ANE CAROLINE THÉ BONIFÁCIO FREIRE

**Análise da expressão plasmática e tecidual das
metaloproteinases de matriz 2 e 9 e do inibidor tecidual de
metaloproteinase-2 em pacientes com adenomas hipofisários
e sua correlação com comportamento tumoral invasivo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Marcello Delano Bronstein

Versão corrigida

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Freire, Ane Caroline Thé Bonifácio

Análise da expressão plasmática e tecidual das metaloproteinases de matriz 2 e 9 e do inibidor tecidual de metaloproteinase-2 em pacientes com adenomas hipofisários e sua correlação com comportamento tumoral invasivo / Ane Caroline Thé Bonifácio Freire. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientador: Marcello Delano Bronstein.

Descritores: 1.Neoplasias hipofisárias 2.Metaloproteinases da matriz
3.Invasividade neoplásica 4.Metaloproteinase 2 da matriz 5.Metaloproteinase 9
da matriz 6.Inibidor tecidual de metaloproteinase-2

USP/FM/DBD-430/17

O estudo foi realizado na Unidade de Neuroendocrinologia do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), no Instituto de Psiquiatria (IPq) do HCFMUSP, no LIM-25 – Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), no LIM-14 – Laboratório de Investigação em Patologia Hepática da FMUSP e no Núcleo de Patologia Quantitativa do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. Contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio de Projeto Regular (2014/10462-4), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio de bolsa institucional (158472/2014-4).

Dedicatória

A Deus e à minha família, meus alicerces.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus, por guiar meus caminhos até aqui e tornar o sonho de cursar o Doutorado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo possível.

Aos meus pais, Dorian Carlos de Melo Freire e Ana Elisabeth Thé Bonifácio Freire, meus maiores incentivadores desde criança, que me deram todas as condições favoráveis para ter uma formação de excelência, tanto pessoal quanto profissional, sempre me apoiando incondicionalmente em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos, Jacqueline Thé Bonifácio Freire e Felipe Thé Bonifácio de Melo Freire, meus fiéis companheiros, pelo carinho, torcida e apoio sempre.

Ao meu marido, Alexandre Luiz Moraes do Rêgo Monteiro, por toda compreensão, amor e apoio durante todos esses anos, sem os quais a conclusão dessa grande etapa da minha vida não seria possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcello Delano Bronstein, inspiração na vida acadêmica e profissional, pela oportunidade de ser sua orientanda durante esses 4 anos e desfrutar dos seus sábios ensinamentos, tanto pessoais, quanto acadêmicos e profissionais, e por sempre acreditar na minha capacidade.

À minha co-orientadora, Dra. Ericka B. Trarbach, pesquisadora admirável, pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos, pela amizade, incentivo e ajuda imprescindível durante todos esses anos. Seu entusiasmo cativante pela pesquisa foi inspirador ao longo desse caminho.

A todos os colegas da Unidade de Neuroendocrinologia do HCFMUSP, Dra. Raquel Jallad, Dra. Andrea Glezer, Dr. Márcio Machado, Dra. Maria Candida Frago e Dr. Felipe Duarte, pelo incentivo e ajuda durante todo esse período.

Aos integrantes da Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria, Dra. Nina Musolino, Dr. Malebranche Cunha Neto, Dr. Valter Cescato, Dr. Gilberto Ochman e Dr. Fabio Eduardo da Silva, pela colaboração e parceria neste projeto.

Aos meus colegas de pós-graduação, Mariana Guzzo, Ludmilla Malveira, Cristina Bueno, Thais Sickler, Beatriz Sant'Anna, Paula Paes, Clarissa Grobério, Isabella Pacceti, Paulo Amorim e Rafael Loch, com quem pude dividir momentos de angústias e de alegrias nesses anos.

Aos integrantes do LIM-25, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular do HCFMUSP, em especial a Andrea Gomes da Silva, pelo auxílio na coleta das amostras dos pacientes. Aos parceiros do LIM-14, Laboratório de Investigação em

Patologia Hepática do HCFMUSP, em especial o Dr. Venâncio Alves, Dr. Fernando Frasseto e a Alda Wakamatsu.

Agradeço ainda a colaboração do Dr. Raphael Salles, médico assistente do departamento de Patologia do HCFMUSP.

Finalmente, agradeço aos pacientes que participaram dessa pesquisa, pela confiança e disponibilidade em contribuir para elaboração dessa tese.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee 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 Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Metaloproteinases de matriz extracelular e invasão tumoral.....	7
1.2 MMPs, seus inibidores e comportamento invasivo em adenomas hipofisários	11
2 - OBJETIVOS	16
2.1 Primário	18
2.2 Secundários.....	18
3 - MÉTODOS	19
3.1 Pacientes	20
3.2 Avaliação clínica e hormonal, exames de imagem e anatomopatológico	21
3.3 Estudo da expressão proteica tecidual por imuno-histoquímica.....	22
3.3.1 Confeção do TMA.....	22
3.3.2 Protocolo da reação imuno-histoquímica.....	23
3.3.3 Análise das lâminas.....	26
3.4 Estudo da expressão proteica no plasma.....	27
3.4.1 Coleta e armazenamento do plasma.....	27
3.4.2 Protocolo de imunodeteção	27
3.4.3 Análise do gel	30
3.5 Estudo da expressão tecidual do RNAm	31
3.5.1 Coleta e armazenamento do tumor	31
3.5.2 Extração de RNA e confecção do DNA complementar (cdNA)	31
3.5.3 qPCR em tempo real	32
3.6 Análise estatística	33

4 - RESULTADOS	34
4.1 Avaliação clínica	35
4.2 Avaliação molecular	36
4.2.1 Avaliação da concordância inter-observador pelo coeficiente kappa.....	36
4.2.2 Avaliação da expressão proteica tecidual das MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 nos adenomas hipofisários	36
4.2.3 Avaliação da expressão proteica plasmática das MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 nos adenomas hipofisários	41
4.2.4 Estudo da expressão do RNAm da MMP-2 e TIMP-2 tecidual por qPCR em tempo real	41
4.2.5 Expressão das MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 e sua relação com a invasividade tumoral nos subtipos de adenomas hipofisários	44
4.2.6 Avaliação do índice Ki-67	47
5 - DISCUSSÃO	48
6 - CONCLUSÕES	53
7- ANEXOS	55
8 - REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACI	Artéria Carótida Interna
ACNF	Adenomas Clinicamente Não-Funcionantes
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Acs	Anticorpos
AD	Agonista dopaminérgico
α -	Subunidade alfa
β -	Subunidade beta
BSA	Soro de Albumina Bovina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CDI	Critério diagnóstico de invasão
cDNA	DNA complementar
CK	Citoqueratina
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAB	Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imuno-enzimático
ER	Receptor de estrógeno
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GH	Hormônio do crescimento
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e Eosina
HPRT1	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
I	Invasivo
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-17	Interleucina-17

IL-17R	Receptor de interleucina-17
IPq	Instituto de Psiquiatria
kDA	Kilo-dalton
Ki-67	Marcador de proliferação celular Ki-67
LH	Hormônio Luteinizante
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MEC	Matriz extracelular
NI	Não-invasivo
MMP-1	Metaloproteinase de matriz 1
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP-3	Metaloproteinase de matriz 3
MMP-7	Metaloproteinase de matriz 7
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
MMP-13	Metaloproteinase de matriz 13
Neg	Negativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão de salina fostato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIT-1	<i>pituitary-specific POU-class homeodomain transcription factor</i>
Pos	Positivo
PHN	<i>Pool</i> de hipófises normais
PRL	Prolactina
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RNA	Ácido desoxi-ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RM	Ressonância magnética
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa
SF-1	<i>Steroidogenic fator 1</i>
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TIMP-1	Inibidor Tecidual de Metaloproteinases 1
TIMP-2	Inibidor Tecidual de Metaloproteinases 2
TIMP-3	Inibidor Tecidual de Metaloproteinases 3
TIMP-4	Inibidor Tecidual de Metaloproteinases 4

TMA	<i>Tissue microarray</i>
T-PIT	<i>T-box family member TBX19</i>
TSH	Hormônio Tireoestimulante
WB	<i>Western blotting</i>
ZM	Zimografia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação radiológica de Knosp.....	6
Figura 2 -	Fluxograma de coleta do material.....	21
Figura 3 -	Bloco receptor de TMA com as amostras de tecido parafinado.	23
Figura 4 -	Mapa da membrana- <i>array</i> de <i>immunoblotting</i> mostrando a plotagem dos marcadores em estudo.	28
Figura 5 -	Representação esquemática da detecção por <i>immunoblotting</i> utilizando o <i>Abcam® Human MMP antibody array-membrane</i>	29
Figura 6 -	Avaliação da densidade dos <i>spots</i> utilizando o programa <i>Image J</i> . (A) Imagem dos <i>spots</i> detectada por meio de câmera CCD; (B) picos correspondentes a intensidade dos pixels de cada <i>spot</i>	30
Figure 7 -	Imuno-histoquímica para detecção da MMP-2 exemplificando dois casos de tumores hipofisários com escore H mínimo e máximo	38
Figure 8 -	Imuno-histoquímica para detecção da MMP-9 exemplificado dois casos de tumores hipofisários com escore H mínimo e máximo	39
Figure 9 -	Imuno-histoquímica para detecção da TIMP-2 exemplificando dois casos de tumores hipofisários com escore H mínimo e máximo	40
Figura 10 -	Gráfico de dispersão mostrando a ausência de relação entre a expressão tumoral e plasmática da (a) MMP9 e (b) TIMP2	42
Figura 11 -	Box-plot da mediana do Ki-67 nos grupos de adenomas hipofisários com e sem invasão para o seio cavernoso.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação da OMS 2017 dos adenomas hipofisários	4
Tabela 2 -	Classificação anatômica dos adenomas hipofisários (Sistema Hardy modificado por Wilson)	5
Tabela 3 -	A família das metaloproteinases de matriz	8
Tabela 4 -	Resumo dos principais achados sobre as MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 nos adenomas hipofisários em relação a invasividade tumoral, em particular para o seio cavernoso	15
Tabela 5 -	Anticorpos, com suas respectivas titulações e controles positivos, utilizados nas reações imuno-histoquímicas	25
Tabela 6 -	Características clínicas e radiológicas dos grupos com e sem invasão para o seio cavernoso	35
Tabela 7 -	Expressão imuno-histoquímica das proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 de acordo com o escore percentual entre os grupos com e sem invasão para o seio cavernoso	37
Tabela 8 -	Expressão tecidual e plasmática das proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 de acordo com o escore H entre os grupos com e sem invasão para o seio cavernoso	37
Tabela 9 -	Expressão por quantificação relativa do RNAm das MMP-2 e TIMP-2 nos grupos com e sem invasão para o seio cavernoso	43
Tabela 10 -	Distribuição dos valores de coeficiente de correlação e o valor de P referente à expressão do RNAm e das expressões proteica e tecidual das MMP-2 e TIMP-2	43
Tabela 11 -	Características clínicas e radiológicas dos grupos com e sem invasão para o seio cavernoso divididos de acordo com o subtipo de tumor hipofisário	44

Tabela 12 - Expressão imuno-histoquímica das proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 pelo escore percentual entre os grupos invasivo e não-invasivo de acordo com o subtipo de adenoma hipofisário45

Tabela 13 - Avaliação da expressão tecidual (escore H e RNAm) e plasmática dos marcadores MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 nos grupos com e sem invasão para o seio cavernoso de acordo com o subtipo de adenoma hipofisário46

Resumo

Freire ACTB. *Análise da expressão plasmática e tecidual das metaloproteinases de matriz 2 e 9 e do inibidor tecidual de metaloproteinase-2 em pacientes com adenomas hipofisários e sua correlação com comportamento tumoral invasivo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Os tumores hipofisários mesmo sendo, em sua maioria, benignos, podem apresentar comportamento invasivo, com extensão para seio cavernoso, seio esfenoidal e clivo. As metaloproteinases de matriz tipo 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9) e o inibidor tecidual de metaloproteinases-2 (TIMP-2) têm sido estudados em relação ao comportamento invasivo desses tumores, em especial quanto à invasão do seio cavernoso. Esse estudo teve como objetivo avaliar a expressão proteica das MMP-2, MMP-9 e do TIMP-2 nos tumores hipofisários e sua relação com invasão do seio cavernoso e, de maneira inédita, investigar a expressão dessas proteínas em nível plasmático. Adicionalmente, foram avaliadas a expressão dos RNAs mensageiros (RNAm) das MMP-2 e TIMP-2 com intuito de correlacioná-las com a expressão proteica no tecido tumoral, bem como a expressão do marcador de proliferação Ki67. Foram selecionados 77 casos, todos com amostras de tumor embocado em parafina para análise imuno-histoquímica (IHQ). Destes, foram coletadas amostras de tumor fresco em 29 pacientes e de sangue periférico pré-operatório em outros 29 casos. A expressão proteica plasmática foi detectada de forma semi-quantitativa utilizando um arranjo de anticorpos em membrana comercial. A expressão dos RNAm das MMP-2 e TIMP-2 foi avaliada por reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR) em tempo real. Do total de casos, 20 pacientes apresentavam tumores com invasão para o seio cavernoso. A expressão proteica tumoral das MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 apresentou-se aumentada no grupo invasivo, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa em relação ao grupo não-invasivo. A expressão plasmática das MMP-9 e TIMP-2 também não mostrou diferença entre os dois grupos e não se correlacionou com a expressão tumoral. A expressão plasmática da MMP-2 não foi detectada em nenhum caso. Quanto à expressão do RNAm das MMP-2 e TIMP-2, também não houve diferença significativa entre os grupos e nem correlação com a expressão proteica tecidual ou plasmática. Foi observada uma diferença significativa na dimensão tumoral [3.6 (2.5-5.2) x 2.0 (1.3-2.7); $P < 0.001$] e no índice do Ki67 [1.05 (0.27-25) x 0.5 (0.2-1.0); $P < 0.001$] entre os grupos invasivo e não-invasivo respectivamente. Em conclusão, em nossa coorte, não foi encontrada relação entre a expressão tecidual e plasmática das MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 e a invasão para o seio cavernoso nos adenomas hipofisários.

Descritores: neoplasias hipofisárias; metaloproteinases da matriz; invasividade neoplásica; metaloproteinase 2 da matriz; metaloproteinase 9 da matriz; inibidor tecidual de metaloproteinase-2.

Abstract

Freire ACTB. *Analysis of plasma and tissue expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and the tissue inhibitor of metalloproteinase type 2 in patients with pituitary adenomas and their correlation with invasive tumor behavior* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Pituitary tumors, although mostly benign, may present invasive behavior, with extension to the cavernous sinus, sphenoid sinus and clivus. Type 2 (MMP-2) and type 9 (MMP-9) matrix metalloproteinases and the metalloproteinase tissue inhibitor type 2 (TIMP-2) have been studied in relation to the invasive behavior of these tumors, especially regarding invasion of the cavernous sinus. The aim of this study was to evaluate the protein expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 in pituitary tumors and its relation with invasion of the cavernous sinus and, in an unprecedented way, to investigate the expression of these proteins at the plasma level. Additionally, expression of MMP-2 and TIMP-2 messenger RNAs (mRNAs) was evaluated in order to correlate with protein expression in tumor tissue, as well as Ki67 proliferation marker expression. A total of 77 cases were selected, all of them with paraffin embedded tumor samples for immunohistochemical analysis (IHC). Of these, fresh tumor samples were collected in 29 patients and preoperative peripheral blood in another 29 cases. Protein plasma expression was detected semi-quantitatively using a commercial membrane antibody array. Expression of MMP-2 and TIMP-2 mRNAs was evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Of the total cases, 20 patients presented tumors invasive to the cavernous sinus. Tumor protein expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 was increased in the invasive group, not reaching, however, statistically significant difference as compared with the non-invasive group. Plasma expression of MMP-9 and TIMP-2 also did not differ between the two groups and did not correlate with tumor expression. Plasma expression of MMP-2 was not detected in any case. Concerning MMP-2 and TIMP-2 mRNA expression, there was also no significant difference between groups and no correlation with tissue or plasma protein expression was observed. A significant difference was observed in tumor size [3.6 (2.5-5.2) x 2.0 (1.3-2.7); $P < 0.001$] and in the Ki67 index [1.05 (0.27-25) x 0.5 (0.2-1.0); $P < 0.001$] between the invasive and non-invasive groups respectively. In conclusion, in our cohort, no relationship was found between the tissue and plasma expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 and the invasion of the cavernous sinus in pituitary adenomas.

Descriptors: pituitary neoplasms; matrix metalloproteinases; neoplasm invasiveness; matrix metalloproteinase 2; matrix metalloproteinase 9; tissue inhibitor of metalloproteinase-2.

1- INTRODUÇÃO

Os tumores hipofisários são encontrados incidentalmente em cerca de 10% da população geral e compreendem aproximadamente 15% dos tumores do sistema nervoso central (1). Apesar de serem geralmente benignos, podem causar morbidade significativa devido a sua localização crítica, tamanho, extensão e produção hormonal hipofisária inadequada (2).

Entre os sintomas locais compressivos, podem ocorrer cefaleia, distúrbios neuro-oftalmológicos e/ou disfunção hormonal decorrente do comprometimento do aporte hormonal hipotalâmico (por compressão da haste hipofisária) ou da falência hipofisária secundária à compressão do tecido hipofisário normal (2).

Clinicamente, os adenomas hipofisários podem ser classificados em funcionantes e não-funcionantes, dependendo da sua atividade hormonal (3). Os adenomas funcionantes podem ser subdivididos em: secretores de prolactina/PRL (prolactinomas), secretores de hormônio do crescimento/GH (somatotropinomas), secretores de hormônio corticotrófico/ACTH (corticotropinomas), secretores de hormônio tireotrófico/TSH (tireotropinomas) e secretores de gonadotrofinas (gonadotropinomas). Já os adenomas clinicamente não-funcionantes (ACNF) não apresentam quadro clínico de hipersecreção hormonal, porém na imuno-histoquímica (IHQ) e na microscopia eletrônica, a maioria apresenta grânulos secretórios com conteúdo hormonal variado não acompanhada de secreção hormonal suficiente para causar síndromes clínicas (denominados adenomas silenciosos). Uma minoria dos ACNF não apresenta evidência de produção hormonal pela IHQ, o que os classifica como adenomas *null cell* (3).

Segundo a mais recente classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), publicada em 2017, os adenomas hipofisários devem ser classificados de acordo com a marcação por IHQ para os principais hormônios hipofisários (GH, PRL, ACTH, β -TSH, β -LH, β -FSH e subunidade- α dos hormônios glicoproteicos) e, quando necessário, deve-se utilizar os fatores de transcrição hipofisários para definir a linhagem celular de diferenciação: *pituitary-specific POU-class homeodomain transcription factor* (PIT-1) para somatotrofos, lactotrofos e tireotrofos; *steroidogenic fator 1* (SF-1) para gonadotrofos; e o *T-box family member TBX19* (T-PIT) para corticotrofos. Desta forma, as designações dos adenomas baseadas nas linhagens de diferenciação celular são: adenomas somatotrópicos, adenomas lactotrópicos, adenomas gonadotrópicos e adenomas *null cell* (adenomas cuja linhagem celular ainda não foi determinada) (Tabela 1) (4).

Outros marcadores imuno-histoquímicos também são utilizados para sub-classificar os adenomas, como a citoqueratina (CK) para identificar os corpos fibrosos nos adenomas esparsamente granulados e nos adenomas acidofílicos *stem cell*, além de evidenciar a diferenciação celular corticotrófica. O receptor de estrógeno (ER α), expresso em células lactotróficas e gonadotróficas, pode ser útil na diferenciação dos adenomas mamossomatotrópicos (Tabela 1) (4).

Os carcinomas hipofisários são extremamente raros, constituem menos de 0,5% dos tumores hipofisários (5), e seu diagnóstico se baseia na evidência de metástases cérebro-espinhais e/ou sistêmicas (4).

Tabela 1 - Classificação da OMS 2017 dos adenomas hipofisários

Tipo de adenoma	Variantes morfológicas	Hormônios hipofisários e outros imuno-marcadores	Fatores de transcrição e cofatores
Adenoma somatotrópico	Adenoma densamente granulado	GH $\pm$ PRL $\pm$ subunidade- α	PIT-1
	Adenoma esparsamente granulado	GH $\pm$ PRL, (CK)	PIT-1
	Adenoma mamossomatotrópico	GH $\pm$ PRL (nas mesmas células) $\pm$ subunidade- α	PIT-1, ER α
	Adenoma misto somatotrópico-lactotrópico	GH $\pm$ PRL (em diferentes células) $\pm$ subunidade- α	PIT-1, ER α
Adenomas lactotrópicos	Adenoma esparsamente granulado	PRL	PIT-1, ER α
	Adenoma densamente granulado	PRL	PIT-1, ER α
	Adenoma acidofílico <i>stem cell</i>	PRL, GH (focal e variável)	PIT-1, ER α
Adenoma tireotrópico		β -TSH, subunidade- α	PIT-1
Adenoma corticotrópico	Adenoma densamente granulado	ACTH, (CK)	T-PIT
	Adenoma esparsamente granulado	ACTH, (CK)	T-PIT
	Adenoma <i>Crooke's cell</i>	ACTH, (CK)	T-PIT
Adenoma gonadotrópico		β -FSH, β -LH, subunidade- α (várias combinações)	SF-1, GATA2, ER α
Adenoma <i>null cell</i>		Nenhum	Nenhum
Adenomas pluri-hormonais	Adenoma pluri-hormonal PIT-1 positivo (anteriormente chamado adenoma silencioso subtipo 3)	GH, PRL, β -TSH) $\pm$ subunidade- α	PIT-1
	Adenomas com combinações imuno-histoquímicas não usuais	Várias combinações: ACTH/GH, ACTH/PRL	N/A

GATA-2: membro da família GATA proteínas regulatórias transcricionais *zinc finger*; N/A: não se aplica.

FONTE: Adaptado de Lopes, 2017(4).

Quanto às dimensões, os adenomas hipofisários podem ser classificados em microadenomas (< 1 cm), macroadenomas (≥ 1 cm) e adenomas gigantes (> 4 cm) (6, 7). Podem ainda ser classificados quanto ao grau de invasão e extensão parasselar pela classificação de Hardy modificada (Tabela 2) (8).

Tabela 2 - Classificação anatômica dos adenomas hipofisários (Sistema Hardy modificado por Wilson)

Invasão/Disseminação	Extensão
Assoalho da sela intacto	Extensão suprasselar
I: Sela normal ou focalmente expandida; tumor < 10 mm	0: Nenhuma A: Expansão para cisterna suprasselar
II: Sela alargada; tumor ≥ 10 mm	B: Obliteração dos recessos anteriores do terceiro ventrículo
Extensão esfenoidal	C: Assoalho do terceiro ventrículo grosseiramente deslocado
III: Perfuração localizada do assoalho selar	
IV: Destruição difusa do assoalho selar	
Disseminação à distância	Extensão parasselar
V: Disseminação via líquor cérebro-espinhal ou hematogênica	D: Intracraniana (intra-dural) E: Dentro ou abaixo do seio cavernoso (extra- dural)

FONTE: Adaptado de GREENBERG (8).

Adicionalmente, uma classificação radiológica muito utilizada é a de Knosp *et al.* (9) que avalia planos coronais da ressonância magnética (RM) da sela túrcica em que as porções intra-cavernosa e supra-cavernosa das carótidas internas possam ser bem

visualizadas, classificando os tumores hipofisários em: Graus 0, 1, 2, 3 e 4 (Figura 1) (9).

Os graus 3 e 4 têm alta probabilidade de invasão para seio cavernoso.

FONTE: Adaptado de Knosp *et al.* (9)

Figura 1 - Classificação radiológica de Knosp. Grau 0: adenoma não ultrapassa a linha tangente medial da artéria carótida interna (ACI) supra e intra-cavernosa; Grau 1: a tangente medial é ultrapassada, mas a extensão não vai além da linha inter-carotídea que passa no centro das porções intra e supra-cavernosa da ACI; Grau 2: Tumor se estende além da linha inter-carotídea, mas não ultrapassa a tangente lateral da ACI supra e intra-cavernosa; Grau 3: o tumor se estende lateralmente à tangente lateral da ACI supra e intra-cavernosa; Grau 4: Envolvimento circunferencial completo da ACI intra-cavernosa

Apesar da maioria dos tumores hipofisários não levar a metástases à distância, 5- 35% são invasivos, estendendo-se para tecidos locais, incluindo seio cavernoso, seio esfenoidal, órbita e clivo (10-12). As razões das diferenças no comportamento tumoral são pouco compreendidas e não existem, até o momento, mecanismos fisiopatológicos confiáveis para prever a invasividade tumoral. Vários biomarcadores têm sido investigados, incluindo alterações cromossômicas e microRNAs, marcadores de proliferação, oncogenes, genes supressores tumorais, fatores de crescimento e seus receptores e fatores relacionados a angiogênese e adesão celular. Entretanto, ainda não

foi encontrado um único marcador capaz de prever independentemente o comportamento agressivo nos tumores hipofisários (13).

O grau de invasão é o principal fator determinante da eficácia terapêutica e prognóstico nos tumores hipofisários, no que concerne à evolução pós-operatória do tumor residual, à taxa de remissão/recorrência e à sobrevida do paciente (9). O reconhecimento do comportamento tumoral invasivo possibilitaria alterar a estratégia da cirurgia, radioterapia e terapia medicamentosa pós-operatória, e prever a propensão à recorrência. Um marcador biológico poderia ainda contribuir para o desenvolvimento de um inibidor, com potencial bloqueio da progressão da invasão dos tumores hipofisários (14).

1.1 Metaloproteinases de matriz extracelular e invasão tumoral

A matriz extracelular (MEC) é composta por uma rede tridimensional de proteínas, glicosaminoglicanos e outras macromoléculas, que exerce um papel importante no suporte estrutural das células, assim como na adesão, migração, proliferação e sobrevivência celular. Ela pode ser degradada e reorganizada por enzimas específicas da família das metaloproteinases de matriz (MMPs), um grupo de endopeptidases dependentes de zinco, habitualmente associadas a invasão tumoral e metástases (15). Existem oito classes estruturais distintas de MMPs: cinco são secretadas e três são ligadas à membrana plasmática (Tabela 3) (16).

Tabela 3 - A família das metaloproteinases de matriz

Classe estrutural /Designação	Nomes comuns
Domínio simples de hemopexina	
MMP-1	Colagenase-1, colagenase intersticial, colagenase de fibroblasto, colagenase tecidual
MMP-3	Estromelisina-1, transina-1, proteoglicanase, proteína ativadora de procollagenase
MMP-10	Estromelisina-2, transina-2
MMP-8	Colagenase-2, colagenase de neutrófilo, colagenase de neutrófilo polimorfonuclear, colagenase de granulócito
MMP-12	Metaloelastase, elastase de macrófago, metaloelastase de macrófago
MMP-13	Colagenase-3
MMP-18	Colagenase-4 (<i>Xenopus</i> ; sem homólogo humano conhecido)
MMP-19	RASI-1, MMP-18
MMP-20	Enamelisina
MMP-22	<i>Chicken</i> MMP (sem homólogo correspondente humano conhecido)
MMP-27	
Sem designação	Mcol-A (camundongo)
Sem designação	Mcol-B (camundongo)
Ligadoras de gelatina	
MMP-2	Gelatinase A, 72-kDA colagenase tipo IV, gelatinase de neutrófilo
MMP-9	Gelatinase B, 92-kDA gelatinase, 92-kDA Colagenase tipo IV
Sem designação	75 kDA gelatinase (galinha)
Domínio mínimo	
MMP-7	Matrilisina, matrinsa, PUMP-1, pequena metaloproteinase uterina
MMP-26	Endometase, matrilisina-2
Transmembranas	
MMP-14	MT1-MMP, MT-MMP1
MMP-15	MT2-MMP, MT-MMP2
MMP-16	MT3-MMP, MT-MMP3
MMP-23	MMP sequência de cisteína; (CA-MMP), femalisina, MIFR, MMP-21, MMP-22
MMP-24	MT5-MMP, MT-MMP5
Ligadas a glicosilfosfatidilinositol	
MMP-17	MT4-MMP, MT-MMP4
MMP-25	MT6-MMP, MT-MMP6, leucilisina
Ativada e secretada pela furina	
MMP-11	Estromelisina-3
Inserção semelhante à vitronectina	
MMP-21	Homólogo do <i>Xenopus</i> MMP
Ativada e secretada pela furina	
MMP-28	Epilisina

MT: Metaloproteinase transmembrana. FONTE: Adaptado de EGEBLAD & WERB (16).

A maioria das MMPs não é expressa constitutivamente pelas células *in vivo*, mas tem sua expressão induzida por sinalização exógena, por exemplo, por citocinas, fatores de crescimento, ou alterações de contato célula-matriz e célula-célula. A atividade proteolítica das MMPs é regulada por ativação de zimógeno (pró-

metaloproteinase) e inibição por inibidores específicos, como os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), e por inibidores não-específicos, como por exemplo, o inibidor de proteinase α -1 e α -2 macroglobulina (17).

Atualmente, são conhecidos quatro membros da família de genes dos TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. O TIMP-1 inibe a atividade da maioria das MMPs, com exceção da MT1-MMP e MMP-2. O TIMP-2 também inibe a maioria das MMPs, com exceção da MMP-9 (17). O TIMP-3 inibe a atividade das MMPs-1, -2, -3, -9 e -13 (18), enquanto que o TIMP-4 humano inibe as MMPs-2, -9 e -7 (19).

O TIMP-2, inibidor das MMPs mais estudado nas neoplasias malignas humanas, atua como um inibidor endógeno da angiogênese e do crescimento tumoral de maneira dependente ou independente da inibição das MMPs. Foi demonstrado que a expressão da E-caderina, proteína transmembrana importante na adesão celular, é estimulada pela super-expressão da TIMP-2 *in vitro* e *in vivo*, contribuindo para a manutenção da adesão célula-a-célula (20).

Historicamente, a interação entre a célula tumoral e a membrana basal é definida como o evento crítico na invasão tumoral e nos sinais que iniciam a cascata metastática (21). A membrana basal, composta por uma densa malha de colágeno tipo IV, laminina, entactina e proteoglicanos heparan sulfato, normalmente não contém poros que permitiriam a migração passiva das células tumorais. Essa passagem das células tumorais pela barreira da membrana basal é o resultado da síntese proteica ativa e aquisição de um fenótipo invasivo. Este processo pode ser separado em três etapas: ligação, proteólise local e migração. A natureza da interação específica (por exemplo, células tumorais e tipo de matriz) pode resultar em ênfase em algumas etapas em

detrimento de outras em pontos específicos na cascata metastática. Acredita-se que seja mediante o ciclo repetido dessas três etapas que as células tumorais completam vários processos necessários para um comportamento metastático bem-sucedido (22).

As MMPs-2 e -9, colagenases do tipo IV, têm sido consideradas importantes na invasão tumoral por serem capazes de degradar a membrana basal, composta principalmente por esse tipo de colágeno. Além da expressão no tecido tumoral, níveis séricos elevados de MMP-9 têm sido demonstrados em diversos tipos em neoplasias malignas humanas(23-25).

Zucker *et al.* (23) verificaram que a concentração plasmática de MMP-9 por ensaio imuno-enzimático (ELISA) em 60 indivíduos saudáveis, 136 pacientes sem diagnóstico de câncer e 179 pacientes com câncer de pulmão, do trato genito-urinário ou leucemias-linfomas não diferiu significativamente. Por outro lado, a expressão revelou-se significativamente aumentada em 122 pacientes com câncer do trato gastrointestinal e de mama, sem, entretanto, diferir entre pacientes com câncer metastático e não-metastático.

Langenskiöld *et al.* (24) avaliaram a presença de várias MMPs no plasma e no tecido tumoral em 72 pacientes com câncer colorretal. A expressão plasmática da MMP-2, avaliada por ELISA, foi significativamente mais elevada em pacientes com metástase linfonodal quando comparado àqueles sem acometimento linfonodal.

Outros estudos avaliaram a atividade proteolítica sérica da MMP-9 por zimografia (ZM) e encontraram atividade significativamente aumentada em pacientes com câncer gástrico em comparação a controles sadios, correlacionando-se com o estágio tumoral (26, 27).

Vasaturo *et al.* (25), estudando a concentração plasmática das MMPs-2, -3 e -9, concluíram que a MMP-2 encontrava-se significativamente mais elevada em pacientes com carcinoma de mama quando comparados a pacientes com fibroadenoma. Uma correlação direta significativa foi encontrada entre as concentrações das MMP-s -2 e -9 e o grau histológico do tumor.

1.2 MMPs, seus inibidores e comportamento invasivo em adenomas hipofisários

Há cerca de 20 anos, as MMP-2 e MMP-9 vem sendo estudadas como possíveis marcadores de invasividade nos adenomas hipofisários, particularmente em relação a invasão para o seio cavernoso, uma vez que o colágeno tipo IV, substrato-alvo dessas enzimas, é um importante componente da dura-máter, que delimita a parede medial do seio cavernoso (28, 29).

O primeiro estudo que procurou avaliar a relação entre a atividade de collagenase tipo IV e o comportamento invasivo dos adenomas hipofisários foi publicado em 1996 por Kawamoto *et al.* (28). Nesse estudo, foram avaliados 7 adenomas hipofisários obtidos por cirurgia transesfenoidal (3 adenomas com invasão de seio cavernoso e 4 não-invasivos). Nos casos invasivos, a IHQ se revelou positiva para MMP-9 e a atividade de collagenase tipo IV foi significativamente mais elevada em comparação com os casos não-invasivos, sugerindo que as collagenases tipo IV, incluindo a MMP-9, poderiam estar envolvidas na invasão do seio cavernoso pelos adenomas hipofisários (28).

O mesmo grupo publicou posteriormente uma análise de 22 adenomas hipofisários (incluindo 12 não-funcionantes, cinco produtores de GH, quatro produtores de PRL e um produtor de GH e PRL) quanto à presença de MMP-9 e TIMP-1 utilizando o ensaio *immunoblot* celular. A incidência de células tumorais secretando MMP-9 foi significativamente maior nos adenomas invasivos *versus* não-invasivos, sugerindo que a secreção de MMP-9 poderia estar associada à invasão de seio cavernoso nesses tumores (30).

Beualieu *et al.* (31) avaliaram 28 tumores hipofisários e 12 amostras de hipófises normais quanto à expressão de MMP-1, -2, -3 e os inibidores TIMP-1, -2 e -3 por *Western blotting* (WB) a fim de tentar estabelecer uma correlação com o grau de invasão tumoral. As MMPs encontravam-se expressas na maioria dos tumores, todavia seu nível de expressão não se correlacionou com o grau do tumor ou à invasão tumoral. Foi encontrada correlação inversa entre os níveis de expressão dos TIMP-2 e -3 e o grau do tumor, sugerindo que esses marcadores poderiam ter algum valor de bom prognóstico nesses tumores.

Turner *et al.* (12) analisaram 55 adenomas, nove carcinomas hipofisários e quatro amostras de hipófises normais, quanto à presença da MMP-9, avaliada por IHQ, e sua relação com o comportamento tumoral. Os macroprolactinomas invasivos expressaram significativamente mais MMP-9 que os macroprolactinomas não-invasivos. Dentre os adenomas não-funcionantes, os que apresentaram recorrência tiveram maior expressão de MMP-9 quando comparados aos não recorrentes. Já os carcinomas hipofisários foram mais propensos a expressar a MMP-9 quando comparados a adeno-hipófise normal, mas não houve diferença quando comparados aos adenomas invasivos. Em quatro casos pareados (primeira apresentação e recorrência), verificou-se que ou a expressão da MMP-9 era

ausente no caso primário e presente na recorrência ou houve aumento da expressão no tumor recorrente quando comparado à sua apresentação primária (12).

Knappe *et al.* (32) estudaram 84 adenomas hipofisários removidos por cirurgia transesfenoidal e nove adeno-hipófises normais quanto a expressão, dentre outros marcadores, das MMPs-2 e -9 e o TIMP-2 por IHQ. O TIMP-2 encontrava-se super-expresso em adenomas não-invasivos quando comparado aos invasivos, contudo não houve correlação entre a expressão da MMP-9 e invasão tumoral.

Amostras de adenomas hipofisários de 54 pacientes submetidos a cirurgia foram estudados por Liu *et al.* (11, 33) quanto à expressão da MMP-2 e -9. Os escores dessas metaloproteinases foram significativamente mais elevados nos casos invasivos que naqueles sem invasão de seio cavernoso. Na análise do RNAm por qPCR, o percentual de RNAm da MMP-2/RNAm da β -actina e RNAm da MMP-9/RNAm da β -actina foram significativamente mais elevados nos adenomas hipofisários invasivos. Encontrou-se ainda correlação significativa entre o escore da IHQ e a expressão do RNAm para MMP-2 e -9.

Gong *et al.* (14) estudaram 73 pacientes submetidos a ressecção cirúrgica de adenomas hipofisários (60 tumores primários e 13 recorrentes ou persistentes). A expressão do RNAm da MMP-9 (n=68) foi significativamente maior nos adenomas invasivos. Houve ainda aumento significativo da atividade por ZM da MMP-9 na maioria dos adenomas invasivos, além de maior expressão por IHQ e WB. Já a atividade enzimática da MMP-2 encontrava-se relativamente baixa na maioria dos casos.

Qiu *et al.* (34), analisando 97 pacientes com tumores hipofisários submetidos a cirurgia transesfenoidal, encontraram uma correlação positiva entre os níveis de

expressão de interleucina-17 (IL-17) e seu receptor (IL-17R) e a expressão de MMP-9 nos adenomas invasivos, avaliados por IHQ e qPCR. Além disso, o nível sérico de IL-17 nos pacientes com adenomas invasivos foi significativamente mais elevado que no grupo não-invasivo, sugerindo que a IL-17 poderia promover invasão nos adenomas hipofisários, o que a tornaria um potencial marcador de comportamento agressivo associado à MMP-9 (34).

Mais recentemente, Gültekin *et al.* (35) avaliaram 57 prolactinomas quanto à expressão de MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 utilizando métodos imuno-histoquímicos. O percentual de expressão da MMP-9 foi significativamente maior nos prolactinomas invasivos, porém não houve correlação entre a intensidade da expressão da MMP-9 e o comportamento invasivo. Foram encontradas diferenças significativas na intensidade da expressão para MMP-9 entre os pacientes do grupo invasivo que receberam agonistas dopaminérgicos (AD) no pré-operatório e os que não receberam. Uma das hipóteses aventadas foi que a administração de AD teria alterado a expressão da MMP-9 de forte para moderada. Já a expressão de TIMP-2 no tumor se correlacionou significativamente com o comportamento invasivo e com a recorrência.

A tabela 4 resume os principais estudos aqui comentados.

Até o presente momento, portanto, os estudos que avaliaram a expressão das MMPs-2 e 9 nos adenomas hipofisários apresentaram alguns resultados conflitantes e não avaliaram os níveis plasmáticos dessas proteínas. Assim, de maneira inédita, esse estudo pretende avaliar a correlação entre a expressão tecidual e plasmática das MMP-2, MMP-9 e do TIMP- 2 com a invasão para o seio cavernoso, com o objetivo de contribuir na

identificação de um marcador facilmente acessível, mediante análise plasmática, capaz de prever a propensão do adenoma hipofisário ao comportamento invasivo.

Tabela 4 - Resumo dos principais achados sobre as MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 nos adenomas hipofisários em relação a invasividade tumoral, em particular para o seio cavernoso

Ref.	I: NI	CDI	Métodos	Marcadores	Relação com invasão
(28)	3:4	3	IHQ	MMP-9	Sim
(30)	9:13	3	<i>Immunoblotting</i>	MMP-9	Sim
(31)	12:16	1	WB/ZM	MMP-2	Sim, com a atividade enzimática
				TIMP-2	Sim, inversa com expressão proteica
(12)	11:8	1	IHQ	MMP-9	Sim, em macroprolactinomas e carcinomas hipofisários
(32)	50:34	3, 5	IHQ	MMP-2	Não
				MMP-9	Não
				TIMP-2	Sim, inversa
(33)	12:42	3, 5	IHQ/qPCR	MMP-2	Sim, proteína e RNA
				MMP-9	Sim, proteína e RNA
(14)	46:27	3, 4	IHQ/qPCR/ZM/WB	MMP-2	Não
				MMP-9	Sim, proteína, RNA e atividade enzimática
(34)	40:30	1, 2, 4, 5	IHQ/qPCR	MMP-9	Sim, proteína e RNA
(35)	35:22	1, 2, 3	IHQ	MMP-9	Sim
				TIMP-2	Sim

I: Invasivo; NI: não-invasivo; CDI: critério diagnóstico de invasão; 1: modificada de Hardy; 2: Knosp; 3: dados cirúrgicos; 4: dados histopatológicos; 5: RM ou tomografia computadorizada. FONTE: Adaptado de Liu *et al.*(36).

2 - OBJETIVOS

2.1 Primário

Avaliar a expressão proteica (tecidual e plasmática) das MMP-2, MMP-9 e do inibidor TIMP-2 e sua relação com o comportamento invasivo dos adenomas hipofisários.

2.2 Secundários

- Avaliar a expressão dos RNAm dos marcadores estudados e sua correlação com a expressão proteica no tecido tumoral;
- Avaliar as diferenças na expressão dessas proteínas e dos seus RNAm correspondentes com relação às características clínicas, subtipos de tumores e dimensões tumorais;
- Avaliar a expressão proteica do Ki-67 em relação ao comportamento invasivo dos adenomas hipofisários.

3 - MÉTODOS

3.1 Pacientes

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) - nº CAAE 22787414.0.0000.0068 (em apêndice).

Foram incluídos pacientes portadores de adenomas hipofisários, submetidos à cirurgia transesfenoidal/transcraniana para retirada do tumor, acompanhados no serviço de Endocrinologia do HCFMUSP e Instituto de Psiquiatria (IPq). Os pacientes com radioterapia prévia foram excluídos.

Foram selecionados 74 pacientes com adenomas hipofisários submetidos a ressecção cirúrgica no período de fevereiro de 2014 a setembro de 2015, sendo que destes, 3 foram submetidos a reabordagem cirúrgica, totalizando 77 casos. De todos os pacientes foi obtido o termo de consentimento livre e esclarecido (em apêndice).

Amostras de tumor emblocado em parafina dos 77 casos foram submetidas a análise imuno-histoquímica. Destes, foi possível coletar amostras de tumor fresco em 29 casos, dos quais foi obtida amostra de sangue periférico no pré-operatório para separação do plasma em 6 casos. O plasma foi obtido ainda de outros 23 casos dos quais não foi possível a coleta de amostra tumoral (Figura 2).

Figura 2 - Fluxograma de coleta do material

3.2 Avaliação clínica e hormonal, exames de imagem e anatomopatológico

Foram realizadas avaliação clínica completa de todos os indivíduos, pela anamnese, exame físico e revisão extensa dos prontuários médicos, assim como a avaliação hormonal e radiológica no pré-operatório.

As características clínicas avaliadas foram: sexo, idade ao diagnóstico, subtipo tumoral, dimensões do tumor e invasão de seio cavernoso. Os tumores hipofisários foram classificados em prolactinomas (secretores de PRL), somatotropinomas (secretores de GH), corticotropinomas (secretores de ACTH), tireotropinomas (secretores de TSH), gonadotropinomas (secretores de LH/FSH) e ACNF através da avaliação hormonal pré-operatória e imuno-histoquímica para os hormônios da adeno-hipófise nos tumores.

Foram ainda classificados em microadenomas (menores que 1 cm) e macroadenomas (com 1 cm ou mais), invasivos (evidência de invasão para seio cavernoso) ou não-invasivos de acordo com a RM. Os tumores com classificação de Knosp 3 e 4 pela ressonância magnética foram considerados invasivos para o seio cavernoso.

3.3 Estudo da expressão proteica tecidual por imuno-histoquímica

Das 77 amostras, foi possível selecionar cortes histológicos representativos de 53 tumores hipofisários corados pela hematoxilina e eosina (HE) para confecção de uma micromatriz tecidual (TMA). Para os outros 24 tumores, com material insuficiente para o TMA, foram realizados cortes convencionais para avaliação dos marcadores proteicos.

O bloco de TMA e suas respectivas lâminas foram confeccionados no serviço de Anatomia Patológica do A. C. Camargo. A padronização e execução das reações de imuno-histoquímica para os marcadores MMP-2, TIMP-2 e Ki67 foram realizadas no Núcleo de Patologia Quantitativa do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. Já as reações para o marcador MMP-9 foram padronizadas e executadas no Laboratório de Investigação de Patologia Hepática/LIM 14 do Departamento de Patologia, situado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.3.1 Confecção do TMA

As áreas de interesse representativas foram selecionadas nas lâminas de HE e marcadas nos respectivos blocos de parafina contendo a amostra tumoral. Cilindros de 1,0 mm de diâmetro dessas áreas foram transportados para um bloco de parafina receptor por meio de um sistema mecanizado de precisão, com um intervalo de 0,3 mm entre os cilindros. Cada cilindro foi alocado em uma posição no bloco receptor definida em um sistema cartesiano de coordenadas, com o conjunto das amostras constituindo um TMA com 20 linhas e 16 colunas, totalizando 320 posições (Figura 3). O bloco de

TMA foi então cortado em secções histológicas numeradas e consecutivas de 3 μm , onde cada tumor foi plotado em duplicata.

Figura 3 - Bloco receptor de TMA com as amostras de tecido parafinado. Foram plotadas 18 linhas e, para maior aproveitamento do bloco, foram utilizadas amostras tumorais oriundas de outros projetos envolvendo adenomas hipofisários

3.3.2 Protocolo da reação imuno-histoquímica

Inicialmente, foi realizada a desparafinização das lâminas em dois banhos de xilol (Panreac Quimica S.L.U, Barcelona, Espanha) por 20 minutos cada, um a 60°C e outro à temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) 100%/ 5 minutos e 70%/ 5 minutos e posteriormente lavadas em água corrente e água destilada.

Terminado esse processo, foi feita a recuperação antigênica. Uma solução de tampão citrato 10 mM pH 6.0 (ácido cítrico monoidratado, citrato de tri-sódio, Merck, Darmstadt, Alemanha) foi fervida na panela de pressão em inox (A La Carte, 4 ½ litros, Rochedo®) destampada. As lâminas foram mergulhadas na solução em ebulição, a panela foi fechada e, após a pressurização total, cronometrou-se um tempo de 3 minutos. Em seguida, a panela foi colocada com a tampa fechada sob água corrente até a despressurização total. As lâminas foram retiradas da panela e lavadas em água corrente e água destilada.

A etapa seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena com solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 6% (Quimesp, Guarulhos, SP), com 4 trocas de 5 minutos cada, lavando-se ao final com água corrente e água destilada.

As lâminas foram então incubadas com o anticorpo primário diluído no título previamente estabelecido (Tabela 5) em PBS (tampão salina fosfato) contendo albumina bovina (BSA) 1% (Inlab, São Paulo, S--P) e azida sódica 0,1% (Merck, Rio de Janeiro, RJ) *overnight* a 4°C em câmara úmida. Passado esse período, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada, incubadas com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer, Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido) por 30 min a 37°C e novamente lavadas com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada. Na sequência, foram incubadas com o NovoLink Polymer (NovoLink Max Polymer, Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido) do kit por 30 min a 37° C e lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Tabela 5 - Anticorpos, com suas respectivas titulações e controles positivos, utilizados nas reações imuno-histoquímicas

Anticorpo	Clone	Título	Fabricante	Controle positivo
MMP-2 (HPA001939)	Policlonal	1:50	Sigma Aldrich	Placenta
MMP-9 (NBP2-13173SS)	4A3	1:400	Novus	Placenta
TIMP-2 (WH0007077M1)	5D7	1:50	Sigma Aldrich	Cordoma
Ki67 (Anti-Human Antigen Ki67)	MIB-1	1:200	Dako	Amígdala

A revelação foi feita com solução substrato cromógeno: 100 mg de 3,3' Diaminobenzidina Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, St Louis, MO, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido/DMSO (J. T. Baker, Center Valley, PA, EUA); 1 mL de solução de peróxido de hidrogênio a 6% (Quimesp Química, Guarulhos, SP); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos e contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 30 segundos e novamente lavadas em água corrente e destilada.

Em seguida, foram imergidas 2 vezes em solução de hidróxido de amônio 0,5%, lavando em seguida em água corrente e destilada. As lâminas foram então desidratadas em etanol 95%/30 segundos, etanol 100%/30 segundos – 3 vezes e xilol/30 segundos – 4 vezes e montadas em Entellan neu (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Os controles de reação utilizados compreendem um controle positivo, onde é sabidamente expressa a proteína em estudo, e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imuno-histoquímicos.

3.3.3 Análise das lâminas

A expressão de cada proteína foi avaliada ao microscópio óptico (em aumento 400x) por dois patologistas experientes, de forma independente e sem acesso à identificação dos pacientes. Para as lâminas de TMA os campos histológicos foram avaliados integralmente. Para as lâminas com cortes convencionais foram observadas cerca de 100 células de 5 campos escolhidos ao acaso.

O percentual e a intensidade da expressão das proteínas de interesse foram determinados. A avaliação da expressão foi feita de forma semi-quantitativa utilizando um escore percentual categórico e um escore numérico. No escore categórico, o percentual de células imunorreativas para cada anticorpo foi classificado segundo Gültekin *et al.*(35) em: 1- expressão mínima (<30%), 2- focal (30-60%) e 3- difusa (>60%).

O escore numérico foi determinado utilizando o escore H. Este método gera um valor para cada paciente numa escala continua de 0-300, baseado no percentual de células marcadas em cada intensidade da marcação (0 - não marcado; 1 - fraca; 2 - moderada; 3- forte, em relação ao controle positivo). Assim, o escore H é igual a $[1 \times (\% \text{ células intensidade 1}) + 2 \times (\% \text{ células intensidade 2}) + 3 \times (\% \text{ células intensidade 3})]$ (37).

3.4 Estudo da expressão proteica no plasma

3.4.1 Coleta e armazenamento do plasma

No pré-operatório da cirurgia hipofisária, foram coletados 5 mL de sangue em tubos heparinizados. As amostras foram imediatamente submetidas a centrifugação para a separação do plasma que, posteriormente, foi separado em três sub-alíquotas de 100 microlitros por caso e armazenado a -80°C até a realização das análises bioquímicas.

3.4.2 Protocolo de imunodeteção

Foram coletados plasma de 29 pacientes no pré-operatório. A expressão das MMP-2 e -9 e do TIMP-2 foi padronizada por imunoensaio semi-quantitativo utilizando o kit da *Abcam® Human MMP antibody array-membrane* (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Cada membrana contém anticorpos direcionados a 10 subtipos de MMPs e seus inibidores em duplicata: MMP-1, -2, -3, -8, -9, -10, -13, TIMP -1, -2 e -4. Além dos marcadores em estudo, a membrana contém ainda controles positivos (IgG conjugada a biotina diretamente impressa na membrana). Já os controles negativos contém apenas o tampão impresso na membrana e são utilizados para medir o nível de ligação não específica das amostras (Figura 4).

O mecanismo de imunodeteção proteica utilizando a *Abcam® Human MMP antibody array-membrane* e seu protocolo está representado na Figura 5. Em resumo, cada membrana foi colocada, com o lado impresso voltado para cima, em cada um dos 8 poços da bandeja fornecida no kit e incubados com 2 mL do *Blocking buffer* por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, esse tampão foi aspirado e 1 mL de

cada amostra plasmática (diluído 1:1) foi pipetada em cada poço, seguido de incubação *overnight* a 4° C sob suave agitação.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Pos	Pos	Neg	Neg	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-8
2	Pos	Pos	Neg	Neg	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-8
3	MMP-9	MMP-10	MMP-13	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-4	Neg	Pos
4	MMP-9	MMP-10	MMP-13	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-4	Neg	Pos

Figura 4 - Mapa da membrana-array de *immunoblotting* mostrando a plotagem dos marcadores em estudo. Pos: controles positivos ; Neg: controles negativos

Após a incubação, as membranas foram submetidas a uma série de lavagens com os *Washing buffer I e II* conforme protocolo do fabricante. Após essas etapas de lavagens, 1 mL da solução contendo anti-citocina conjugada a biotina foi adicionado em cada poço e incubado por 1,5 hora à temperatura ambiente. Após aspirar o conteúdo de cada poço, as membranas foram novamente submetidas a uma série de lavagens com os *Washing buffer I e II* conforme protocolo do fabricante. Em seguida, foram pipetados 2 mL da solução contendo HRP-conjugado a estreptavidina e incubado por 2 horas à temperatura ambiente. Novamente, as membranas foram submetidas a etapas de lavagem com os *Washing buffer I e II*.

Posteriormente, as membranas foram transferidas para um lenço de papel a fim de remover o excesso de tampão e, em seguida, transferidas para uma folha plástica, com a face impressa da membrana voltada para cima. Em cada membrana foram então

pipetados 500 microlitros da mistura 1:1 dos *Detections buffer* C e D fornecidos pelo fabricante e incubados por 2 minutos à temperatura ambiente. A quimioluminescência foi detectada por meio de câmera CCD (*charge coupled device*) utilizando o *Alliance 4.7 imaging system* da *Uvitec®* (Clever Scientific Ltd, Cambridge, Reino Unido).

FONTE: Modificado do protocolo *Abcam® Human MMP antibody array-membrane*

Figura 5 - Representação esquemática da detecção por *immunoblotting* utilizando o *Abcam® Human MMP antibody array-membrane*: **1)** Incubação da amostra com a membrana contendo os anticorpos (Acs), **2)** Incubação com os anticorpos conjugados à biotina, **3)** Incubação com a estreptavidina marcada

3.4.3 Análise do gel

Para avaliação da intensidade dos *spots* gerados foi usado o aplicativo para processamento de imagens científicas *Image J* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) (Figura 6).

Figura 6 - Avaliação da densidade dos *spots* utilizando o programa *Image J*. (A) Imagem dos *spots* detectada por meio de câmera CCD; (B) picos correspondentes a intensidade dos pixels de cada *spot*

A intensidade do sinal para cada *spot* com anticorpo-antígeno conjugado específico é proporcional à concentração relativa do antígeno na amostra. A quantidade de IgG conjugada à biotina em cada controle positivo é consistente de *array* para *array*. Portanto, seguindo o protocolo do fabricante, a média da intensidade de sinal dos controles positivos foi utilizada para normalizar os sinais e comparar os resultados em

múltiplos *arrays*. Para normalizar a informação do *array*, uma das membranas foi definida como referência (escolha arbitrária). A intensidade de sinal normalizada para um *spot* x é dada pela fórmula:

$$X(Ny) = X(y) * P1/Py$$

Sendo:

X(Ny): Intensidade do sinal normalizada para o *spot* X no *array* y

P1: média da densidade de sinal dos controles positivos no *array* de referência.

Py: média da densidade de sinais dos controles positivos no *array* y

Xy: média da densidade do sinal do *spot* x no *array* da amostra y

3.5 Estudo da expressão tecidual do RNAm

3.5.1 Coleta e armazenamento do tumor

Foram coletadas 29 amostras dos tumores durante a cirurgia, que foram imediatamente congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido para posteriores análises.

3.5.2 Extração de RNA e confecção do DNA complementar (cDNA)

De cada fragmento hipofisário coletado e armazenado no nitrogênio, foram realizados diversos cortes em micrótomo criostato a -20°C. Cerca de quatro cortes foram fixados em lâminas e corados pelo método HE para análise microscópica da morfologia celular e comprovação da presença do adenoma. Os demais cortes (a quantidade exata depende do tamanho do tecido) foram fragmentados em

pulverizador e utilizados na extração do RNA total. Para tal, foi utilizado o estojo comercial DNA/RNA *All Prep Mini kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante. Amostras de RNA extraídas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (amostras com razão 260/280 de aproximadamente 2,0 foram consideradas de pureza satisfatória). Essas amostras foram denaturadas e submetidas à corrida eletroforética em gel agarose 1% a fim de verificar sua integridade pela visualização das bandas 18S e 28S ribossomais.

Cerca de 1 µg de RNA foi transformado em cDNA utilizando o kit *Quantitect Reverse Transcription* (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante.

3.5.3 qPCR em tempo real

O método de quantificação utilizado foi a quantificação relativa, empregando-se a média dos genes endógenos TBP (*TATA binding protein*; Hs00427620_m1) e HPRT1 (*Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*; Hs01003267_m1) e um *pool* comercial de hipófises normais, o *Pituitary Human Gland Poly A + RNA* (Contech Lab, Califórnia, EUA) como amostra referência. Para este cálculo foi utilizado o método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) descrito por Livak (38). As reações foram preparadas em duplicata, em um volume final de 20 µl, contendo 10 µl de *Taqman Gene Expression Master mix 2x* (Applied Biosystems Foster City, CA), 1,0 µl de cada *ensaio* (MMP2- Hs01548727_m1 e TIMP2- Hs00234278_m1; Applied Biosystems Foster City, CA), 2,0 µl de cDNA e 7,0 µl de água livre de RNase.

Como controle de qualidade das reações, o coeficiente de variação máximo permitido nas duplicatas foi de 2%, caso contrário os experimentos foram repetidos. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 min, seguida pela ativação da *Taq* Gold a 95 °C por 10 min e 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg intercalados com anelamento e extensão a 60°C por min. O equipamento utilizado foi o Step One Plus real time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.6 Análise estatística

Os dados qualitativos foram avaliados com teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, conforme apropriado, e expressos como número absoluto ou percentual. Os dados quantitativos foram avaliados empregando os testes *Anova* ou *Anova on ranks* (teste de Kruskal-Wallis) de acordo, respectivamente, com a distribuição paramétrica ou não paramétrica dos dados, e expressos por média e desvio-padrão ou mediana e intervalo de variação. Métodos de correlação de Spearman ou de Person foram utilizados para avaliação das relações entre as variáveis numéricas. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa STATA versão 14.0 (Stata Corp LLC, Texas, USA) empregando-se o nível de significância de 5% ($P < 0.05$).

4 - RESULTADOS

4.1 Avaliação clínica

Do total de 77 casos estudados, 20 tumores apresentavam invasão para seio cavernoso e os outros 57 eram não-invasivos. Os tumores invasivos apresentaram dimensão significativamente maior do que os não-invasivos (Tabela 6). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos invasivo e não-invasivo em relação ao sexo, à idade ao diagnóstico ou subtipo tumoral (Tabela 6).

No anexo A são apresentadas as características clínicas dos pacientes analisados, bem como dos resultados moleculares obtidos.

Tabela 6 - Características clínicas e radiológicas dos grupos com e sem invasão para o seio cavernoso

	Seio cavernoso		P
	Invasão	Não-invasão	
N	20	57	
Sexo (feminino: masculino)	11:9	27:30	0.743
Idade ao diagnóstico (anos)	40.9±14.0	44.0±15.5	0.515
Subtipo tumoral			
ACNF	13	26	0.309
Somatotropinomas	3	19	
Corticotropinomas	3	11	
Prolactinomas	1	1	
Maior diâmetro do tumor	3.6 (2.5-5.2)	2.0 (1.3-2.7)	<0.001

Dados descritos em números absolutos, média ±desvio padrão ou mediana (25% - 75%).

4.2 Avaliação molecular

4.2.1 Avaliação da concordância inter-observador pelo coeficiente kappa

Após a avaliação das lâminas pelos patologistas, 15 casos de marcação imuno-histoquímica das MMP-2, MMP-9 e TIMP-2, foram excluídos por perda de representatividade do material tumoral. Assim, para a MMP-2 foram avaliados 73 casos (20 invasivos x 53 não invasivos), 67 (18 invasivos x 49 não invasivos) para a MMP-9 e 76 (20 invasivos x 56 não invasivos) para a TIMP-2.

O índice kappa para avaliar a concordância entre os dois patologistas foi determinado de acordo com a classificação pelo escore percentual, sendo obtido um valor de 0.39 para a MMP-2 e 0.48 TIMP-2 (Anexo B). Como o nível de concordância foi baixo e na impossibilidade de uma nova avaliação ser feita por um terceiro patologista, optou-se pela análise realizada pelo patologista com mais experiência em hipófise.

4.2.2 Avaliação da expressão proteica tecidual das MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 nos adenomas hipofisários

As tabelas 7 e 8 mostram a avaliação da expressão proteica das MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 em relação ao escore percentual categórico e escore H, respectivamente, nos grupos com e sem invasão para o seio cavernoso. As medianas de expressão das MMP-2, MMP-9 e da TIMP-2 foram maiores no grupo invasivo em comparação ao grupo não-invasivo, porém sem significância estatística. Também não houve diferença estatisticamente significativa na análise do escore categórico. As figuras, 7, 8 e 9 ilustram a IHQ para MMP-2, MMP-9 e TIMP-2, respectivamente.

Tabela 7 - Expressão imuno-histoquímica das proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 de acordo com o escore percentual entre os grupos com e sem invasão para o seio cavernoso

Seio cavernoso				
Invasão (sim:não)				
	Mínimo (<30%)	Focal (30-60%)	Difuso >60%	P
MMP-2	5:23	6:19	9:11	0.103
MMP-9	6:16	3:11	9:22	0.867
TIMP-2	3:10	3:16	14:30	0.398

Dados descritos em números absolutos.

Tabela 8 - Expressão tecidual de acordo com o escore H e plasmática das proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 entre os grupos com e sem invasão para o seio cavernoso

Seio cavernoso			
	Invasivo	Não-invasivo	P
MMP-2 tumor	95.0 (20.6-180.0)	57.5 (19.4-110.0)	0.255
MMP-9 tumor	100.0 (10.0-255.0)	80.0 (13.7-155.0)	0.539
TIMP-2 tumor	195.0 (115.0-281.2)	160.0 (65.0-247.5)	0.164
MMP-2 plasma	<i>Não detectada</i>	<i>Não detectada</i>	-
MMP-9 plasma	561.2 (448.6-1254.8)	282.3 (146.5-648.7)	0.080
TIMP-2 plasma	3312.9 ± 903.1	2924.7 + 1307.4	0.453

Dados descritos em média ± desvio padrão ou mediana (25% - 75%).

Figure 7 - Imuno-histoquímica para detecção da MMP-2 exemplificando dois casos de tumores hipofisários com escore H mínimo e máximo, 0 e 300 respectivamente: **(a)** controle positivo; **(b)** caso 24, ACNF com 6.4 cm no maior diâmetro tumoral e sem invasão para o seio cavernoso e; **(c)** caso 16, somatotropinoma com 1.2 cm no maior diâmetro tumoral e sem invasão para o seio cavernoso

Figure 8 - Imuno-histoquímica para detecção da MMP-9 exemplificado dois casos de tumores hipofisários com escore H mínimo e máximo, 0 e 300 respectivamente: **(a)** controle positivo; **(b)** caso 4, ACNF medindo 2.5 cm no máximo diâmetro tumoral sem invasão para o seio cavernoso; **(c)** caso 33, somatotropinoma medindo 2.3 cm no máximo diâmetro tumoral com invasão para o seio cavernoso

Figure 9 - Imuno-histoquímica para detecção da TIMP-2 exemplificando dois casos de tumores hipofisários com escore H mínimo e máximo, 2.5 e 300 respectivamente. **(a)** controle positivo; **(b)** caso 43, corticotropinoma com 1.8 cm no maior diâmetro tumoral e sem invasão para o seio cavernoso e; **(c)** caso 46, ACNF medindo 2.5 cm no maior diâmetro tumoral e sem invasão para o seio cavernoso

4.2.3 Avaliação da expressão proteica plasmática das MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 nos adenomas hipofisários

Em relação à expressão proteica plasmática, não foi detectada expressão da MMP-2 em nenhum caso. A tabela 7 mostra os valores de expressão das MMP-9 e TIMP-2 no plasma dos pacientes. Não houve diferença significativa entre os grupos com e sem invasão para o seio cavernoso. Os valores de expressão para as MMP-9 e TIMP-2 não se correlacionaram com o escore H imuno-histoquímico dessas proteínas (MMP-9, $R=0.01$, $P=0.96$ Figura 10a; TIMP-2, $R= -0.54$, $P=0.26$; Figura 10b).

4.2.4 Estudo da expressão do RNAm da MMP-2 e TIMP-2 tecidual por qPCR em tempo real

Dos 29 casos em que foi possível avaliar a expressão do RNAm por qPCR em tempo real, 12 casos eram invasivos e 17 não-invasivos. Quanto à expressão do RNAm da MMP-2 e TIMP-2, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos invasivo e não-invasivo (Tabela 9).

Figura 10 - Gráfico de dispersão mostrando a ausência de relação entre a expressão tumoral e plasmática da (a) MMP9 e (b) TIMP2

Tabela 9 - Expressão por quantificação relativa do RNAm das MMP-2 e TIMP-2 nos grupos com e sem invasão para o seio cavernoso

	Seio cavernoso		P
	Invasão (n=12)	Não-invasão (n=17)	
<i>RNAm MMP-2</i>	<i>5.5 ± 2.1</i>	<i>4.7 ± 1.9</i>	<i>0.315</i>
<i>RNAm TIMP-2</i>	<i>4.3 ± 0.8</i>	<i>3.6 ± 1.2</i>	<i>0.102</i>

Dados descritos em média $\pm$ desvio padrão ou mediana (25% - 75%).

Não houve correlação entre a expressão do RNAm e a expressão proteica tecidual ou plasmática das MMP-2 e TIMP-2 (Tabela 10). O anexo C mostra os valores de quantificação relativa obtidos para cada amostra avaliada.

Tabela 10 - Distribuição dos valores de coeficiente de correlação e o valor de P referente à expressão do RNAm e das expressões proteica e tecidual das MMP-2 e TIMP-2

MMP-2 RNAm		TIMP-2 RNAm	
MMP-2 score H	0.29 (0.13)*	TIMP-2 score H	0.03 (0.95)
MMP-2 plasmático	-	TIMP-2 plasmático	0.08 (0.87)

*o valor de P é mostrado entre parênteses.

4.2.5 Expressão das MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 e sua relação com a invasividade tumoral nos subtipos de adenomas hipofisários

Nos ACNF, nos somatotropinomas e nos corticotropinomas, em relação às características tumorais, as dimensões foram significativamente maiores nos tumores com invasão para seio cavernoso (Tabela 11). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à idade ao diagnóstico ou prevalência de sexo entre os grupos invasivo e não-invasivo em nenhum desses subtipos tumorais (Tabela 11). Os prolactinomas não puderam ser avaliados individualmente devido a número reduzido de pacientes nesse grupo.

Tabela 11 - Características clínicas e radiológicas dos grupos com e sem invasão para o seio cavernoso divididos de acordo com o subtipo de tumor hipofisário

	Seio cavernoso		
	Invasão	Não-invasão	P
ACNF			
Sexo (feminino:masculino)	5:8	8:18	0.725
Idade ao diagnóstico (anos)	44.5 ±13.6	52.4±14.7	0.205
Maior diâmetro do tumor (cm)	3.6 (2.6-5.0)	2.5(2.2-3.7)	0.042
Somatotropinomas			
Sexo (feminino:masculino)	2:8	2:11	0.571
Idade ao diagnóstico (anos)	35.6 ±8.3	38.2±15.3	0.787
Maior diâmetro do tumor (cm)	4.1(2.3-6.0)	1.4(1.2-1.8)	0.023
Corticotropinomas			
Sexo (feminino:masculino)	3:10	0:1	1.000
Idade ao diagnóstico (anos)	47.0±15.6	35.7±7.6	0.153
Maior diâmetro do tumor (cm)	3.6±1.4	1.3±0.5	0.004

Dados expressos como número absoluto, média ± desvio padrão ou mediana (25% - 75%).

Considerando-se cada subtipo tumoral isoladamente, também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos invasivo e não-invasivo em relação às MMP-2, MMP-9 e TIMP-2, tanto em nível tecidual quanto plasmático (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 - Expressão imuno-histoquímica das proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 pelo escore percentual entre os grupos invasivo e não-invasivo de acordo com o subtipo de adenoma hipofisário

Seio cavernoso - invasão (sim: não)				
	Mínimo (<30%)	Focal (30-60%)	Difuso (>60%)	P
ACNF				
MMP-2	3:9	2:7	8:8	0.253
MMP-9	5:11	0:5	7:9	0.188
TIMP-2	0:0	2:8	11:17	0.441
Somatotropinomas				
MMP-2	0:9	1:6	2:3	0.122
MMP-9	1:4	1:2	1:9	0.619
TIMP-2	2:8	0:5	1:6	0.567
Corticotropinomas				
MMP-2	1:4	2:3	0:3	0.420
MMP-9	0:1	2:3	1:5	0.561
TIMP-2	0:1	1:2	2:8	0.764

Dados descritos em números absolutos.

Tabela 13 - Avaliação da expressão tecidual (escore H e RNAm) e plasmática dos marcadores MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 nos grupos com e sem invasão para o seio cavernoso de acordo com o subtipo de adenoma hipofisário

Seio cavernoso			
	Invasão	Não-invasão	P
ACNF			
MMP-2 tumor	140.0(27.50-187.5)	85.0(12.5-150.0)	0.300
MMP-9 tumor	80.0(12.5-162.5)	60.0(0.0-135.0)	0.657
TIMP-2 tumor	180.0(115.0-270.0)	195.0(162.5-277.5)	0.347
MMP-9 plasma	448.8(314.9-580.1)	274.2(106.2-528.8)	0.322
TIMP-2 plasma	3168.7± 634.3	2989.9±969.8	0.742
RNAm MMP2	5.5±2.4	4.5±1.4	0.298
RNAm TIMP2	3.8±1.1	4.4±0.8	0.241
Somatotropinomas			
MMP-2 tumor	130.0 (80.0-240.0)	47.5(14.4-100.0)	0.144
MMP-9 tumor	133.3±149.8	114.3±79.7	0.747
TIMP-2 tumor	5.0(5.0-255.0)	60.0(20.0-160.0)	0.363
MMP-9 plasma	-	-	-
TIMP-2 plasma	-	-	-
RNAm MMP2	4.7(4.6-4.8)	4.9(3.6-6.7)	0.643
RNAm TIMP2	4.2±0.5	3.9±0.5	0.574
Corticotropinomas			
MMP-2 tumor	52.5±51.6	69.5±53.4	0.636
MMP-9 tumor	141.6±118.9	157.7±100.7	0.822
TIMP-2 tumor	285.0(70.0-285.0)	240.0(165.0-270.0)	0.443
MMP-9 plasma	1183.3(1040.3-1326.3)	1628.3(201.5-2809.3)	0.857
TIMP-2 plasma	2433.3±58.0	2959.4±1754.8	0.702
RNAm MMP2	-	-	-
RNAm TIMP2	-	-	-

Dados expressos como média ±desvio padrão ou mediana (25% - 75%).

4.2.6 Avaliação do índice Ki-67

O Ki-67 foi descrito em termos percentuais, sendo observada uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0.001$) entre as medianas dos grupos com e sem invasão para o seio cavernoso [1.95 (0.1-10) x 0.5 (0.2-3.5)] (Figura 11).

Figura 11 - Box-plot da mediana do Ki-67 nos grupos de adenomas hipofisários com e sem invasão para o seio cavernoso

5 - DISCUSSÃO

O comportamento invasivo dos adenomas hipofisários, especialmente para o seio cavernoso, constitui um grande desafio para a abordagem terapêutica, pois dificulta a ressecção cirúrgica completa e está relacionado a uma maior chance de recidiva/progressão tumoral durante o seguimento clínico (7). Há duas décadas, as MMP-2 e MMP-9 vem sendo estudadas como possíveis marcadores de invasividade nos adenomas hipofisários, particularmente em relação à invasão para seio cavernoso.

O presente estudo visou relacionar a expressão tecidual das MMP-2, MMP-9 e do inibidor TIMP-2 com a invasividade nos adenomas hipofisários e, de maneira inédita, a sua relação com a expressão plasmática, como possível marcador pré-cirúrgico do comportamento tumoral. Foi observada uma maior mediana de expressão proteica pelo escore H da MMP-2 e MMP-9 nos adenomas hipofisários invasivos para seio cavernoso em relação aos não-invasivos, contudo essa diferença não atingiu significância estatística. Também não houve diferença significativa na avaliação da expressão dessas proteínas pelo escore categórico, nem mesmo quando avaliando isoladamente os subtipos tumorais. De maneira semelhante, Knappe *et al.* (32) também não encontraram diferença significativa na expressão da MMP-2 e MMP-9 por IHQ entre os grupos invasivo e não-invasivo. Beaulieu *et al.* (31), analisando a expressão da MMP-2 por *WB*, encontraram expressão na maioria dos tumores, porém sem correlação com as dimensões ou com o comportamento invasivo. Diferentemente, Liu *et al.* (11), utilizando um escore categórico, encontraram imuno-expressão de MMP-2 e MMP-9 significativamente maior no grupo de tumores hipofisários invasivos. Também outros estudos evidenciaram uma expressão significativamente maior dessas metaloproteinases, em especial a MMP-9, em tumores hipofisários invasivos (14, 28, 33). Por outro lado, alguns autores encontraram expressão da MMP-9 significativamente maior apenas em macroprolactinomas invasivos e carcinomas hipofisários (12, 35).

O TIMP-2 é um importante inibidor da MMP-2 (17). O possível papel protetor dessa proteína em relação ao comportamento invasivo nos adenomas hipofisários foi sugerido em alguns estudos que demonstraram uma expressão significativamente maior em tumores não-invasivos (31, 32). Gültekin *et al.* (35), ao contrário, encontraram uma expressão significativamente maior do TIMP-2 em tumores invasivos. Esse achado poderia ser justificado, segundo os autores, por um possível efeito duplo paradoxal da TIMP-2 que, quando formando um complexo com MMP-4 (MT1-MMP), induz mitose e migração celular, promovendo invasão através da ativação da cascata de sinalização mitogênica Ras-Raf-ERK (39, 40). Em nossa casuística, a expressão de TIMP-2, embora aumentada no grupo invasivo, também não alcançou significância estatística.

Em nosso estudo, a expressão do RNAm da MMP-2 e do TIMP-2 não apresentou diferença significativa entre os grupos invasivo e não-invasivo, e também não se correlacionou com a expressão proteica tecidual ou plasmática. Diversamente, Liu *et al.*(33) encontraram expressão do RNAm da MMP-2 significativamente mais elevado nos adenomas hipofisários invasivos, com correlação significativa com o escore da IHQ para essa metaloproteinase. Wang *et al.*(41), avaliando a expressão do RNAm do TIMP-2, encontraram uma expressão significativamente maior nos casos-não invasivos.

Recentemente, Liu *et al.* (36) fizeram uma metanálise compilando os estudos de expressão das MMP-9, MMP-2 e TIMP-2 em adenomas hipofisários. Nessa avaliação, foram incluídos 24 estudos, empregando-se análise proteica e/ou de RNAm, num total de 1.320 pacientes portadores de tumores hipofisários (611 tumores invasivos e 709 não-invasivos). A expressão da MMP-9 e da MMP-2 foi significativamente maior em pacientes com adenomas invasivos do que em não-invasivos tanto em nível proteico quanto no RNAm. Apenas cinco estudos continham informações quanto à expressão da

TIMP-2, para os quais não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão por IHQ deste marcador entre adenomas invasivos e não-invasivos. Contudo, apesar desta metanálise evidenciar a relação das MMP-2 e 9 com o comportamento invasivo dos tumores hipofisários, os autores recomendam que este dado seja interpretado com cautela, pois o número de estudos, incluindo alguns não corroborando esse resultado, foi pequeno, todos eram retrospectivos sem rigoroso controle de qualidade e altamente heterogêneos.

Vários estudos envolvendo outros tipos de tumores, mostraram correlação entre a expressão plasmática da MMP-2 e -9 e o estadió tumoral em câncer colorretal e em câncer de mama (25-27). Nosso estudo foi o primeiro a avaliar a expressão plasmática desses marcadores em adenomas hipofisários. Não houve expressão plasmática da MMP-2 em nenhum caso, bem como diferença significativa na expressão plasmática das MMP-9 e TIMP-2 entre os grupos invasivo e não-invasivo. Adicionalmente, não houve correlação entre a expressão plasmática da MMP-9 e da TIMP-2 com a sua expressão proteica tumoral. Embora o plasma seja facilmente acessível, sendo um fluido-alvo para muitas pesquisas envolvendo biomarcadores (42), deve ser ressaltado que o mesmo é abundante em macromoléculas e contém proteínas originárias de múltiplos órgãos e tecidos, podendo ser a sua composição alterada em resposta a diversas situações patológicas, como neoplasias, doença cardiovascular e síndrome metabólica (27, 43, 44).

No nosso estudo, o Ki-67, marcador de proliferação celular bem estudado nos adenomas hipofisários, foi significativamente mais expresso no grupo de tumores invasivos. Vários outros estudos (45-47) também demonstraram um índice Ki-67 maior em adenomas invasivos comparado aos não-invasivos. Thapar *et al.*(45),

utilizando um *cut-off* de 3%, conseguiram distinguir adenomas invasivos de não-invasivos com 97% de especificidade e 73% de sensibilidade. Esse valor foi adotado pela OMS em 2004 como um dos parâmetros proliferativos para designar os adenomas atípicos (48) e foi amplamente utilizado na literatura. No entanto, esse termo foi abandonado na última classificação dos tumores hipofisários em 2017 (4), já que nem todos os adenomas ditos atípicos necessariamente são invasivos (49) ou apresentam comportamento agressivo (50).

Uma das principais limitações do nosso estudo, também verificado em outros que avaliam grau de invasão em tumores hipofisários, é a dificuldade da caracterização de invasão para seio cavernoso pela RM (à exceção dos tumores Knosp 4), considerando que a confirmação histopatológica de invasão da dura-máter é raramente demonstrada (14, 51). Provavelmente, o seguimento a longo prazo dos pacientes com adenomas hipofisários poderá fornecer maior compreensão sobre o comportamento invasivo e evolução em termos de crescimento/progressão tumoral.

Desta forma, o nosso estudo corrobora os resultados discrepantes da literatura em relação à expressão das MMPs-2, MMP-9 e do TIMP-2 em tumores hipofisários, mais dados sendo necessários para estabelecer o real papel dessas proteínas na invasividade tumoral.

6 - CONCLUSÕES

-
- A expressão proteica das MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 nos adenomas hipofisários não foi relacionada à invasividade tumoral, sugerindo, em nossa casuística, que essas proteínas não representam biomarcadores relevantes no comportamento invasivo para seio cavernoso;
 - A expressão proteica tumoral não se correlacionou com a expressão proteica plasmática. Desta forma, não foram identificados marcadores tumorais circulantes que tenham utilidade no pré-operatório como indicadores do comportamento tumoral nos adenomas hipofisários;
 - Também não foi observada relação entre a expressão do RNAm das MMP-2 e TIMP-2 com invasividade tumoral, corroborando os resultados obtidos na análise IHQ;
 - O Ki-67 foi o único marcador relacionado ao comportamento invasivo dos tumores hipofisários.

7- ANEXOS

Anexo A

Dados clínicos, fenótipo tumoral, e marcadores MMP2, MMP9 e TIMP2 (tecidual e plasmático) e índice Ki67 dos adenomas hipofisários

ID	Idade*	Sexo	Tumor	Maior diâmetro (cm)	Macro/ Micro	Invasão (a)	Invasão (b)	Ki67 (%)	MMP2 (c)	MMP2 (d)	RNAm MMP2	TIMP2 (c)	TIMP2 (d)	TIMP2 plasma	RNAm TIMP2	MMP9 (c)	MMP9 (d)	MMP9 plasma
1	28	M	ACNF		Macro	Sim	Sim	0.2	285	3	7.7	110	2		3.0	0	1	
2	36	M	ACNF	5.5	Macro	Sim	Sim	0.5	195	3	5.2	300	3		4.7	60	1	
3	51	M	ACNF	3	Macro	Não	Não	0.2	10	1	4.7	80	2		1.7	30	1	
4	51	F	ACNF	2.5	Macro	Não	Não	0.3	20	1		130	3			0	1	
5	50	M	ACNF	2.5	Macro	Não	Não	0.2	100	2	3.7	270	3		4.0	30	2	
6	45	M	ACNF	4.7	Macro	Sim	Não	0.7	90	2	4.6	285	3		4.4	0	1	
7	49	M	GH	1.1	Macro	Não	Não	0.1	20	1		90	2			0	1	
8	51	F	GH	1.3	Macro	Não	Não	0.1	17.5	1	1.0	180	3		3.7	0	1	
9	17	F	GH	2	Macro	Não	Não	0.1	100	2	4.9	160	3		3.1			
10		F	GH	1.5	Macro	Não	Não	0.1	0	1		20	1			140	3	
11	33	M	ACNF	5.2	Macro	Sim	Não	0.1	10	1		285	3			0	1	
12		M	GH	1.9	Macro	Não	Não	0.5	100	2		15	1			15	1	
13		F	ACNF		Macro	Não	Não	0.1	150	3		110	2	1455.2		0	1	112.7
14	37	F	ACTH		Macro	Não	Não	0.1	30	1		180	3	768.4		300	3	174.8
15	43	M	ACNF	2.2	Macro	Não	Não	1.6			3.7	180	3	2636.9	5.4	0	1	488.9
16	30	M	GH	1.2	Macro	Não	Não	0.8	300	3		170	3	2762.8		110	2	144.4
17	31	M	ACNF	4.2	Macro	Não	Não	0.5	285	3	4.3	300	3	2100.7	2.8	100	2	86.7
18		F	GH	2.1	Macro	Não	Não	0.1	55	1		80	2	3272.4		40	1	304.3
19		M	GH	0.6	Micro	Não	Não	0.2	90	2		30	1	4213.2		120	2	643.8
20		F	ACNF	2.6	Macro	Não	Não	2	160	3		135	2	3770.8		0	1	2585.8
21	59	F	GH	1.3	Macro	Não	Não	0.7				50	2	4598.5		140	3	928.6
22		F	ACNF	2.4	Macro	Sim	Não	1.1	30	2		285	3	4734.8		0	1	206.1
23	58	F	ACTH	3.2	Macro	Sim	Sim	0.3	10	1		70	2	2474.4		120	2	1040.4
24		F	ACNF	6.4	Macro	Sim	Não	2.5	0	1		255	3	3341.0		255	3	648.7
25		F	ACTH	1.8	Macro	Não	Não	0.4				240	3	1278.3		80	2	1182.4
26	16	M	GH	1.7	Macro	Não	Não	0.1	90	2		190	3			140	3	
27	40	F	ACNF	2.5	Macro	Sim	Sim	10	5	1	3.8	195	3		3.9	80	3	
28	58	M	ACNF	2.5	Macro	Não	Não	0.2	140	3	2.8	110	2		3.8	170	3	

Anexo A (continuação)

ID	Idade*	Sexo	Tumor	Maior diâmetro (cm)	Macro/ Micro	Invasão (a)	Invasão (b)	Ki67 (%)	MMP2 (c)	MMP2 (d)	RNA MMP2	TIMP2 (c)	TIMP2 (d)	TIMP2 plasma	RNA TIMP2	MMP9 (c)	MMP9 (d)	MMP9 plasma
29		F	ACTH	5.2	Macro	Sim	Sim	0.1	37.5	2	6.1	285	3		3.1	270	3	
30	35	M	GH	1.6	Macro	Não	Não	1	240	3		210	3			270	3	
31	79	M	ACNF	4	Macro	Não	Não	1	180	2		170	3	1939.9		180	3	0.0
32	51	M	ACNF	5.2	Macro	Sim	Sim	0.3	180	2	6.2	285	3		4.0	170	3	
33	33	M	GH	2.3	Macro	Sim	Sim	1.7	130	3	4.8	5	1	4745.2	4.6	300	3	1388.4
34		M	ACNF	5.1	Macro	Sim	Não	0.5	150	3		160	3	3367.6		270	3	282.3
35	59	M	ACNF	2	Macro	Não	Não	1.2	5	1		35	2			80	3	
36	33	F	ACTH	2	Macro	Não	Não	3.5	30	1		70	2	5135.0		150	3	2989.0
37	36	M	ACNF	5.9	Macro	Sim	Sim	8	15	1		195	3			90	3	
38	32	F	ACNF	1.5	Macro	Não	Não	1.1	20	1		255	3			0	1	
39	47	M	GH	1	Macro	Não	Não	0.5	30	2	5.5	40	1		4.4	180	3	
40	60	M	ACNF	3.2	Macro	Sim	Não	0.8	20	1	5.4	100	2		4.0	15	1	
41	34	M	ACNF	2.9	Macro	Não	Não	3	90	2		120	2			80	3	
42		F	ACNF	3.2	Macro	Sim	Sim	8	10	1		165	2	4082.4				448.4
43	46	F	ACTH	1.8	Macro	Não	Não	0.2	25	1	4.0	2.5	1	3038.5	0.7	270	3	210.4
44		M	ACNF	4	Macro	Sim	Sim	3	40	2	8.3	160	3	2911.1	4.2	80	3	270.5
45	29	F	GH	6	Macro	Sim	Sim	2.5	240	3	4.7	255	3		3.8	90	2	
46	75	M	ACNF	2.5	Macro	Não	Não	0.5	300	3	7.8	300	3		4.6	90	3	
47	35	M	GH	1.2	Macro	Não	Não	0.5	300	3	10.2	30	1		4.3	130	3	
48	36	F	ACTH	2.5	Macro	Sim	Sim	0.1	110	2		285	3	2392.3		35	2	1326.3
49	63	M	ACNF	3.7	Macro	Não	Não	1	30	2	3.9	90	2		4.4	190	3	
50	70	F	ACNF	3.3	Macro	Sim	Sim	2	180	3	4.1	195	3	3054.2	4.0	180	3	623.8
51		M	ACNF	4.6	Macro	Sim	Sim	2.5	160	3	5.1	225	3		5.4	140	3	
52	29	F	ACTH			Não	Não	0.5	10	1		165	2			270	3	
53		M	ACNF	4.3	Macro	Sim	Sim	3	45	2	8.5	130	3		5.8	180	3	
54	64	M	GH	1.4	Macro	Não	Não	0.2	20	1	5.0	100	2		4.4			
55	44	F	ACTH	0.7	Micro	Não	Não	0.2	100	2		300	3			80	2	
56	24	M	ACTH	1.2	Macro	Não	Não	1	90	2		270	3			10	1	
57	39	M	ACNF	2.3	Macro	Sim	Sim	2	300	3		270	3			0	1	

Anexo A (conclusão)

ID	Idade*	Sexo	Tumor	Maior diâmetro (cm)	Macro/ Micro	Invasão (a)	Invasão (b)	Ki67 (%)	MMP2 (c)	MMP2 (d)	RNam MMP2	TIMP2 (c)	TIMP2 (d)	TIMP2 plasma	RNam TIMP2	MMP9 (c)	MMP9 (d)	MMP9 plasma
58	51	F	ACNF	3.7	Macro	Não	Não	1	80	2		240	3					
59	45	F	GH		Macro	Sim	Sim	1.5	80	2		5	1			10	1	
60	32	F	GH	0.9	Micro	Não	Não	0.5	5	1		20	1	602.5		240	3	146.5
61	66	M	ACNF	1.7	Macro	Sim	Não	0.1						3342.7		100	2	428.2
62		F	ACNF	2.5	Macro	Sim	Sim	0.8	140	3		270	3	2627.4		20	1	449.3
63	56	F	ACNF	3.3	Macro	Sim	Sim	1.9	70	3	1.0	300	3		5.0	10	1	
64	16	F	PRL	4.5	Macro	Sim	Sim	3.2	0	1		10	1	4216.5				498.6
65		F	GH	1.5	Macro	Não	Não	0.2	60	2		60	2			90	3	
66	31	F	PRL	2.8	Macro	Sim	Não	1	0	1		0	1					
67	37	M	GH	1.8	Macro	Sim	Não	0.1	40	1		120	2			100	2	
68		F	ACNF	2	Macro	Não	Não	0.2	100	2		270	3			270	3	
69	46	M	GH	1.2	Macro	Sim	Não	0	0	1		20	1					
70	73	M	ACNF	2.5	Macro	Não	Não	0.6	270	3		270	3	3210.0		100	2	266.1
71		F	ACTH			Não	Não	0.2	40	2		240	3	2839.8		140	3	2074.3
72	17	F	GH	2	Macro	Não	Não	0	0	1	4.5	10	1		3.8			
73	42	M	ACNF	2.2	Macro	Não	Não	2	10	1		160	3			0	1	
74		F	ACTH	0.8	Micro	Não	Não	2	180	2	3.8	270	3		2.4			
75	41	F	ACTH			Não	Não	0.3	120	2		210	3	4696.4		120	2	2749.5
76		M	ACNF	3	Macro	Não	Não	1.5	10	1		210	3			60	2	
77	32	F	ACTH	1.1	Macro	Não	Não	0.1	70	3		240	3					

* Idade ao diagnóstico em anos; (a) invasão seio cavernoso e esfenoidal; (b) invasão seio cavernoso; (c) escore H; (d) escore percentual.
F: feminino; M: masculino; GH: somatotropinomas, ACNF: adenoma clinicamente não-funcionante; ACHT: corticotropinomas; PRL: prolactinoma.
Obs.: Casos 1-53 foram plotados no TMA e 54-77 foram feitos cortes convencionais para as avaliações imuno-histoquímicas.

Anexo B

Cálculo do índice de concordância kappa para o escore percentual entre os dois patologistas participantes do estudo

TIMP-2		Patologista 2			n=76	
Patologista 1	1	2	3			
1	12	1	0	13	17%	
2	7	10	2	19	25%	
3	0	15	29	44	58%	
	19	26	31	51		
	25%	34%	41%			
	K1	0.7		KAPPA=	0.48	
	K2	0.4				
MMP-2		Patologista 2			n=73	
Patologista 1	1	2	3			
1	22	5	1	28	38%	
2	12	6	7	25	34%	
3	5	2	13	20	27%	
	39	13	21	43		
	51%	17%	27%			
	K1	0.6		KAPPA=	0.39	
	K2	0.3				

Anexo C

Valores da média dos Ct e do desvio padrão entre as duplicatas no experimento de qPCR para determinação da quantificação relativa (RQ) do RNAm das MMP-2 e TIMP-2

ID	HPRTI		TBP		MMP-2		TIMP-2	
	C _T <i>mean</i>	C _T DP	C _T <i>mean</i>	C _T DP	C _T <i>mean</i>	C _T DP	C _T <i>mean</i>	C _T DP
1	30.77	0.15	29.80	0.10	29.38	0.07	30.25	0.01
2	30.58	0.07	29.64	0.01	31.73	0.33	28.40	0.26
3	30.13	0.01	29.73	0.12	32.11	0.40	31.20	0.03
5	27.89	0.15	28.16	0.18	31.11	0.24	27.02	0.09
6	27.82	0.05	27.43	0.01	29.90	0.16	26.18	0.13
8	31.57	0.04	30.72	0.11	35.91	1.27	30.48	0.05
9	31.46	0.18	30.68	0.05	33.03	0.29	31.01	0.04
15	28.81	0.09	28.26	0.01	31.69	0.23	26.17	0.43
17	31.20	0.07	31.49	0.08	33.88	0.06	31.58	0.06
27	27.04	0.08	27.42	0.03	30.25	0.23	26.28	0.25
28	28.95	0.06	28.33	0.07	32.62	0.16	27.81	0.21
29	31.06	0.14	31.11	0.24	31.77	0.77	30.93	0.05
32	26.71	0.10	27.92	0.06	27.93	0.19	26.32	0.30
33	31.35	0.05	29.85	0.07	32.58	0.25	29.03	0.33
39	29.89	0.22	29.32	0.04	30.93	0.13	28.17	0.02
40	31.49	0.07	31.40	0.00	32.91	0.14	30.40	0.09
43	30.66	0.08	29.94	0.04	33.16	0.06	32.62	0.04
44	29.49	0.04	28.74	0.06	27.68	0.25	27.89	0.20
45	30.00	0.11	29.54	0.20	31.93	0.45	28.96	0.45
46	29.90	0.20	29.60	0.13	28.74	0.24	28.19	0.06
47	28.05	0.12	27.61	0.11	24.47	0.40	26.55	0.18
49	28.10	0.02	28.98	0.03	31.43	0.11	27.17	0.19
50	28.17	0.12	28.67	0.08	31.11	0.44	27.40	0.07
51	28.41	0.07	28.46	0.08	30.20	0.30	26.06	0.08
53	29.24	0.02	28.61	0.04	27.28	0.35	26.12	0.19
54	29.01	0.17	28.81	0.04	30.77	0.12	27.54	0.07
63	30.61	0.08	29.82	0.10	36.86	0.36	28.23	0.11
72	29.22	0.02	28.54	0.03	31.24	0.01	28.09	0.10
74	30.93	0.03	30.98	0.08	33.98	0.61	31.58	0.14
PHN	22.49	0.07	21.09	0.41	23.40	0.09	22.20	0.13

PHN: *pool* de hipófise normal

8 - REFERÊNCIAS

1. Molitch ME. Nonfunctioning pituitary tumors and pituitary incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(1):151-71, xi.
2. Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest.* 2003;112(11):1603-18.
3. Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev.* 1998;19(6):798-827.
4. Lopes MBS. The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary. *Acta Neuropathol.* 2017.
5. Saeger W, Lüddecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R, Quabbe HJ, Petersenn S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol.* 2007;156(2):203-16.
6. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer.* 2004;101(3):613-9.
7. Trouillas J, Roy P, Sturm N, Dantony E, Cortet-Rudelli C, Viennet G, et al. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol.* 2013;126(1):123-35.
8. GREENBERG MS. Primary brain tumor. 8 ed: Thieme; 2010. 590-696 p.
9. Knosp E, Steiner E, Kitz K, Matula C. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery.* 1993;33(4):610-7; discussion 7-8.
10. Moreno CS, Evans CO, Zhan X, Okor M, Desiderio DM, Oyesiku NM. Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer Res.* 2005;65(22):10214-22.
11. Liu W, Kunishio K, Matsumoto Y, Okada M, Nagao S. Matrix metalloproteinase-2 expression correlates with cavernous sinus invasion in pituitary adenomas. *J Clin Neurosci.* 2005;12(7):791-4.
12. Turner HE, Nagy Z, Esiri MM, Harris AL, Wass JA. Role of matrix metalloproteinase 9 in pituitary tumor behavior. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(8):2931-5.
13. Mete O, Ezzat S, Asa SL. Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol.* 2012;49(2):R69-78.
14. Gong J, Zhao Y, Abdel-Fattah R, Amos S, Xiao A, Lopes MB, et al. Matrix metalloproteinase-9, a potential biological marker in invasive pituitary adenomas. *Pituitary.* 2008;11(1):37-48.
15. Paez-Pereda M, Kuchenbauer F, Arzt E, Stalla GK. Regulation of pituitary hormones and cell proliferation by components of the extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(10):1487-94.
16. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161-74.
17. Johansson N, Ahonen M, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(1):5-15.
18. Apte SS, Olsen BR, Murphy G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem.* 1995;270(24):14313-8.

19. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem*. 1996;271(48):30375-80.
20. Bourboulia D, Han H, Jensen-Taubman S, Gavil N, Isaac B, Wei B, et al. TIMP-2 modulates cancer cell transcriptional profile and enhances E-cadherin/beta-catenin complex expression in A549 lung cancer cells. *Oncotarget*. 2013;4(1):166-76.
21. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 1991;64(2):327-36.
22. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J*. 1993;7(15):1434-41.
23. Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Moll U. M(r) 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. *Cancer Res*. 1993;53(1):140-6.
24. Langenskiöld M, Holmdahl L, Falk P, Ivarsson ML. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2005;20(3):245-52.
25. Vasaturo F, Solai F, Malacrino C, Nardo T, Vincenzi B, Modesti M, et al. Plasma levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 correlate with histological grade in breast cancer patients. *Oncol Lett*. 2013;5(1):316-20.
26. Wu CY, Wu MS, Chiang EP, Chen YJ, Chen CJ, Chi NH, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 level is better than serum matrix metalloproteinase-9 level to predict gastric cancer evolution. *Clin Cancer Res*. 2007;13(7):2054-60.
27. Dragutinović V, Izrael-Zivković L, Radovanović N. Relation of matrix metalloproteinase-9 to different stages of tumors in the serum of gastric cancer. *Dig Dis Sci*. 2009;54(6):1203-7.
28. Kawamoto H, Uozumi T, Kawamoto K, Arita K, Yano T, Hirohata T. Type IV collagenase activity and cavernous sinus invasion in human pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 1996;138(4):390-5.
29. Ceylan S, Anik I, Koc K, Kokturk S, Cine N, Savli H, et al. Microsurgical anatomy of membranous layers of the pituitary gland and the expression of extracellular matrix collagenous proteins. *Acta Neurochir (Wien)*. 2011;153(12):2435-43; discussion 43.
30. Kawamoto H, Kawamoto K, Mizoue T, Uozumi T, Arita K, Kurisu K. Matrix metalloproteinase-9 secretion by human pituitary adenomas detected by cell immunoblot analysis. *Acta Neurochir (Wien)*. 1996;138(12):1442-8.
31. Beaulieu E, Kachra Z, Mousseau N, Delbecchi L, Hardy J, Béliveau R. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human pituitary tumors. *Neurosurgery*. 1999;45(6):1432-40; discussion 40-1.
32. Knappe UJ, Hagel C, Lisboa BW, Wilczak W, Lüdecke DK, Saeger W. Expression of serine proteases and metalloproteinases in human pituitary adenomas and anterior pituitary lobe tissue. *Acta Neuropathol*. 2003;106(5):471-8.
33. Liu W, Matsumoto Y, Okada M, Miyake K, Kunishio K, Kawai N, et al. Matrix metalloproteinase 2 and 9 expression correlated with cavernous sinus invasion of pituitary adenomas. *J Med Invest*. 2005;52(3-4):151-8.
34. Qiu L, He D, Fan X, Li Z, Liao C, Zhu Y, et al. The expression of interleukin (IL)-17 and IL-17 receptor and MMP-9 in human pituitary adenomas. *Pituitary*. 2011;14(3):266-75.
35. Gültekin GD, Çabuk B, Vural Ç, Ceylan S. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2: Prognostic biological markers in invasive prolactinomas. *J Clin Neurosci*. 2015;22(8):1282-7.

36. Liu HY, Gu WJ, Wang CZ, Ji XJ, Mu YM. Matrix metalloproteinase-9 and -2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in invasive pituitary adenomas: A systematic review and meta-analysis of case-control trials. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(24):e3904.
37. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, He X, Pickard R, Koluder M, et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(7):945-54.
38. 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):402-8.
39. Strongin AY. Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(1):133-41.
40. Sounni NE, Rozanov DV, Remacle AG, Golubkov VS, Noel A, Strongin AY. Timp-2 binding with cellular MT1-MMP stimulates invasion-promoting MEK/ERK signaling in cancer cells. *Int J Cancer*. 2010;126(5):1067-78.
41. Wang J, Liu YS. [Expression of MMPs and TIMP and invasiveness in pituitary adenomas]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2004;29(6):647-50.
42. Huang Z, Ma L, Huang C, Li Q, Nice EC. Proteomic profiling of human plasma for cancer biomarker discovery. *Proteomics*. 2017;17(6).
43. Mukherjee R, Akar JG, Wharton JM, Adams DK, McClure CD, Stroud RE, et al. Plasma profiles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of the metalloproteinases predict recurrence of atrial fibrillation following cardioversion. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(4):528-35.
44. Marchesi C, Dentali F, Nicolini E, Maresca AM, Tayebjee MH, Franz M, et al. Plasma levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*. 2012;30(1):3-16.
45. Thapar K, Kovacs K, Scheithauer BW, Stefanescu L, Horvath E, Pernicone PJ, et al. Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody. *Neurosurgery*. 1996;38(1):99-106; discussion -7.
46. Mastronardi L, Guiducci A, Spera C, Puzzilli F, Liberati F, Maira G. Ki-67 labelling index and invasiveness among anterior pituitary adenomas: analysis of 103 cases using the MIB-1 monoclonal antibody. *J Clin Pathol*. 1999;52(2):107-11.
47. Chacko G, Chacko AG, Kovacs K, Scheithauer BW, Mani S, Muliyl JP, et al. The clinical significance of MIB-1 labeling index in pituitary adenomas. *Pituitary*. 2010;13(4):337-44.
48. KK LR, Jr YW, WE F, SL A, J T, G K, et al. WHO Classification of Tumors of the Endocrine Organs: Pathology and Genetics of Endocrine Organs: IARC Press; 2004.
49. Del Basso De Caro M, Solari D, Pagliuca F, Villa A, Guadagno E, Cavallo LM, et al. Atypical pituitary adenomas: clinical characteristics and role of ki-67 and p53 in prognostic and therapeutic evaluation. A series of 50 patients. *Neurosurg Rev*. 2017;40(1):105-14.
50. Chiloiro S, Doglietto F, Trapasso B, Iacovazzo D, Giampietro A, Di Nardo F, et al. Typical and atypical pituitary adenomas: a single-center analysis of outcome and prognosis. *Neuroendocrinology*. 2015;101(2):143-50.
51. Pan LX, Chen ZP, Liu YS, Zhao JH. Magnetic resonance imaging and biological markers in pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space. *J Neurooncol*. 2005;74(1):71-6.

APÊNDICES

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão plasmática e tecidual das metaloproteinases de matriz 2 e 9 em pacientes com adenomas hipofisários e sua correlação com comportamento tumoral invasivo

Pesquisador: Marcello Delano Bronstein

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 22787414.0.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 623.807

Data da Relatoria: 12/03/2014

Apresentação do Projeto:

Análise da expressão plasmática e tecidual das metaloproteinases de matriz 2 e 9 em pacientes com adenomas hipofisários e sua correlação com comportamento tumoral invasivo em 100 pacientes portadores de adenomas hipofisários, submetidos a cirurgia transesfenoidal para retirada do tumor,

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a relação entre a expressão tecidual e plasmática das MMP-2, MMP-9, TIMPs-1, -2, -3 e -4, sua atividade enzimática, e grau de invasão tumoral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos inerentes dos procedimentos medicos necessários

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem mérito científico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequados

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 623.807

Recomendações:

não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 24 de Abril de 2014

Assinador por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010

UF: SP Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

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:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Análise da expressão plasmática e tecidual das metaloproteinases de matriz 2 e 9 em pacientes com adenomas hipofisários e sua correlação com comportamento tumoral invasivo”

2. PESQUISADORES: Responsável: **Marcello Delano Bronstein** / Executante: Ane Caroline Thé Bonifácio Freire
CARGO/FUNÇÃO: Médico; INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 15798
UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Neuroendocrinologia, Serviço/Disciplina de Endocrinologia e Metabologia – Divisão de Clínica Médica 1

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses (previsão)

5. DESENHO E OBJETIVOS DO ESTUDO: Fornecemos estas informações sobre o estudo para auxiliar na decisão em participar voluntariamente dessa pesquisa. Os tumores hipofisários são, na maioria dos casos, tumores benignos, que podem ou não produzir hormônios. Dependendo do tipo de hormônio produzido, o paciente apresenta uma doença diferente: aumento do hormônio do crescimento (acromegalia), aumento do cortisol (doença de Cushing), aumento da prolactina (prolactinoma). Mesmo quando não

produzem hormônios, podem levar a sintomas significativos, como dores de cabeça e prejuízo à visão devido à proximidade com estruturas nobres, como o nervo responsável pela visão. Apesar de benignos, podem ser difíceis de tratar, devido a dificuldades na retirada completa durante a cirurgia por serem, muitas vezes, invasivos. Podem, ainda, apresentar crescimento e recidiva no pós-operatório. Este estudo visa pesquisar a presença de enzimas denominadas metaloproteinases de matriz nos tumores hipofisários e no sangue dos pacientes portadores dessa condição e sua relação com comportamento invasivo, crescimento tumoral e recidiva pós-operatória.

6.DESCRICÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS: Serão coletadas amostras de sangue por punção de veia do antebraço dos pacientes no pré-operatório e tecido do tumor da hipófise obtido durante a cirurgia indicada para o tratamento, que serão posteriormente analisadas em laboratório. Essa análise não muda o tratamento recebido.

7.BENEFÍCIOS PARA O PARTICIPANTE: Não há benefício direto para o participante, mas esse estudo poderá contribuir para a compreensão do comportamento invasivo nos tumores hipofisários. Somente ao final do estudo poderemos concluir sobre a presença de algum benefício.

8.RELAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS QUE POSSAM SER VANTAJOSOS, PELOS QUAIS O PACIENTE PODE OPTAR: Não há.

9.GARANTIA DE ACESSO: Em qualquer etapa do estudo, o participante terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas referentes aos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa. O principal investigador é o Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN e a Pesquisadora Executante é Ane Caroline Thé Bonifácio Freire, que podem ser encontrados no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, nº155, 5º andar, bloco 4B, ambulatório de Endocrinologia, telefones: (011) 3069-6745 / 3069-6293 / 3069-6624. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel.: (011) 2661-6442 ramais 16, 17, ou 18, FAX: 2661-6442, ramal 26, e-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

10. É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

11.DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros indivíduos da pesquisa, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

12.DIREITO DE SER MANTIDO ATUALIZADO SOBRE OS RESULTADOS: O participante do estudo tem o direito de saber o resultado final quando o estudo estiver concluído.

13.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.

14. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e os materiais coletados somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo referido.

Li este documento e seu conteúdo foi explicado para mim por Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN / Dra. Ane Caroline Thé Bonifácio Freire.

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. Forneço de livre e espontânea vontade meu consentimento para participar deste estudo, sabendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou prejuízo no meu atendimento neste serviço.

☐ Sim, eu recebi uma cópia assinada do termo de consentimento livre.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos 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 / /