr C, Jiang WG: Hepatocyte growth factor activation inhibitors (HAI-1 and HAI-2) regulate HGF-induced invasion of human breast cancer cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2006, 119(5):1176-1183.
- 137. Migliore C, Petrelli A, Ghiso E, Corso S, Capparuccia L, Eramo A, Comoglio PM, Giordano S: MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth. *Cancer research* 2008, 68(24):10128-10136.