Valter Angelo Sperling Cescato

Expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, bax, e caspase-3 nos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e seu potencial como marcador do comportamento tumoral

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

Área de concentração: Neurologia
Orientador: Prof. Dr. Manoel Jacobsen Teixeira

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cescato, Valter Angelo Sperling
Expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, bax, e caspase-3 nos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e seu potencial como marcador do comportamento tumoral / Valter Angelo Sperling Cescato. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Neurologia.
Área de concentração: Neurologia.
Orientador: Manoel Jacobsen Teixeira.

Descritores: 1.Hipófise 2.Adenoma hipofisário 3.Apoptose 4.Genes bcl-2 5.Proteína X associada a bcl-2 6.Caspase 3 7.Antígeno Ki-67

USP/FM/SBD-077/10

ERRATA

Cescato VAS. Expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, bax, e caspase-3 nos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e seu potencial como marcador do comportamento tumoral [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Página 37, título da figura 10	o hífen da palavra ântero-posterior foi colocado em local errado.
Página 40, título da tabela 6	a palavra anátomo-patológico foi grafada sem hífen.
Página 42	deverá ser ignorada porque a tabela 6 está em duplicata, a mesma tabela foi impressa também na página 40.
Página 44, título da tabela 7	a palavra imuno-histoquímica foi grafada sem hífen.
Página 50. Tabela 14	letra "c" digitada em excesso no título da tabela que deveria ser: "Coeficientes de correlação de Spearman (r) do volume do tumor com QR bax, QR bcl-2 e QR caspase 3"
Página 50. Tabela 15	A palavra "associação" foi grafada com um "s" apenas.
Página 52, primeira linha	Faltou espaçamento entre o número 18 e a palavra estão.

DEDICATÓRIA

Agradeço a minha família: aos meus filhos Cristiano Ricardo Cescato e Rogério Augusto Cescato dos quais muito me orgulho e à minha esposa e companheira de mais de quarenta anos, Clara Lúcia Cescato, que sempre me incentivou, sempre esteve ao meu lado, apoiando e me dando suporte sem nunca reclamar das horas de convívio familiar que a profissão nos priva.

É para eles que dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

Ao elaborar a lista de agradecimentos, no final da formatação desta tese, me dei conta que se agradecesse nominalmente todos que me ajudaram, esta lista seria maior que a própria tese, inviabilizando-a. Portanto agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para este trabalho, seja participando com idéias, ações, sugestões ou elaborando críticas, aos colegas que nos encaminham pacientes e especialmente a eles, os pacientes que a mim confiaram suas vidas.

Há, entretanto, um grupo de pessoas que não posso deixar de citar. Inicialmente agradeço ao amigo e hoje, muito merecidamente, Professor Titular de Neurocirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Doutor Manoel Jacobsen Teixeira que no ano de 1998 transferiu-se da Divisão de Neurocirurgia do Departamento de Neurologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria do mesmo Hospital, levando-me com ele por minha ¨livre e espontânea¨ vontade; que no final do ano de 1999 me tirou do meio do ambulatório e me pediu que fosse operar paciente no Centro Cirúrgico do Instituto de Psiquiatria, pois havia paciente anestesiado e o cirurgião (o saudoso e querido Mário Lorenzi) adoentado não pode iniciar o procedimento; que me cobrou e me cobra até hoje o meu Doutorado e que aceitou ser meu orientador além de amigo.

Agradeço ao Professor Dr. Raul Marino Jr. que, visionário, criou há mais de trinta anos o núcleo deste Grupo de Neuroendocrinologia, do qual participo desde o final de 1999 e que me propiciou, pelo volume de pacientes atendidos e pelo

conhecimento dos colegas de grupo, adquirir a experiência que hoje possuo nesta área. Agradeço ao Dr. Pedro Padilha de Menezes, caro amigo e colega, com quem compartilhei o aprendizado da técnica da cirurgia transesfenoidal, inicialmente nos cadáveres e posteriormente nos doentes. Agradeço ao Dr. Malebranche Berardo Carneiro da Cunha Neto e a sua esposa Andréia que muito me ajudaram e encorajaram na escolha do tema e na iniciação ao estudo de biologia molecular.

Agradeço à Emilia Modolo Pinto pelas orientações, sugestões, paciência ao efetuar as análises e ao me ensinar a metodologia e pelo seu trabalho excepcional na análise molecular efetuada no Laboratório de Patologia Cardiovascular da FMUSP, LIM 22, chefiado pelo Dr. Chin Jia Lin que também muito nos ajudou com suas sugestões. Agradeço ao Professor Dr. Sergio Rosemberg e a Dra. Sheila Siqueira do Departamento de Anatomia Patológica que efetuaram a análise histológica e imuno-histoquímica, respectivamente.

Agradeço aos residentes da Neurocirurgia e ao Dr. Gilberto Ochman que me auxiliam nas cirurgias. Agradeço a toda equipe de enfermagem e às instrumentadoras pelo valioso auxílio e extrema dedicação e cuidados com os doentes. Agradeço a toda equipe de Anestesiologia do Instituto de Psiquiatria, uma verdadeira ¨seleção de craques¨ que proporcionaram a mim e aos doentes as melhores condições cirúrgicas possíveis. Agradeço às secretárias da Divisão de Neurocirurgia Funcional, Francisca, Marly e Shirlei por sua generosidade e disponibilidade.

Agradecimento especial à Dra Nina Rosa de Castro Musolino, amiga de muitos anos, colega de trabalho há mais de dez anos, que participou de todo processo desta tese, desde a escolha do tema, pelo incentivo nestes anos, pela confiança no encaminhamento de pacientes, pela dedicação com os doentes, pela clareza das idéias

e pela facilidade em mostrá-las e principalmente pelas críticas, sempre pertinentes, ao nosso trabalho. Não bastasse o seu auxílio intelectual na elaboração da tese, devo a ela o hercúleo trabalho de formatação e revisão do texto.

Esta tese foi elaborada 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. Serviço 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. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas
Lista de tabelas
Lista de figuras
Resumo
Summary

1.INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 A hipófise 3
2.2 Tumorigênese hipofisária 4
2.3 Tumores hipofisários 5
2.4 Adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes 8
2.5 Bases moleculares da oncogênese hipofisária 11
2.5.1 Proto-oncogenes 12
2.5.2 Genes de supressão tumoral 12
2.5.3 Angiogênese 13
2.5.4 Apoptose e genes envolvidos em mecanismos apoptóticos 14
3.OBJETIVOS 20
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS 21
4.1 Casuística 21
4.2 Metodologia 21
4.2.1 Análise clínica 21
4.2.2 Avaliação por imagem 22
4.2.3 Avaliação intra-operatória 23
4.2.4 Análise histológica diagnóstica 25
4.2.5 Análise imuno-histoquímica das proteínas Ki-67, p53 e Bcl-2 25
4.2.6 Análise molecular 26
4.2.6.1 Extração e quantificação do ácido ribonucleico 26
4.2.6.2 Síntese de ácido desoxirribonucléico complementar..... 28
4.2.6.3 Análise da expressão 28
4.2.7 Análise estatística 29
5. RESULTADOS 31
5.1 Caracterização clínica da amostra dos pacientes 31
5.2 Achados de imagem 33
5.3 Achados intra e pós-operatórios 38
5.4 Resultados do exame histológico diagnóstico 38
5.5 Resultado da imuno-histoquímica 39
5.5.1 Imuno-histoquímica para Ki-67 39
5.5.2 Imuno-histoquímica para p53..... 41
5.5.3 Imuno-histoquímica para BCL-2 41
5.6 Resultados da análise molecular 41
5.7 Resultados da análise estatística 45
5.7.1 Resultados da correlação do tamanho do tumor com achados clínicos 45
5.7.2 Resultados da correlação da dimensão do tumor e imuno-histoquímica para hormônios hipofisários 47

5.7.3 Resultados das correlações considerando-se a expressão gênica ... 48
5.7.4 Comparação dos dados obtidos do exame de imuno-histoquímica para a proteína BCL-2 com os resultados da análise molecular para o gene Bcl-2 (QR Bcl-2)..... 52
5.7.5 Resultados da análise considerando-se a relação entre a expressão do Bcl-2 e do Bax 53
5.7.6 Análise estatística das correlações com o Ki-67 54
6. DISCUSSÃO 56
6.1 Caracterização da casuística 56
6.2 Relação dos marcadores com agressividade tumoral 59
6.3 Considerações finais 66
7. CONCLUSÕES 68
Anexo A 69
Anexo B 71
Anexo C 72
8. REFERÊNCIAS 73

LISTA DE ABREVIATURAS

ACI	artéria carótida interna
ACNF	adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
ACTH "silent"	adenoma hipofisário clinicamente não funcionante com imuno-histoquímica positiva para ACTH
AP	antero-posterior
BAX	“Bcl-2 associated protein X”
Bcl-2	gene : “B cell lymphoma protein 2”
BCL-2	proteína : “B cell lymphoma protein 2”
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CC	crânio-caudal
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
ER	receptor estrogênico
FGF	fator de crescimento fibroblástico
Fig.	figura
FSH	hormônio folículo-estimulante
GAPDH	“human Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”
GH	hormônio de crescimento
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
iASPP	membro inibitório pertencente à família das ASPP:"apoptosis stimulating protein of P53"
IHQ	imuno-histoquímica
Ki-67	antígeno nuclear utilizado como marcador de proliferação celular
LH	hormônino luteinizante
LL	látero-lateral
MMP	“matrix metalloprotreinase"
MVD	“microvessel density”
"null cell"	adenoma hipofisário sem grânulos de secreção hormonal à detecção por imuno-histoquímica
p53	gene supressor tumoral
PIT 1	“anterior pituitary-specific transcription factor”
PRL	prolactina
PTTG	gene hipofisário de transformação tumoral
QR	quantificação relativa
RM	ressonância magnética
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	transcrição reversa da reação de polimerização em cadeia
SC	seio cavernoso
SF	fator esteroidogênico
"stem cell"	célula precursora ou célula tronco, totipotente
T4	tiroxina ou tetraiodotironina
TC	transcraniana
TEF	“thyrotroph embryonic factor”
TNF	fator de necrose tumoral
TS	transesfenoidal
TSH	hormônio tireotrófico
VEGF	“vascular endotelial growth factor”

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.Estatísticas descritivas para a idade, tempo dos sintomas e número de deficiências..... 31
Tabela 2. Características dos pacientes estudados 32
Tabela 3. Dados relativos à imagem do tumor obtidos por ressonância magnética 34
Tabela 4. Estatísticas descritivas das medidas do tumor 35
Tabela 5. Número de casos e percentagens de ocorrência ou não de invasão e expansão do tumor, constatados pelo exame de RM e consistência do tumor observada durante a cirurgia..... 35
Tabela 6. Dados relativos à cirurgia, exame anátomopatológico e exame imuno-histoquímico do tumor para hormônios hipofisários, ki-67 e BCL-2 e complicações cirúrgicas 40
Tabela 7. Resultados relativos da expressão dos genes estudados (Bcl-2, Bax e caspase 3) em comparação aos resultados obtidos para o controle (hipófise normal) e resultado da imunohistoquímica (IHQ) para BCL-2..... 44
Tabela 8. Coeficientes de correlação de Spearman entre as dimensões do tumor..... 45
Tabela 9. Coeficientes de correlação de Spearman (r) do volume com a idade, duração dos sintomas e número de deficiências 47
Tabela 10. Estatísticas descritivas para os volume dos tumores em cada categoria de imuno-histoquímica (IHQ) ..... .47
Tabela 11. Estatísticas descritivas para as QR Bax, QR Bcl-2 e QR caspase 3 48
Tabela 12- Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre QR BAX, QR Bcl-2 e QR Caspase 49
Tabela 13. Coeficientes de correlação de Spearman (r) da idade com QR bax, QR bcl-2 e QR caspase 3 ..... .50
Tabela 14. Coeficientes de correlação de Spearman (r) do volume do tumor com QR bax, QR bcl-2 e QR caspase 3 50
Tabela 15. Valores de p obtidos no teste de Kruskal-Wallis para testar a associação de duas variáveis ..... .50
Tabela16. Número de casos, média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo para QR bax e QR bcl-2 em cada grupo de imuno-histoquímica (IHQ) positiva ou negativa 51
Tabela 17. Estatísticas descritivas para diferença QR Bcl-2 - QR Bax nos doentes com (sim) ou sem (não) tumor invasivo 53
Tabela 18. Distribuição dos doentes com (sim) ou sem (não) tumor invasivo em relação à positividade do Ki-67 54
Tabela 19. Medidas descritivas para volume tumoral e idade para cada grupo de doentes classificados segundo a positividade para o Ki-67 na imuno-histoquímica 55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo da citodiferenciação da adeno-hipófise. Pit-1:fator de transcrição hipofisário 1, CUTE: "corticotroph upstream transcriptin-binding element", SF: fator esteroidogênico, TEF: fator tirotrófico embrionário, ER: receptor estrogênico..... 4
Figura 2. Visão geral esquemática das vias de apoptose celular..... 18

Figura 3. Ressonância magnética da região selar em controles normais... 22
Figura 4. "Box-plots" para a idade 31
Figura 5. Distribuição dos pacientes (percentual) em relação ao número de eixos hipofisários com deficiência hormonal..... 33
Figura 6. Imagem do paciente #17 com as medidas do tumor 35
Figura 7. Imagem do paciente #3 com as medida do tumor 36
Figura 8. Imagens de RM pré e pós-operatória do paciente # 9 36
Figura 9. Imagens de RM pré e pós-operatória do paciente #5 37
Figura 10. "Box-plots" para as dimensões do tumor 37
Figura 11. Lâminas coradas para Ki-67 por imuno-histoquímica em menos de 3% das células, paciente #11 e em mais de 3% das células, paciente #21 39
Figura 12. Comparação entre a expressão gênica, representada pela quantificação relativa (QR) obtidos para Bax, Bcl-2 e caspase 3 nos pacientes em comparação à hipófise normal (gráfico superior) ou apenas entre os pacientes (gráfico inferior)..... 43
Figura 13. Diagramas de dispersão do maior diâmetro do tumor (cm) x a soma dos seus três diâmetros (cm), do maior diâmetro (cm) x volume do tumor (cm3) e da soma dos três diâmetros (cm) x volume do tumor (cm3) 45
Figura 14. Diagramas de dispersão do volume (cm3) x idade (anos), volume (cm3) x duração dos sintomas (meses) e volume (cm3) x número de deficiências hormonais 46
Figura 15. Valores individuais e medianos do volume (cm3) em cada categoria de doentes de acordo com o exames imuno-histoquímico (ICQ) 48
Figura 16. "Box-plots" para os valores de QR Bax, QR Bcl-2 e QR Caspase 3 49
Figura 17. Valores individuais e medianas de QR Bax e QR Bcl-2 em cada categoria de imuno-histoquímica (ICQ) positiva ou negativa para qualquer hormônio hipofisário 51
Figura 18. Box-plots para QR Bax, QR Bcl-2 e QR caspase 3 nos doentes com (sim) ou sem (não) tumores invasivos. 52
Figura 19. Distribuição dos valores de quantificação relativa (QR) do gene bcl-2 obtidos para cada paciente em relação à positividade da proteína BCL-2 à imuno-histoquímica 53
Figura 20. Box-plots para volume tumoral (cm) e idade (anos) em cada grupo de doentes classificados segundo a positividade para o Ki-67analisada na imuno-histoquímica 55

Cescato VAS. *Expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, bax, e caspase-3 nos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e seu potencial como marcador do comportamento tumoral* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 80p.

Adenomas hipofisários são tumores benignos, de crescimento lento, originados no interior da sela túrcica e constituem de 10% a 15% dos tumores intracranianos, Os adenomas clinicamente não funcionantes (ACNF), correspondem aproximadamente um terço dos adenomas em geral. Por não apresentarem síndrome clínica hormonal são geralmente diagnosticados devido a sintomas neurológicos ou oftalmológicos, como macroadenomas, com grandes dimensões, invasão de estruturas circunvizinhas e hipopituitarismo. A cirurgia é o tratamento de escolha para estes tumores e apesar de ser eficaz na resolução do quadro compressivo, a possibilidade de cura cirúrgica é reduzida principalmente em tumores invasivos. Seu acompanhamento pós-operatório é efetuado por exame de imagem, preferencialmente ressonância magnética, devido à indisponibilidade de marcadores séricos. Nesta pesquisa avaliou-se a relação da expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, Bax e Caspase-3 e sua relação com o comportamento dos ACNF. Na Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram operados 119 doentes com tumores hipofisários, de 28/05/08 à 07/04/09, 50 deles com ACNF, 30 deles foram estudados. A ressonância magnética da região selar pré-operatória possibilitou a medida dos três maiores diâmetros do tumor, ou seja, antero-posterior (AP), crânio-caudal (CC), látero-lateral (LL) e avaliar a invasão do seios cavernoso e esfenoidal. O tamanho dos tumores foi avaliado pela soma dos três diâmetros, pelo maior diâmetro e pelo cálculo do volume, efetuado pela fórmula AP x CC x LL x 0,5. No intraoperatório foram avaliados, a consistência e invasão tumoral. A análise histológica por hematoxilina-eosina, foi efetuada em todos os tumores, assim como a análise imuno-histoquímica (IHQ) dos hormônios hipofisários, Ki-67, p53 e Bcl-2. Foi realizada a análise molecular dos genes Bcl-2, Bax e Caspase-3 por RT-PCR. Dados demográficos: 17 do sexo masculino, 13 do sexo feminino, mediana da idade foi de 54,5 anos e mediana da duração dos sintomas de 31 meses. Todos apresentavam macroadenoma, 87% deles com perda visual, 53% com cefaléia, 17% com outras alterações neurológicas e um assintomático diagnosticado incidentalmente. Avaliação hormonal, disponível em 26 doentes, confirmou deficiência em 92% deles, com mais de dois eixos acometidos em 50% dos casos. A mediana do volume dos tumores foi de 11,6 cm^3, do maior diâmetro de 3,8cm e da soma dos três diâmetros de 8,6cm, observou estreita correlação significativa estatisticamente entre as três medidas. Quarenta porcento dos tumores eram gigantes (diâmetro maior ou igual a 4 cm). Consistência amolecida e invasão tumoral foram observadas em 87% e 67% dos tumores, respectivamente. Todos doentes foram operados pela via transesfenoidal, exceto um operado por craniotomia pterional. Complicações cirúrgicas ocorreram em cinco pacientes, três com fistula liquórica, dois com meningite e dois óbitos. A análise histológica confirmou o diagnóstico de adenoma hipofisário em todos os casos. A IHQ foi negativa para todos hormônios em 18 e positiva em 12 tumores (TSH, FSH, LH, GH ou ACTH). A IHQ para proteína P-53 foi negativa em todos os casos. A IHQ para KI-67 revelou ausência da proteína em 11, positividade em menos de 3% das células em 15 e em mais de 3% em 4 tumores. A IHQ para Bcl-2 foi positiva em apenas três pacientes. A análise molecular dos genes Bcl-2, Bax e Caspase-3 revelou expressão muito inferior nos tumores em relação à observada para um pool de hipófise normal. Observou-se correlação positiva estatisticamente significante entre os três genes porém não foi observada correlação entre os níveis destes três genes e nenhum fator de prognóstico tumoral estudado, quais sejam, idade, positividade para hormônios na IHQ, tamanho ou invasão tumoral.

Descritores: hipófise; adenoma hipofisário; apoptose; genes bcl-2; proteína X associada a bcl-2; caspase 3; antígeno Ki-67

Cescato VAS. *Bcl-2, bax and caspase-3 apoptosis related genes expression in non-functioning pituitary adenoma and their role as potential markers of tumor behavior* [thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2010. 80p.

Pituitary adenomas are benign, slow-growing tumors that arise in the sella turcica and account for 10% to 15% of all intracranial tumors. Non-functioning pituitary adenomas (NFPA) account for around one third of all pituitary adenomas. NFPA do not clinically present as hormonal syndromes and are generally diagnosed as macroadenomas due to marked neurological and ophthalmologic symptoms and invasion of surrounding structures, beside hypopituitarism. Surgery is the gold standard to treat these tumors. It effectively relieves compressive symptoms but cure is uncommon. Despite benign in nature, NFPA usually show aggressive behavior. There are no hormonal markers and the follow-up usually is made only by magnetic resonance imaging. Apoptosis-related genes, Bcl-2, Bax, and caspase-3, were here studied in NFPA to assess their role as potential markers of tumor behavior. Out of 119 patients with pituitary adenomas treated by surgery, 30 patients (17 men, 13 women, median age 54.5 years old) harboring NFPA who underwent surgery in the Department of Functional Neurosurgery at Hospital das Clínicas Psychiatric Institute, University of S. Paulo Medical School, from August 2008 to July 2009, were studied. Information on gender, age, pituitary function, symptoms and their length was collected. Tumor dimensions were measured using magnetic resonance imaging of the sella turcica. The tumor volume was calculated by the following equation: anterior-posterior diameter x cranial-caudal diameter x lateral-lateral diameter x 0.5. Intra-operative information such as tumor invasion and consistence was recorded. Histological examination by hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry analysis of pituitary hormones, Ki-67, p53, and Bcl-2 were performed. The molecular analysis of Bcl-2, Bax, and caspase-3 genes was performed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in all tumor specimens collected during surgery and compared to a poll of normal pituitary gland. All patients had macroadenomas diagnosed due to visual loss (87%), headache (53%) and other neurological symptoms (17%) and one case was incidentally found. Hormonal deficits were seen in 92% of 26 cases; more than two axes were involved in half of these patients. There was found good correlation between tumor volume, largest diameter and the sum of the 3 diameters, and tumor volume was used to assess the correlations with other parameters. The median volume was 11.6 cm3. Giant tumors (≥4 cm) were diagnosed in 40% of the patients. Soft tumors and tumor invasion were observed in 87% and 67% of cases, respectively. A transsphenoidal approach was used in all patients, except one who had pterional craniotomy. Five patients presented post-operative complications: three had CSF leakage, two meningitis and two died. The histological examination confirmed pituitary adenoma in all cases, 18 of them were "null cell" and 12 showed a positive immunohistochemistry analysis for one or more hormones, mainly TSH. Immunohistochemistry analysis results for p-53 was negative in all cases; for Ki-67 was negative in 11, positive in less than 3% of the cells in 15 and positive in more than 3% of the cells in 4 cases; and for Bcl-2 was positive only in three patients. Bcl-2, Bax and caspase-3 molecular analysis revealed very low expression compared to normal pituitary values. There was found a positive correlation between these three genes but no correlation between them and age, tumor volume or invasion. The Bcl-2, Bax, and caspase-3 gene analysis by RT-PCR in NFPA did not evidence their potential as markers of tumor behavior.

Descriptors: pituitary; pituitary tumors; apoptosis; genes, bcl-2; bcl-2-associated X protein; caspase 3; ki-67 antigen

1. INTRODUÇÃO

Na Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) são operados anualmente, em média, 120 doentes com afecções do eixo hipotálamo-hipofisário, das quais, os adenomas hipofisários constituem a grande maioria. Os pacientes operados nesta Divisão são provenientes do Ambulatório de Neuroendocrinologia da própria Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP ou do Serviço de Endocrinologia e Metabologia da Divisão de Clínica Médica I do HCFMUSP, numa proporção aproximada de 60% e 40%, respectivamente. O maior contingente dos doentes oriundos da Divisão de Neurocirurgia Funcional apresenta adenoma hipofisário clinicamente não funcionante (ACNF).

A maioria dos doentes com ACNF apresenta grandes tumores ao diagnóstico, frequentemente invasivos, com baixa probabilidade de cura cirúrgica. Por não apresentarem marcadores séricos efetivos, a indicação de cirurgia, a decisão de reoperação, a indicação de terapia adjuvante pós-operatória, como radioterapia ou tratamento medicamentoso, depende principalmente da avaliação do exame de imagem, preferencialmente a ressonância magnética (RM). Apesar de, atualmente, estarem disponíveis tanto aparelhos de RM de alta resolução como avaliadores experientes, a aferição é subjetiva e sujeita a erros de interpretação.

Várias pesquisas têm sido efetuadas à procura de marcador confiável nos ACNF. Trabalhos baseados em biologia molecular, recentemente publicados,

demonstraram a participação de genes e proteínas ligadas à apoptose na gênese e/ou crescimento dos tumores em geral.

O presente estudo avaliou a expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, Bax e caspase-3 nos ACNF e seu potencial marcador de comportamento tumoral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A hipófise

A glândula hipofisária mede em média 13 mm em seu maior diâmetro, localiza-se no interior da sela turca, ocupa aproximadamente 75% de seu volume total e pode ser dividida em dois lobos, cada um com origem embriológica distinta: o anterior ou a adeno-hipófise e o posterior ou a neuro-hipófise. Graças ao uso de IHQ e microscopia eletrônica, foi possível identificar cinco tipos celulares diferentes na adeno-hipófise, quais sejam: células secretoras de prolactina (PRL), células secretoras de hormônio do crescimento (GH), células gonadotróficas secretoras do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH), células corticotróficas secretoras do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e células secretoras do hormônio tireotrófico (TSH).[1] Foi também identificado um sexto tipo celular, que embora contenha grânulos secretores, não foi corado por nenhum dos anticorpos clássicos utilizados.[2]

O hipotálamo exerce função reguladora na glândula hipofisária e mantém com ela três conexões principais: 1. fascículo supra-óptico hipofisário 2. fascículo paraventricular hipofisário 3. fascículo tuberoinfundibular.

As funções da glândula hipofisária estão diretamente associadas aos hormônios por ela secretados. Estes atuam de modo endócrino tanto nas glândulas alvo, como sistemicamente, além de exercerem retrocontrole hipofisário e hipotalâmico.

2.2. Tumorigênese Hipofisária

Com o intuito de correlacionar as características anatômicas e funcionais entre os tumores hipofisários e a hipófise fetal humana, foram desenvolvidos modelos de citodiferenciação da glândula hipofisária que podem ser úteis no esclarecimento dos mecanismos envolvidos na gênese dos tumores hipofisários. O modelo representado na figura 1, proposto por Asa e Ezzat[1,3] admite a ação de fatores de transcrição implicados no desenvolvimento dos diferentes tipos celulares que, possivelmente, desempenhem papel relevante na determinação da atividade hormonal, bem como na citodiferenciação dos adenomas hipofisários.

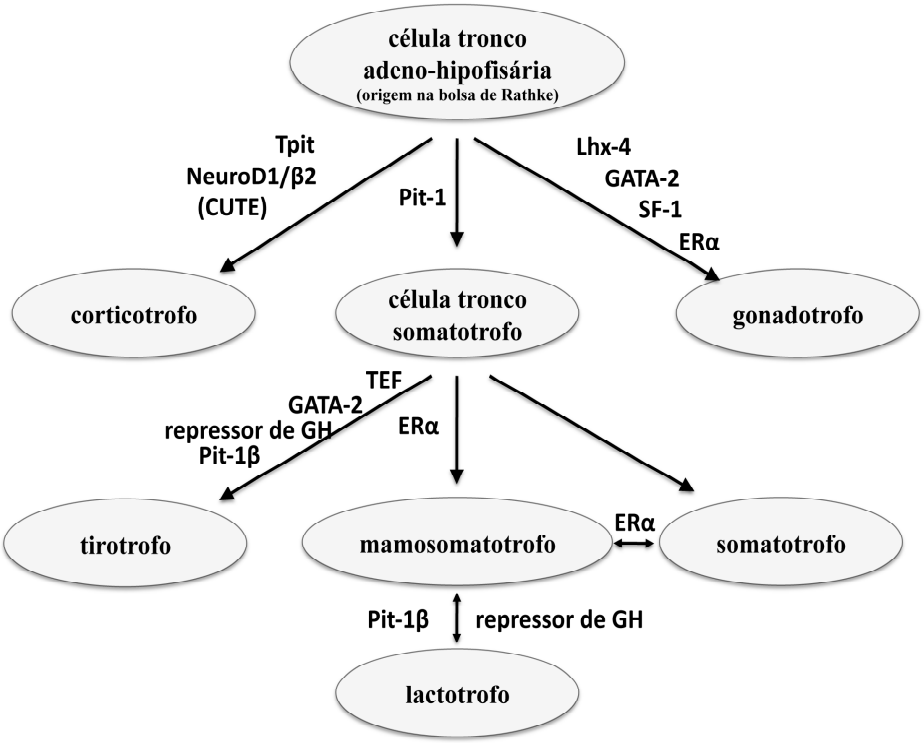


Figura 1. Modelo da citodiferenciação da adeno-hipófise. Pit-1:fator de transcrição hipofisário 1, CUTE: "corticotroph upstream transcriptin-binding element", SF: fator esteroidogênico, TEF: fator tirotrófico embrionário, ER: receptor estrogênico

O modelo proposto envolve a determinação da linhagem corticotrófica pelo "corticotroph upstream transcription-binding element" (CUTE) antes da 6ª semana de gestação. Em seguida, na ausência de outros fatores de transcrição, a expressão do fator de transcrição específico para a hipófise anterior (PIT 1) determina que a célula tronco somatotrófica retenha função e morfologia próprias. A presença de receptores estrogênicos permite a expressão da PRL nos mamossomatotrofos que se desenvolvem a partir da 12ª semana de gestação. Um provável repressor de GH poderia estar implicado no silenciamento da transcrição do GH e permitiria a emergência dos lactotrofos maduros. Outras células da linhagem PIT 1 expressam o fator embriológico tireotrófico (TEF) e dão origem aos tireotrofos em que um provável repressor de GH poderia estar envolvido. O mamosomatotrofo encontra-se no centro de três possíveis vias, porquanto é capaz de se transdiferenciar durante a vida, por exemplo durante a gravidez.

2.3. Tumores hipofisários

Os adenomas hipofisários são tumores epiteliais que se originam de células adeno-hipofisárias. Habitualmente benignos têm crescimento lento e originam-se no interior da sela túrcica. Constituem a mais freqüente das lesões selares e correspondem a aproximadamente 10 a 15% dos tumores intracranianos em casuísticas cirúrgicas e são evidenciados em 3 a 27% em autopsia de casos não selecionados,[4,5,6] sendo múltiplos em 0,9%[7].

Apesar de serem considerados benignos porque não causam metástases[8], os adenomas hipofisários podem ter "comportamento maligno", seja pela agressividade manifestada através do seu crescimento rápido e efeito de massa resultando em

sintomas de hipertensão intracraniana, anormalidades visuais e/ou hipopituitarismo; seja pela invasão de estruturas circunvizinhas como os seios cavernosos (SC) lateralmente, os seios aéreos paranasais inferiormente, as cisternas, as cavidades e o tecido encefálico superiormente ou pela destruição do arcabouço ósseo adjacente.

De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde de 2004[9], os tumores hipofisários são divididos em adenomas típicos, adenomas atípicos e carcinomas. Os adenomas são típicos em sua grande maioria. Os atípicos são diagnosticados pelo índice de proliferação celular medido pelo Ki-67 igual ou superior a 3% e correspondem a aproximadamente 5% dos adenomas. São chamados de carcinoma, apenas os tumores hipofisários que causem metástases[9,10]

Diversos outros modos de classificação dos adenomas hipofisários são também utilizados: morfológico, funcional, histológico, por IHQ, ultraestrutural e clinico-patológico[1].

De acordo com seu tamanho, podem ser divididos em microadenomas quando o maior diâmetro não ultrapassa 10 mm e macroadenomas, quando o maior diâmetro for superior a 10 mm. Podem ainda ser circunscritos ou invasivos.

De acordo com a sua atividade secretora podem ser divididos em adenomas funcionantes, quando apresentam síndromes clínicas características e em ACNF.

Todas as células adeno-hipofisárias podem originar adenomas, podem portanto ocorrer: somatotrofinomas ou tumores produtores de GH que causam quadro clinico de gigantoacromegalia observado em 10 a 15% dos adenomas; adenomas lactotróficos ou que produzem PRL e causam hipogonadismo associadamente ou não à galactorréia, sendo os mais freqüentes; corticotrofinomas ou adenomas produtores de ACTH que causam doença de Cushing e correspondem de 10 a 15% dos

adenomas; tireotrofinomas ou tumores produtores de TSH que causam quadro clínico de hipertireoidismo, sendo os mais raros; gonadotrofinomas ou tumores produtores de LH, FSH ou ambos os hormônios, mas geralmente sem desencadearem manifestação clínica, constituindo parte dos ACNF ou mais raramente causando aumento das gônadas. Os adenomas pluri-hormonais produzem mais de um hormônio e podem ser classificados em monomórficos quando apenas um tipo celular produz mais de um hormônio ou plurimórficos quando apresentam dois ou mais tipos celulares cada um produzindo um único hormônio.

Alguns adenomas hipofisários produzem apenas a subunidade alfa (sub-α) dos hormônios glicoproteícos (LH, FSH e TSH) e não produzem nenhuma alteração clínica característica e constituem parte dos ACNF.

Aproximadamente 1/3 dos adenomas hipofisários não geram síndromes clínicas de hipersecreção hormonal, sendo denominados de ACNF, embora muito freqentemente possa-se demonstrar, com o uso de técnicas imunorreativas, a presença de grânulos de secreção[3]. A ausência de manifestação clínica não é inteiramente esclarecida. Pode resultar de falta de atividade biológica do hormônio ou de falha de sua secreção[6]. Alguns adenomas não manifestam produção de nenhum hormônio com as técnicas de imunorreação disponíveis e são chamados de adenomas "null cell"; correspondem a mais de um terço dos ACNF[11], ocorrem principalmente em homens e mulheres idosos e manifestam-se devido à compressão de estruturas vizinhas à sela turca ou à instalação de hipopituitarismo.

Os adenomas hipofisários podem ocorrer em todas as faixas etárias, mas são mais raros na infância, 3,5 a 8,5% são diagnosticadas antes dos 20 anos. Não há distinção entre os sexos quanto à sua freqüência quando são analisados como um

todo. Os produtores de ACTH que causam doença de Cushing e os prolactinomas são mais comuns em mulheres, enquanto que os ACNF, incluindo-se os "null cell", os oncocitomas e os adenomas gonadotróficos são mais comuns em homens com mais de 40 anos de idade[3].

Os tumores oncocíticos caracterizam-se pela abundante quantidade de mitocôndrias no citoplasma de suas células, que ocupam mais de 50% da área quando habitualmente a área ocupada é cerca de 8%. Alterações oncocíticas podem aparecer em vários tipos de tumores como "null cell" gonadotrofinomas, somatotrofinomas, etc[6].

O diagnóstico de carcinoma hipofisário só é fundamentado quando se diagnosticam metástases à distância. Achados histológicos convencionais de malignidade que ocorrem em outros carcinomas, como pleomorfismo celular e nuclear, hipercromatismo nuclear, aumento da razão nuclear-citoplasma, mitoses, necrose e invasividade das estruturas vizinhas podem ou não ocorrer nos carcinomas hipofisários[6].

2.4. Adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes

Os ACNF constituem um terço dos adenomas hipofisários. Como o próprio nome sugere, não produzem síndrome clínica de hipersecreção hormonal, embora até quase dois terços deles apresentem através de técnicas histomorfológicas ou de biologia molecular, capacidade de produção hormonal, principalmente de gonadotrofinas intactas ou de subunidades dos hormônios glicoproteicos.

Devida à não apresentação de síndrome clínica hormonal, estes tumores são geralmente diagnosticados como macroadenomas, através de sintomas neurológicos

ou neuro-oftalmológicos, muitas vezes de grandes dimensões, com invasão e/ou destruição de estruturas circunvizinhas. Além disso, o hipopituitarismo é comum no diagnóstico, sendo o eixo somatotrófico o mais freqüentemente acometido[12,] O hipopituitarismo pode ser causado pela interrupção do afluxo sanguíneo, pela compressão das células adeno-hipofisárias normais pelo tumor ou pela lesão do hipotálamo causando diminuição dos hormônios estimuladores para a hipófise.

A cirurgia é o tratamento de escolha para estes tumores, geralmente pela via transesfenoidal[13]. O tratamento cirúrgico é eficaz quanto à resolução do quadro compressivo na maioria dos casos. Entretanto, quando há invasão a possibilidade de "cura" cirúrgica é reduzida. Como não há marcador sérico confiável para o seguimento dos pacientes com ACNF, a avaliação do resultado cirúrgico deve ser realizada com exame de imagem, preferencialmente a RM da sela turca.

Uma das controvérsias encontradas no tratamento destes tumores refere-se à indicação pós-operatória da radioterapia. Embora seja tratamento eficaz na prevenção de recidivas, resulta em piora da função hipofisária na maioria dos casos tratados e não é isenta de outros riscos. Desse modo, a maioria dos autores indica a radioterapia apenas para casos em que há restos tumorais identificáveis nos exames de imagem ou, mais ainda, apenas quando o resíduo tumoral apresenta sinais de crescimento[14,15,10]

O prognóstico dos adenomas hipofisários depende do seu comportamento biológico[16]. Há inúmeros fatores a serem considerados quando se avaliam os indicadores prognósticos dos adenomas hipofisários. A remoção cirúrgica total é ainda o mais importante fator prognóstico, principalmente nos ACNF. O grau de invasão destes tumores que dificulta ou impede sua ressecção completa é sem dúvida

o pior fator prognóstico. Tendo em vista que a "cura" cirúrgica é limitada por diversos fatores, incluindo-se a experiência do cirurgião, o estudo de fatores prognósticos torna-se muito importante para o acompanhamento destes pacientes.

O critério de invasão baseado nos achados de imagem, RM ou tomografia computadorizada, é motivo de controvérsias, uma vez que a comprovação cirúrgica da invasão só é possível nos casos com invasão extensa das estruturas vizinhas e a comprovação histológica não necessariamente corresponde aos achados de imagem.

Trabalho publicado pelo grupo da Universidade de Virginia[17] revela que ocorre invasão dural confirmada microscopicamente em 45,5% dos adenomas hipofisários. O grau de invasibilidade dural foi maior quanto maior o diâmetro do tumor e quanto maior a idade do paciente; também foi maior em casos de re-operações e nos ACNF quando comparados com os adenomas secretores. Tumores residuais foram observados mais frequentemente em pacientes com invasão dural, entretanto, a taxa de recorrência não se correlacionou de maneira inequívoca com a invasão dural.

Alguns tipos de adenomas apresentam comportamento mais agressivo que outros como, por exemplo, os tireotropinomas e os "acidofilic stem cell", tumores mistos que produzem preferencialmente PRL, que são mais agressivos e menos responsivos à bromocriptina que os prolactinomas. Entre os adenomas produtores de GH, os granulados densamente, respondem menos à octreotida em comparação aos granulados esparsamente. Os ACNF do tipo ACTH "silent", exibem comportamento mais agressivo[16].

Dentre outros vários fatores que influenciam o prognóstico citam-se: proto-oncogenes, genes de supressão tumoral, apoptose celular, angiogênese, fatores de crescimento, receptores hormonais, etc. As proteínas Ki-67 e p53, conhecidos

marcadores de proliferação celular, também têm sido utilizados no prognóstico dos adenomas hipofisários. Entretanto, nenhum destes fatores isoladamente, pode ser considerado como indicador prognóstico. Ainda não se sabe porque alguns microadenomas permanecem com seu tamanho inalterado e circunscrito enquanto que outros apresentam comportamento agressivo e invasivo, mesmo quando o crescimento do tumor é pequeno e lento, e outros ainda apresentam crescimento como macroadenomas que podem ser apenas expansivos ou ainda invasivos.

A definição de cura nos adenomas funcionantes, embora controversa, está firmada por critérios bem definidos estabelecidos em congressos ou consensos e é baseada na dosagem sérica dos hormônios produzidos e secretados pelos tumores. Em casos de ACNF a única maneira de se avaliar o resultado do tratamento é através de exames de imagem, preferencialmente por RM e, portanto, sujeito a análise interpretativa subjetiva de quem avalia o paciente.

2.5. Bases moleculares da oncogênese hipofisária

Todos os tumores hipofisários são, virtualmente, monoclonais em sua origem. Admite-se que ocorra um defeito intrínseco em uma única célula hipofisária como evento primário na patogênese destes tumores[18]. Entretanto, é provável que hormônios hipotalâmicos, fatores locais de crescimento e hormônios periféricos propiciem ambiente permissivo para mutações celulares e expansão subsequente da célula que sofreu mutação.

Durante a transformação das células pituitárias são observadas disfunções na proliferação celular, diferenciação e produção de hormônios específicos, em que

estão envolvidos eventos moleculares múltiplos que se acumulam independentemente de sua ordem temporal para dar origem ao fenótipo tumoral[19].

2.5.1. Proto-oncogenes

Proto-oncogenes são genes normalmente envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular. Estes genes, quando têm sua expressão aumentada, seja por mutação ou por translocação cromossômica, entre outros mecanismos, passam a ser denominados oncogenes e podem contribuir para a transformação neoplásica.

Ao contrário dos genes supressores tumorais que precisam ter dois alelos com mutação para induzir transformação celular, um único alelo mutante é suficiente para alterar o fenótipo de uma célula de normal para neoplásica e participar na tumorigênese.

2.5.2. Genes de supressão tumoral

Os genes supressores tumorais geralmente codificam proteínas que inibem a proliferação celular. A perda de um ou mais desses genes reguladores contribui para o desenvolvimento de diversos tumores malignos. Cinco classes de proteínas são usualmente reconhecidas por serem codificadas por genes supressores tumorais. São elas:

- Proteínas intracelulares como o inibidor da ciclina-cinase p16, que regula ou inibe a progressão para um estágio específico do ciclo celular;
- Receptores para hormônios secretores, como, por exemplo, o fator de crescimento derivado de tumor β, que age inibindo proliferação celular;

- Proteínas de controle que interrompem o ciclo celular quando o DNA é danificado ou quando a estrutura cromossômica é anormal;
- Proteínas que promovem apoptose;
- Enzimas que participam dos mecanismos reparadores do DNA.

Embora as enzimas de reparo de DNA não atuem diretamente inibindo a proliferação celular, células que perderam a habilidade de reparar erros, falhas ou alterações terminais na cadeia do DNA, acumulam mutações em muitos genes, incluindo aqueles que são críticos no controle do crescimento e proliferação celular. Assim, mutações com perda de função em genes que codificam enzimas de reparo de DNA promovem inativação de outros genes supressores tumorais bem como a ativação de oncogenes.

Em geral, uma cópia de um gene supressor tumoral é suficiente para controlar a proliferação celular. Desta maneira, ambos os alelos de um gene supressor tumoral devem ser perdidos ou inativados para promover o desenvolvimento neoplásico, hipótese elegantemente demonstrada por Knudson em retinoblastomas[20]. Pode-se concluir, portanto, que mutações oncogênicas tipo perda da função deste gene agem recessivamente. Podem ser encontradas deleções ou mutações pontuais em genes supressores que inibem a produção de determinada proteína ou induzem a produção de uma proteína sem função em diversos tumores malignos.

2.5.3. Angiogênese

Em alguns tumores, incluindo-se alguns adenomas hipofisários, foi demonstrado que a angiogênese é diretamente relacionada ao comportamento

biológico, incluindo-se o desenvolvimento de metástases, a pior prognóstico, a menor taxa de sobrevida e a maior ocorrência de invasão e recorrência[21, 22].

A angiogênese é regulada por fatores de crescimento do endotelio vascular. O VEGF[23] ("vascular endotelial growth factor") ou o seu receptor VEGFR-2[24], as MMPs[22,25,26] ("matrix" metalloprotreinases da família das endopeptidases que degradam a matriz extracelular e permitem a angiogênese), o PTTG[27] (gene hipofisário de transformação tumoral, proteína multifuncional implicada no surgimento e perpetuação do crescimento dos adenomas hipofisários, que interrompe a divisão celular e estimula o fator de crescimento fibroblástico FGF-2, mediador da angiogênese), assim como a MVD[28] ("microvessel density", habitualmente medida por IHQ do CD-34 – anticorpo monoclonal seletivo para células endoteliais) são utilizados como marcadores de angiogênese e foram relacionados à invasão tumoral. Entretanto, até o presente momento, os resultados dos estudos não possibilitam conclusões definitivas quanto ao papel da angiogênese no comportamento biológico dos adenomas hipofisários.

2.5.4. Apoptose e genes envolvidos em mecanismos apoptóticos

O termo apoptose foi introduzido por Kerr e colaboradores[29] no início dos anos 70 para definir um tipo de morte celular, distinto da necrose. Apoptose ou morte celular fisiológica ou programada é caracterizada como um conjunto distinto de alterações morfológicas e bioquímicas que incluem a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA internucleossomal e, talvez o mais importante, as alterações na superfície celular que possibilitam o rápido reconhecimento e englobamento das

células apoptóticas pelas células fagocitárias vizinhas, evitando-se a indução de reações patológicas[30].

A apoptose é importante contraponto à mitose na regulação do número de células durante o desenvolvimento, na renovação celular homeostática do individuo adulto e em muitas outras situações como a eliminação de células com danos genômicos ou celulares. A morte celular programada é evento estereotipado que ocorre desde os organismos primitivos multicelulares até os vertebrados, e que sugere que o mecanismo molecular que controla este processo foi preservado durante a evolução[31]. Foram também descritos mecanismos de morte celular, semelhantes à apoptose, em organismos unicelulares.[32]

A apoptose é processo ativo que pode ser deflagrado por amplo espectro de estímulos, tanto intra como extracelulares. É controlada por genes específicos que podem participar de cinco passos sequenciais e distintos, dentre outros:

- a decisão da célula individual de morrer ou viver;
- ativação dos mecanismos de morte celular;
- execução do processo de morte;
- fagocitose da célula moribunda;
- degradação da célula morta.[33]

Os genes que atuam no primeiro passo afetam somente células específicas. Em contraste, genes que atuam nos outros quatro passos afetam todas as células em processo de morte[33].

Nos mamíferos, a morte celular programada, apresenta duas grandes vias:

- via do receptor da morte
- via mitocondrial[34]

Os receptores da morte são localizados na superfície celular e são caracterizados como domínios extracelulares ricos em cisteína e pertencem à família das proteínas dos fatores de necrose tumoral (TNF). Eles transmitem sinais apoptóticos iniciados por ligantes de morte específicos[35].

Alguns genes foram estudados por estarem envolvidos nos mecanismos de apoptose, seja como protetores ou como promotores[30]. A via mitocondrial da apoptose é controlada pela família das proteínas Bcl-2 ("B-cell lymphoma protein 2") que também controla a via extrínseca do receptor da morte. O Bcl-2 é um proto-oncogene descoberto nos linfomas não Hodgkin humanos que produz a proteína Bcl-2 (BCL-2), cuja função biológica é a de suprimir a morte celular programada, (apoptose) induzida por vários estímulos[36,37,38,39,40,41,42]. Sua eficácia é proporcional ao nível de expressão protéica. Acredita-se que a prevenção decorre da supressão da peroxidação lipídica[43].

A expressão da BCL-2 apresenta relação inversa ao grau de malignidade em casos de glioma (os gliomas de baixo grau expressam mais a proteína que os astrocitomas anaplásicos e glioblastomas)[44]. O proto-oncogene Bcl-2 que codifica a proteína BCL-2 inibidora da apoptose poderia estar implicado tanto na tumorigênese como na progressão e sobrevida das células tumorais. Foram identificadas mais de duas dúzias de proteínas da família Bcl-2. Estas podem ser divididas, baseando-se na função e similaridade de seqüência de aminoácidos em três subfamílias: a subfamília anti-apoptose, representada pelo Bcl-2/Bcl-xL que inibe a morte celular programada por distintos mecanismos, como prevenção da liberação de proteínas mitocondriais e as duas subfamílias pró-apoptóticas representadas pela Bax/Bak (Bcl-2 "associated protein" X) e Bid/Bim[30].

Praticamente todos os estímulos desencadeiam a apoptose via ação das caspases, grupo de enzimas proteolíticas ("cystenil aspartate specific proteases") sintetizadas como pró-enzimas inativas[45]. Foram descritas 11 caspases humanas, até o momento. As caspases dos mamíferos podem ser divididas em duas grandes famílias:

- com papel central na apoptose (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 e 12)
- relacionadas à caspase 1 no processamento das citoquinas (caspases 1, 4, 5 e 11).

As caspases envolvidas na apoptose podem ser subdivididas em via ascendente – iniciadoras e via descendentes – efetoras, de acordo com o comprimento dos seus predomínios. Caspases longas (2, 8, 9 e 10) atuam mais como iniciadoras e caspases curtas (3, 6 e 7) são efetoras[45].

A ativação e o controle da cascata das caspases são essenciais para diversos processos celulares envolvidos na homeostasia e diferenciação celular. Consequentemente, o controle da atividade das caspases apresenta grande potencial terapêutico. Na figura 2 representam-se, de modo esquemático, as possíveis vias e os mecanismos apoptóticos.

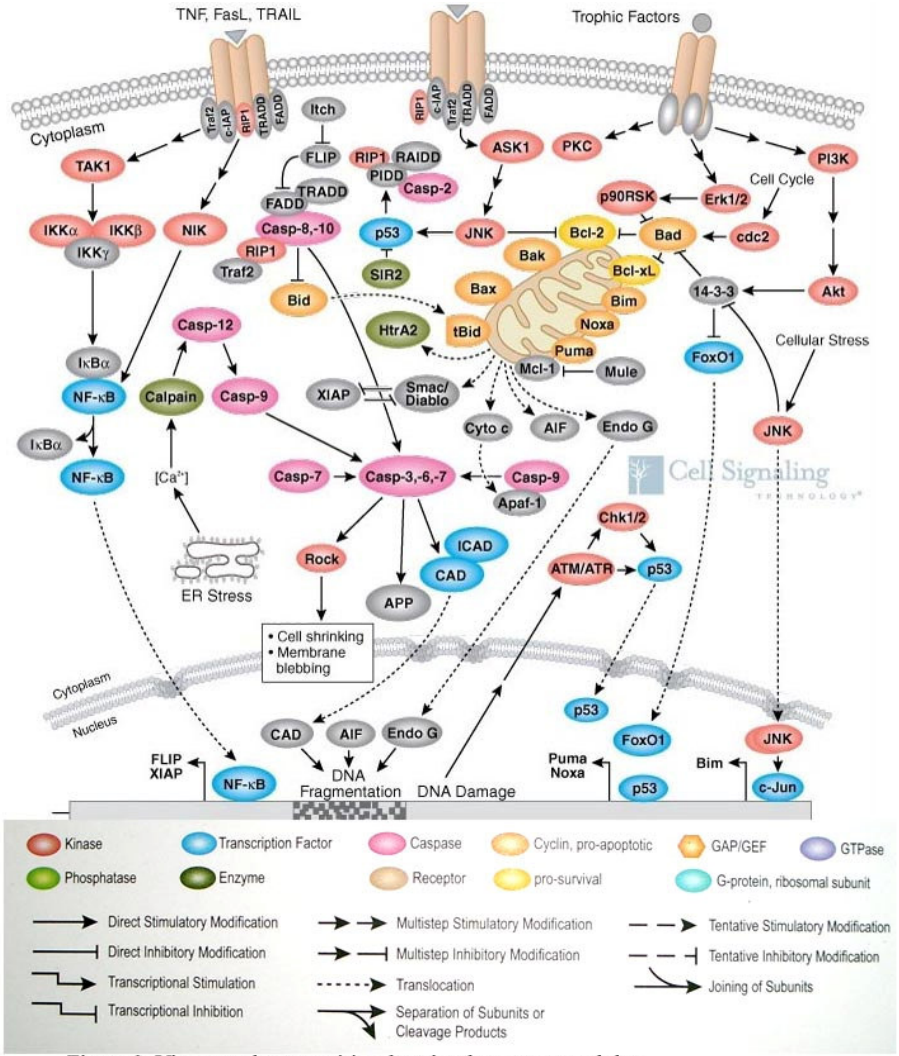


Figura 2. Visão geral esquemática das vias de apoptose celular
(Figura obtida no site: http://www.cellsignal.com/pathways/apoptosis-signaling.jsp)

As proteínas inibidoras da apoptose são proteínas celulares que atuam regulando a cascata das caspases. Inibem as caspases iniciadoras e as efetoras e influenciam a morte celular. A primeira proteína inibidora da apoptose dos mamíferos a ser identificada foi a proteína inibidora da apoptose neuronal.

O processo de apoptose é influenciado por proteínas pró e anti-apoptóticas nos seus múltiplos passos. O equilíbrio entre a cascata das caspases, indutoras da morte celular, e as proteínas inibidoras da apoptose constituem ponto fundamental neste processo.

A apoptose foi pouco estudada nos adenomas hipofisários em geral. Alguns autores avaliaram as proteínas Bcl-2 (BCL-2) e Bax relacionadas à apoptose com o uso de técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) e observaram expressão diferenciada destas proteínas nos ACNF em relação aos adenomas funcionantes e concluíram que estas proteínas podem estar relacionadas à função hormonal e ao controle do crescimento do tumor[46,47].

O estudo dos genes envolvidos na apoptose destes tumores pode fornecer um marcador de comportamento tumoral confiável e, por sua vez, utilizável para estabelecer o prognóstico dos pacientes. Inúmeros genes e proteínas estão envolvidos nas vias da apoptose. Optou-se pelo estudo da caspase 3, uma vez que é a via final comum de quase todas vias apoptóticas, além do Bcl-2 e do Bax que atuam como anti e pró-apoptóticos, respectivamente, pois participam da via mitocondrial da apoptose. Algumas publicações baseadas na IHQ sugeriram sua atuação na evolução dos tumores hipofisários[46,47].

Estes dados relatados e comentados acima justificam o estudo dos genes Bcl-2, Bax e caspase 3, envolvidos no processo apoptótico, nos ACNFs para avaliar-se seu potencial como marcador de comportamento tumoral.

3. OBJETIVOS

Foram objetivos do presente estudo:

1. Analisar a expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, Bax e caspase-3 nos ACNF

2. Avaliar a potencialidade destes genes de atuar como marcadores do comportamento tumoral.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HCFMUSP.

No período de 28/05/2008 a 07/04/2009 foram operados na Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP, 119 dos pacientes com tumor da região selar, assim representados: 21 com acromegalia, 16 com prolactinoma, 16 com doença de Cushing, cinco com cordoma, cinco com craniofaringeoma, um com carcinoma metastático e 50 com ACNF.

Foram avaliados prospectivamente 30 dos pacientes com ACNF originários da própria Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP.

Todos os pacientes selecionados ou seus representantes legais assinaram o termo de consentimento pós-informado após terem sido devidamente instruídos quanto às finalidades da pesquisa, os riscos envolvidos e os conseqüentes benefícios científicos dela resultantes.

4.2. Metodologia

4.2.1. Análise clínica

Características demográficas, função hipofisária no momento do diagnóstico, sinais e sintomas e sua duração foram descritos.

4.2.2. Avaliação por Imagem

Todos pacientes realizaram RM da região hipofisária e suas vizinhanças e do encéfalo e seus envoltórios, com imagens ponderadas em T1, antes e após a administração de contraste paramagnético gadolíneo e em T2, com cortes coronais e sagitais. As dimensões do tumor foram avaliadas de acordo com as medidas máximas no eixo ântero-posterior (AP), crânio-caudal (CC), látero-lateral (LL) e no maior diâmetro (diagonal ou não), sendo o volume do tumor calculado de acordo com a fórmula: (AP x CC x LL) x 0,5[48]. Expansão do tumor foi avaliada de acordo com a sua extensão, quando presente, para o SC, seio esfenoidal, região suprasselar, fossa média, tanto na linha média como fora dela.

A avaliação de invasão de SC foi realizada com a análise das imagens coronais da RM após infusão intravenosa de contraste. Considerou-se como invasão de SC quando: mais de 67% do diâmetro da artéria carótida interna estava envolvido pelo tumor ou quando o envolvimento era maior que 50% e havia apagamento do sulco venoso carotídeo e/ou expansão até linha carotídea lateral[49,50] (figura 3).

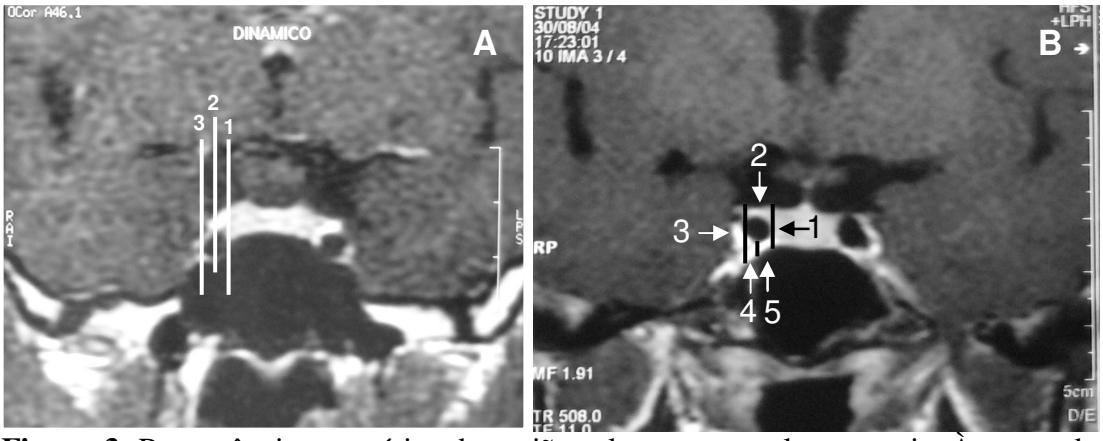


Figura 3. Ressonância magnética da região selar em controles normais. À esquerda (A) as linhas intercarotídeas: 1-interna ou medial, 2-mediana, 3-lateral. À direita (B) as linhas dividem o seio cavernoso em 5 compartimentos venosos: medial (1), superior (2), lateral (3), ínferolateral (4) e sulcocarotídeo (5).

4.2.3. Avaliação intra-operatória

Todos os pacientes foram operados pelos mesmos cirurgiões.

O acesso transesfenoidal, ou "via baixa", é a via mais utilizada para os tumores hipofisários. Foi realizado por técnica microcirúrgica submucosa, endonasal, conforme detalhamento descrito a seguir. Os doentes são operados sob anestesia geral, com a cânula de entubação orotraqueal fixada no canto esquerdo da boca, acesso venoso central de triplo lúmen, monitorização invasiva da pressão arterial, conforme normas da Associação Americana de Anestesia. O decúbito dos doentes durante o ato operatório é dorsal horizontal, com a cabeceira elevada em ângulo de 15 graus, aproximadamente. A cabeça é mantida em posição ortogonal, porém lateralizada para a esquerda, de tal maneira que facilite o acesso à narina direita pelo cirurgião. Após a assepsia das narinas e cavidade nasal com líquido degermante é efetuada infiltração da mucosa à direita do septo nasal que a seguir é seccionada e descolada do mesmo. O septo nasal é então fraturado próximo à sua base para a esquerda; em seguida é introduzido o espéculo autostático, envolto por fragmento tubular de dreno de Penrose, sob visão radioscópica para que o mesmo seja locado na altura adequada que facilite o acesso ao seio esfenoidal. O espéculo é aberto de tal forma que as pás do mesmo afastem a mucosa direita do septo para um lado e o septo para o lado contralateral, o que permite que a quilha do vômer fique no centro do campo de visão. Os óstios do seio esfenoidal são expostos e em seguida é efetuada a abertura do soalho do seio esfenoidal. Neste momento é de fundamental importância a avaliação da existência de septos horizontais ou verticais, que devem ser removidos para que toda extensão da sela turca seja exposta. A mucosa do seio esfenoidal é

removida, lavada com soro fisiológico e conservada em água oxigenada para ser utilizada na reconstrução do soalho selar. Antes da abertura do soalho selar, feita com auxilio de ¨drill¨ e ¨Kerrison¨ procede-se à lavagem do seio esfenoidal com água oxigenada e soro fisiológico para degermação e hemostasia. Após abertura do soalho selar que permita exposição ampla da duramater da sela, a mesma é coagulada e aberta em xis ou em janela. A remoção do tumor é efetuada com curetas e fragmentos do mesmo são colocados, em condições estéreis, em frasco com formol para análise histológica e em tubo de polipropileno estéril para congelamento em nitrogênio líquido e ulterior análise molecular. Após remoção do tumor e hemostasia adequada é efetuada inspeção com endoscópio rígido com lentes de 0 e 30 graus para avaliação da persistência de resíduos tumorais. O soalho selar é refeito com prótese porosa, quando disponível, fixada com cola biológica. Nos doentes com débito liquórico intra-operatório, é realizada a oclusão da abertura dural com fragmento de mucosa do seio esfenoidal ou com retalho da mucosa lateral direita do septo rodado para o interior da sela (retalho pediculado), em ambas situações a mucosa é aderida à dura máter com cola biológica. Após a retirada do espéculo a mucosa nasal é suturada com um ou dois pontos de fio reabsorvível e ambas as narinas são tamponadas por 24 horas por cornetos.

O acesso por craniotomia pterional, ou “via alta” é exceção para os doentes com adenomas hipofisários e é realizado do modo classicamente descrito em livros de texto de neurocirurgia. O acesso é realizado pelo lado que o doente apresente maior comprometimento visual. Quando a visão é simétrica, o acesso é feito preferencialmente pelo lado direito do doente ou pelo lado de maior expansão lateral do tumor.

A impressão do cirurgião quanto à presença de lesão intrasselar e/ou extrasselar, destruição óssea e consistência do tumor foi relatada.

4.2.4. Análise histológica diagnóstica

O exame anátomo-patológico de todos os tumores foi realizado rotineiramente pelo mesmo patologista no Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP. O tecido foi corado com hematoxilina-eosina para diagnosticar o tumor e foram realizadas análise de IHQ para avaliar-se a presença dos hormônios hipofisários GH, PRL, LH, FSH, TSH e ACTH.

4.2.5. Análise imuno-histoquímica das proteínas Ki-67, p53 e Bcl-2

As proteínas Ki-67, p53 e Bcl-2 foram estudadas por IHQ utilizando-se a reação de imunoperoxidase, pelo mesmo patologista na Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP. Foi seguido o seguinte protocolo de procedimentos: a) desparafinização (a quente) em xilol a 60ºC durante 30 minutos; b) desparafinização (a frio) em xilol à temperatura ambiente durante 10 minutos; c) hidratação dos cortes em álcool absoluto (duas vezes); álcool a 95%(duas vezes); álcool a 75%; seguida de lavagem em água corrente e destilada; d) cinco banhos com água oxigenada a 6% (20 volumes), com duração de cinco minutos cada um para bloqueio da peroxidase endógena; e) pré-tratamento com solução 0,01M de ácido cítrico, pH 6,0 em panela de pressão com duração de cinco minutos, lavagem em água corrente/destilada e em tampão PBS (tres vezes) para recuperação dos antígenos por calor; f) incubação com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina a 1%

e em PBS em câmara úmida durante 18 horas ("overnight") a 4ºC, seguindo-se lavagem em tampão PBS (três vezes); g)Incubação com o anticorpo secundário conjugado com polímero (Novolink - Novocastra) durante 30 minutos a 37ºC, seguindo-se lavagem com tampão PBS (três vezes); h)Revelação com substrato cromogênico (diaminobenzidina a 60 mg% em PBS + 1,5 ml de água oxigenada a 20 vol) durante cinco minutos (a 37ºC), seguindo-se lavagem em água corrente e destilada; i) contracoloração (leve) em hematoxilina (Harrys), seguindo-se lavagem em água corrente e destilada; j) desidratação dos cortes em álcool a 75%; álcool a 95% (duas vezes); álcool absoluto (duas vezes) e Xilol (tres vezes); k) montagem em lamínula e Entellan e identificação das lâminas.

4.2.6. Análise molecular

Os tumores foram coletados a fresco em condições estéreis durante o ato operatório e colocados imediatamente em tubo de polipropileno estéril para congelamento. Os tumores ficaram congelados em nitrogênio líquido e armazenados para uso posterior.

A análise molecular foi processada no Laboratório de Patologia Cardiovascular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, LIM-22.

4.2.6.1. Extração e quantificação do ácido ribonucléico (RNA)

O RNA total foi isolado utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, os tecidos tumorais foram homogeneizados (Tissue Tearor, model 985-370, Biospec Products, Inc, Racine, WI) na proporção de 50-100 mg de tecido para 1000 µl de Trizol em

tubos plásticos, onde permaneceram durante cinco minutos, à temperatura ambiente, para permitir a dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas. Foram adicionados a seguir 200µL de clorofórmio (Merck S.A. Indústrias Químicas) e os tubos foram homogeneizados por inversão e deixados à temperatura ambiente durante dois minutos seguindo-se de centrifugação durante 15 minutos a 12.000 x g a 4°C. Este procedimento resultou em três fases: a fase aquosa onde estaria o RNA, a interface que conteria proteínas e DNA e por fim a fase com o fenol/clorofórmio. Após a transferência da fase aquosa para um tubo novo, foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico (Merck S.A. Industrias Químicas) para a precipitação do RNA. Este foi incubado durante 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir os tubos foram centrifugados a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi então lavado com etanol 75% (Merck S.A. Industrias Químicas) e centrifugado a 7500 x g durante cinco minutos a 4°C. Após a completa evaporação do álcool o RNA foi dissolvido em 50 µl de DEPC "treated water" (Invitrogen, Carlsbad, CA) e incubados durante 10 minutos a 60°C para completa dissolução do RNA. A seguir o material foi estocado a - 80°C.

A concentração e o grau de pureza do material foram estimados com a leitura em espectrofotometro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Delaware, EUA). A integridade dessas amostras foi analisada utilizando-se o RNA 6000 Nano LabChip Kit e Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). O grau de pureza foi avaliado de acordo com a relação 260/280 nM, que deve ser próxima de dois para ácidos nucléicos.

4.2.6.2. Síntese de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA)

Foi utilizado o equivalente a 1µg do RNA total na reação de transcrição reversa, aos quais acrescentaram-se 1µL de Oligo dT 500 µg/mL (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 µL de dNTP mix 10 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água DEPC (volume final igual a 12µL). A mistura foi aquecida a 65°C durante cinco minutos e rapidamente esfriada em gelo. Após breve centrifugação, adicionaram-se 4 µL do tampão "first-strand" (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 µL de DTT 0,1M e 1µL de RNaseOUT (Recombinant RNase Inhibitor, Invitrogen, Carlsbad, CA). Essa solução foi cuidadosamente homogeneizada. A seguir foi adicionado 1 µL da enzima Superscript II *RT* (200 U/µL, Invitrogen, Carlsbad, CA) sendo realizada incubação do material durante 50 minutos a 42°C. A reação foi inativada a 70°C durante 15 minutos e armazenada a - 20°C até o momento do uso.

4.2.6.3. Análise da expressão

A avaliação da expressão do RNAm dos genes de interesse foi mensurado por RT-PCR em tempo real com o uso de ensaios TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que contem "primers" e sondas específicos para cada gene (Anexo A) e realizado em aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a reação foram utilizados 10µL de Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 1µL de cada ensaio (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 2µL de cDNA e 7µL de água. As amostras foram amplificadas com uma desnaturação inicial de 95ºC durante 10 minutos e 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante um minuto.

A quantificação de cada amostra foi realizada em triplicatas, sendo que a expressão de cada RNAm foi normalizada em relação à expressão do gene endógeno GAPDH (Human GAPD Endogenous Control, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Foi utilizado um "pool" comercial de RNA de hipófise normal (Clontech, Palo Alto, CA) como calibrador. Este consiste da mistura de RNA poli A proveniente de 20 indivíduos adultos. A quantificação relativa foi realizada com o método "threshold cycle" (C_T), conforme descrita por Livak e Schmittgen[51] que resumimos seguir.

Para comparar a eficiência de amplificação dos genes, subtraiu-se os valores de C_T do gene alvo dos valores de C_T do gene GAPDH. A diferença foi plotada contra o logaritmo da quantidade da amostra inicialmente colocada. Sendo a inclinação da reta ou o "slope" menor que 0,1, a eficiência de amplificação foi considerada comparável. Assim, pode-se utilizar o método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$. Método $2^{-\Delta\Delta CT}$: Calculou-se inicialmente o ΔC_T de cada amostra, inclusive o do gene referência ou calibrador (hipófise normal, no nosso caso) subtraindo-se os valores de C_T do gene alvo dos valores de C_T do gene controle (GAPDH). Em seguida, determinou-se o $\Delta\Delta C_T$, com o uso da seguinte fórmula: [ΔC_T (amostra) – ΔC_T (tecido normal)]. Para o tecido normal este valor torna-se igual a zero. Uma vez determinado o $\Delta\Delta C_T$, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ [51]. A partir dela obteve-se a quantificação relativa (QR).

4.2.7. Análise estatística

Foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman como medida da correlação entre variáveis quantitativas. A avaliação da existência de associação

entre as variáveis quantitativas (volume e QR) e os marcadores qualitativos foi feita por meio do teste de Kruskal-Wallis e pelo Mann-Whitney. A avaliação da associação das variáveis categóricas foi feita com o uso do teste exato de Fisher.

Nos testes de hipótese foi fixado nível de significância de 0,05.

A análise foi realizada com o auxílio dos aplicativos SPSS e Minitab.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização clínica da amostra dos pacientes

A amostra foi composta de 30 indivíduos sendo 17 (56,7%) do sexo masculino e 13 (43,3%) do feminino. Estatísticas descritivas para a idade, número de eixos hipofisários com produção hormonal deficiente e duração dos sintomas estão apresentadas na tabela 1. As características individuais para cada paciente estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 1. Estatísticas descritivas para a idade, tempo dos sintomas e número de deficiências

	n	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo
idade (anos)	30	53	14,5	16	54,5	82
duração dos sintomas (meses)	28	40,6	47,4	0	31	216
número de eixos com deficiências hormonais	26	2,5	1,4	0	2,5	4

n= número de pacientes avaliados

A distribuição das idades dos pacientes está apresentada graficamente na figura 4. O valor de 16 anos é discrepante em relação aos demais.

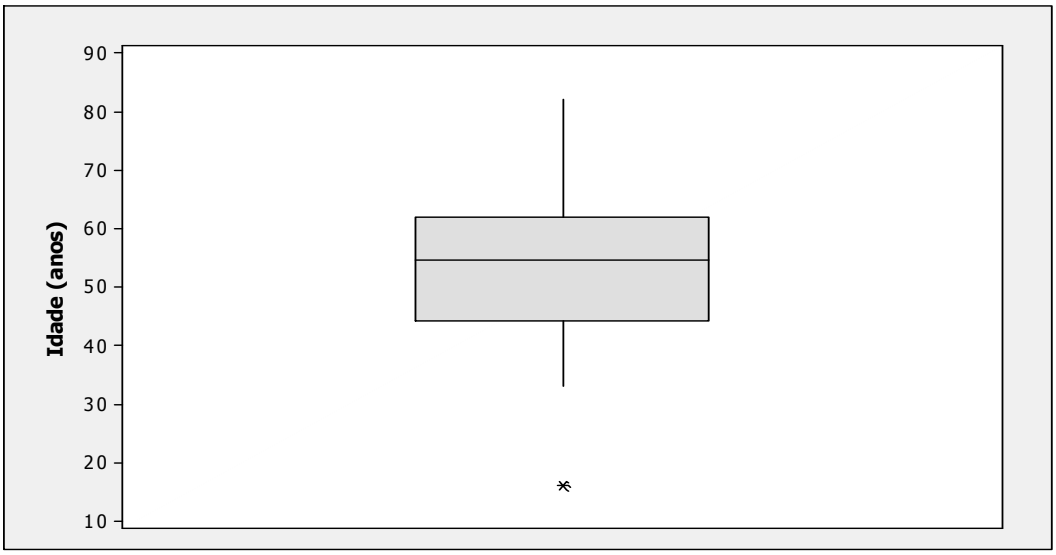


Figura 4. "Box-plots" para a idade (intervalo interquartil:50% dos pacientes estão contidos na caixa)

Tabela 2 . Características dos pacientes estudados

no.	*iniciais*	*sexo*	*idade*	*Sinais e sintomas ao diagnóstico*	*tempo de história (meses)*	*cirurgia prévia*	*hipopituitarismo ao diagnóstico*	*basal elevado*
1	AMJ	F	37	amenorréia, galactorréia e cefaléia	36	não	GH, Gn	
2	ALM	M	37	perda visual, cefaléia, redução da potência e libido	12	não	Gn	
3	ASN	M	55	perda visual, cefaléia, convulsão e confusão mental	36	não	GH, Gn, ACTH, TSH	
4	ACB	M	33	perda visual com cegueira à E, cefaléia e redução de libido	18	não	GH, Gn, ACTH, TSH	
5	EML	F	49	perda visual e amenorréia	36	não	Gn	
6	ERS	F	60	esquecimento e convulsão	12	não	na	
7	GAP	M	53	perda visual até cegueira bilateral	60	sim	GH, Gn, ACTH, TSH	FSH
8	GJS	M	46	perda visual e cefaléia	216	não	GH, Gn, ACTH, TSH	
9	JAA	M	49	perda visual	6	não	GH, Gn, ACTH, TSH	
10	JAS	M	39	perda visual, cefaléia e redução da libido	8	não	GH, Gn, ACTH, TSH	
11	JBA	M	82	apatia e episódio de perda consciência	5	não	GH, Gn, ACTH, TSH	
12	JGS	M	54	perda visual e impotência	48	não	GH, Gn, ACTH	
13	JPS	M	78	perda visual e cefaléia	48	não	na	FSH
14	JPL	M	59	perda visual e cefaléia	8	não	GH, Gn	
15	JF	M	37	perda visual		não	não	
16	MAS	F	56	perda visual com cegueira à D, cefaléia e amenorréia	120	sim	Gn	
17	MBS	F	55	perda visual e cefaléia	24	não	Gn	
18	MIA	F	46	perda visual e cefaléia		sim	na	
19	MLC	F	59	perda visual	48	sim	GH, Gn	
20	MPS	F	66	perda visual com cegueira à E	36	não	GH Gn, ACTH, TSH	
21	MTN	F	67	perda visual	36	não	na	
22	MVG	F	70	achado incidental	0	não	Gn	
23	MA	F	51	perda visual com cegueira à E, cefaléia e amenorréia	36	sim	não	
24	PCO	M	61	perda visual e cefaléia	14	não	Gn	
25	RDL	M	16	perda visual, cefaléia e rebaixamento nível consciência	11	não	GH, Gn	
26	SFO	M	65	perda visual e cefaléia	9	não	GH, Gn, ACTH, TSH	
27	SFJ	M	56	perda visual redução de libido e potência	24	não	GH, Gn, ACTH	FSH
28	SLS	M	47	perda visual	60	sim	Gn	TSH
29	TMS	F	72	perda visual com cegueira à E, convulsão e sonolência	144	sim	GH, Gn, ACTH, TSH	
30	ZML	F	35	perda visual, cefaléia, amenorréia e galactorréia	36	sim	Gn	

Gn:gonadotrofinas (LH, FSH) na: não acessível

Todos pacientes apresentavam macroadenoma. O diagnóstico foi realizado porque apresentavam sintomas relacionados ao efeito compressivo do tumor exceto para o caso #22) em que o achado foi incidental. Havia déficit visual por compressão de quiasma e/ou vias ópticas em 26 dos pacientes (87%), cefaléia em 16 (53%), sintomas relativos ao hipogonadismo em 10 (33%) e sintomas neurológicos específicos como convulsão e alteração do estado da consciência em cinco (17%).

Havia deficiência dos hormônios hipofisários, em graus variáveis, em 24 de 26 pacientes (92%) em que a avaliação hormonal foi acessível. Na figura 5 apresenta-se a distribuição dos pacientes em relação ao número de eixos hipofisários com deficiência hormonal.

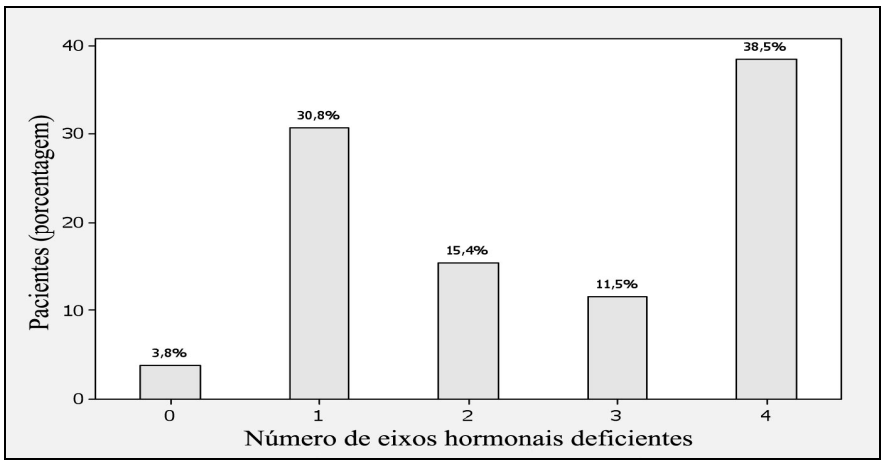


Figura 5. Distribuição dos pacientes (percentual) em relação ao número de eixos hipofisários com deficiência hormonal.

Embora assintomáticos clinicamente, foi constatado nível sérico inapropriadamente normal ou elevado em quatro pacientes, sendo três com FSH alterado e um com TSH normal e concentração sérica de T4 livre aumentada (tabela 2).

5.2. Achados dos Exames de Imagem

A tabela 3 apresenta as características do tumor identificadas no exame de RM.

Tabela 3. Dados relativos à imagem do tumor obtidos por ressonância magnética

no.	iniciais	AP (cm)	CC (cm)	LL (cm)	volume (cm^3)	maior diâmetro (cm)	expansão fora da linha média	ESC	ESE	ESS	invasão óssea
1	AMJ	1,9	2,9	1,9	5,23	2,9		não	não	sim	não
2	ALM	3,0	3,6	3,4	18,36	4		sim	não	sim	não
3	ASN	8,3	8,8	7	255,64	9,6	frontal e temporal	não	sim	sim	sim
4	ACB	1,5	2,5	1,6	3,00	2,5		não	sim	sim	não
5	EML	2,3	2,5	2,4	6,90	2,5		duvidosa	não	sim	não
6	ERS	4,2	4,1	5,2	44,77	6,9	temporal	sim	sim	sim	sim
7	GAP	4,8	6,2	6,1	90,77	6,5		sim	sim	sim	sim
8	GJS	4,4	6,7	4,4	64,86	7,3	frontal	sim	sim	sim	sim
9	JAA	2,2	3,4	3	11,22	4		sim	não	sim	não
10	JAS	3,3	4,7	4,4	34,12	4,9		duvidosa	sim	sim	sim
11	JBA	1,7	1,9	1,8	2,91	1,9		não	não	sim	duvidosa
12	JGS	2,5	3,2	2,9	11,60	3,6	frontal	não	não	sim	não
13	JPS	3,0	4,0	3,3	19,80	4		sim	sim	sim	sim
14	JPL	2,0	2,4	2,4	5,76	2,9		não	não	sim	não
15	JF	2,8	3,3	3,7	17,09	3,7		sim	não	sim	sim
16	MAS	2,4	3,5	2,8	11,76	3,5		não	sim	sim	sim
17	MBS	1,7	2,3	2,3	4,50	2,4		não	não	sim	não
18	MIA	2,7	2,5	3,0	10,13	2,7	temporal e cisterna pré pontina	sim	não	sim	não
19	MLC	2,2	2,5	2,5	6,88	2,5		não	não	sim	não
20	MPS	2,8	3,4	2,4	11,42	3,8	frontal e temporal	duvidosa	não	sim	não
21	MTN	1,7						não	não	sim	não
22	MVG	2,8	2,0	2,4	6,72	2,8		não	não	não	não
23	MA	4,5	4,3	3,5	33,86	5,4	frontal e temporal	sim	sim	sim	não
24	PCO	3,0	4,5	3,5	23,63	4,5		duvidosa	não	sim	não
25	RDL	4,8	5,6	5,0	67,20	5,9	frontal com hidrocefalia	sim	sim	sim	sim
26	SFO	2,0	4,4	2,2	9,68	4,6		não	sim	sim	sim
27	SFJ	3,5	4,2	3,0	22,05	4,3		duvidosa	não	sim	não
28	SLS	2,0	3,0	2,8	8,40	3,5	fissura sylviana	duvidosa	não	sim	não
29	TMS	5,6	5,6	3,6	56,45	5,6	cisterna interpeduncular e fissura sylviana	sim	sim	sim	sim
30	ZML	2,1	1,4	1,8	2,65	2,1		sim	não	sim	não

AP: antero-posterior CC: crânio-caudal LL: látero-lateral ESC: expansão para seio cavernoso ESE: expansão para seio esfenoidal ESS: expansão suprasselar

Na tabela 4 são apresentados os valores das estatísticas descritivas para os marcadores quantitativos: volume do tumor, seu maior diâmetro e a soma dos seus diâmetros (AP+CC+LL). Na tabela 5 apresentam-se as freqüências de invasão e expansão do tumor para o SC, seio esfenoidal ou osso. As figuras 6 e 7 ilustram medidas dos diâmetros do tumor de dois pacientes. As figuras 8 e 9 demonstram a avaliação de invasão do SC por RM exemplificada em dois pacientes, no pré-operatório, com invasão confirmada de SC (fig.8A) ou duvidosa que não foi confirmada pela cirurgia (fig. 9A).

Tabela 4. Estatísticas descritivas das medidas do tumor

medida	n	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo
Volume (cm^3)	29	29,9	48,9	2,7	11,6	255,6
Maior diâmetro (cm)	29	4,2	1,8	1,9	3,8	9,6
AP+CC+LL (cm)	29	10,1	4,2	5,3	8,6	24,1

n= número de pacientes avaliados

Tabela 5- Número de casos e percentagens de ocorrência ou não de invasão e expansão do tumor, constatados pelo exame de RM e consistência do tumor observada durante a cirurgia

Marcador	Não		Sim		duvidosa	
	n	%	n	%	n	%
Seio cavernoso	12	40	12	40	6	20
Seio esfenoidal	18	60	12	40	0	0
Expansão suprasselar	1	3	29	97	0	0
Invasão óssea	18	60	11	37	1	3
Tumor mole	4	13	26	87	0	0

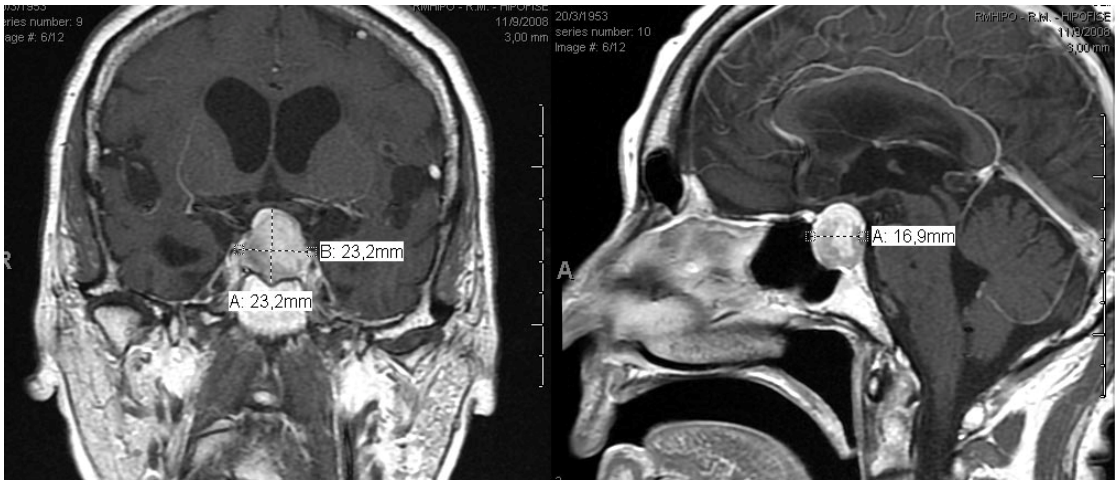


Figura 6. Imagem do paciente #17 com as medidas do tumor

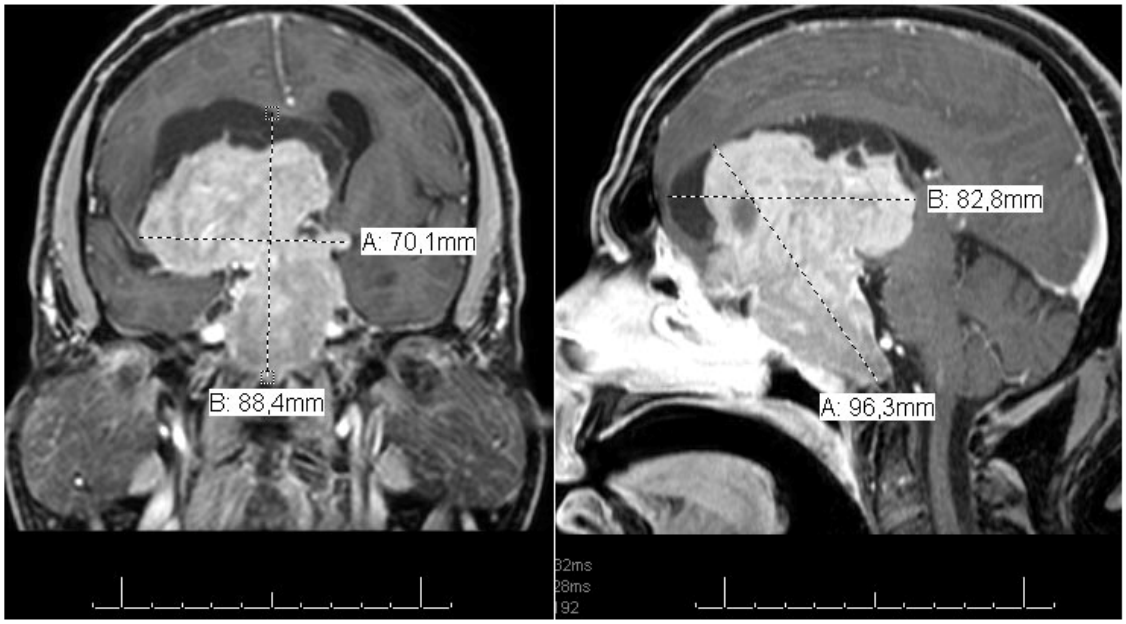


Figura 7. Imagem do paciente #3 com as medida do tumor

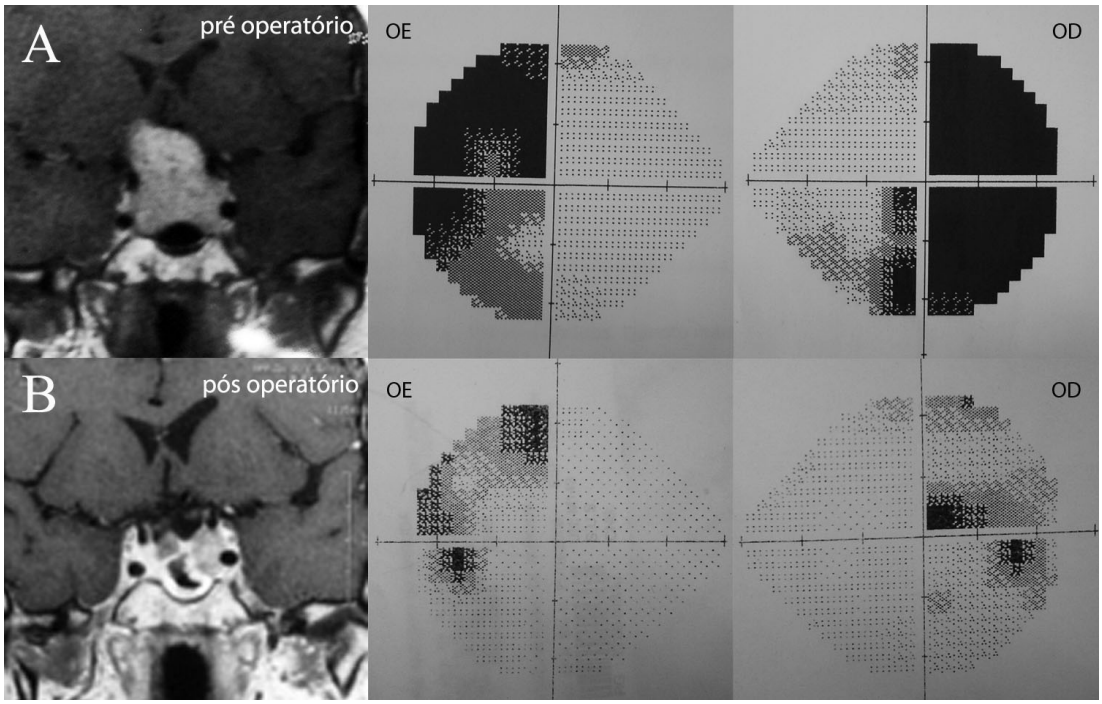


Figura8. Imagens de RM (à esquerda) em cortes coronais com contraste do paciente #9 mostrando no pré-operatório (A) tumor selar e suprasselar com compressão de vias ópticas (hemianopsia bitemporal nas imagens de campos visuais à direita da figura) e invasão do seio cavernoso esquerdo. No pós-operatório (B) restos tumorais no seio cavernoso esquerdo, com quiasma livre compatível com a melhora observada na campimetria (imagens inferiores à direita da figura).

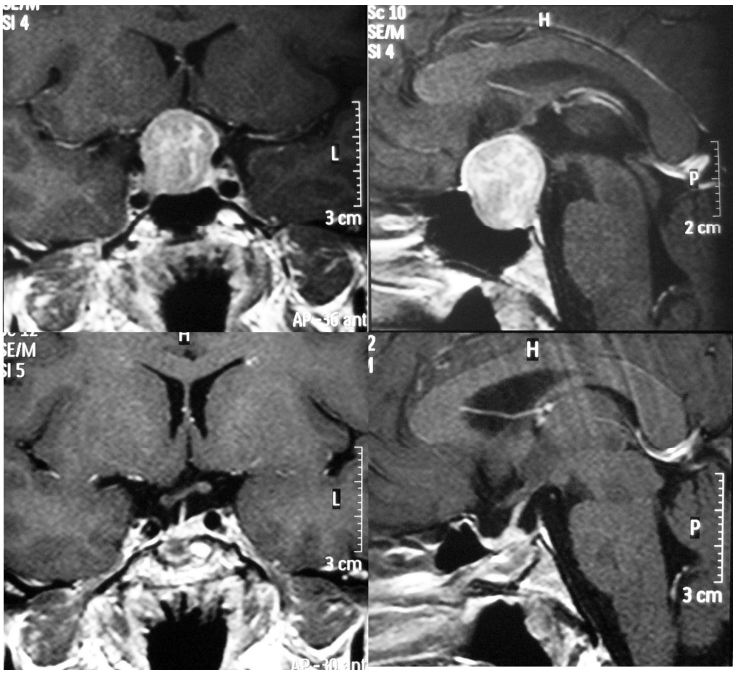


Figura 9. Imagens de RM em cortes coronais e sagitais com contraste da paciente #5 mostrando no pré-operatório (superior) tumor selar e suprasselar com compressão de vias ópticas e duvidosa invasão do seio cavernoso esquerdo. No pós- operatório (inferior) ressecção completa sem tumor residual visível.

Na figura 10 apresenta-se os "box-plots" para as variáveis relacionadas às dimensões dos tumores. Percebe-se que existem valores discrepantes de dois tumores para o volume e para um tumor no maior diâmetro e na soma dos diâmetros.

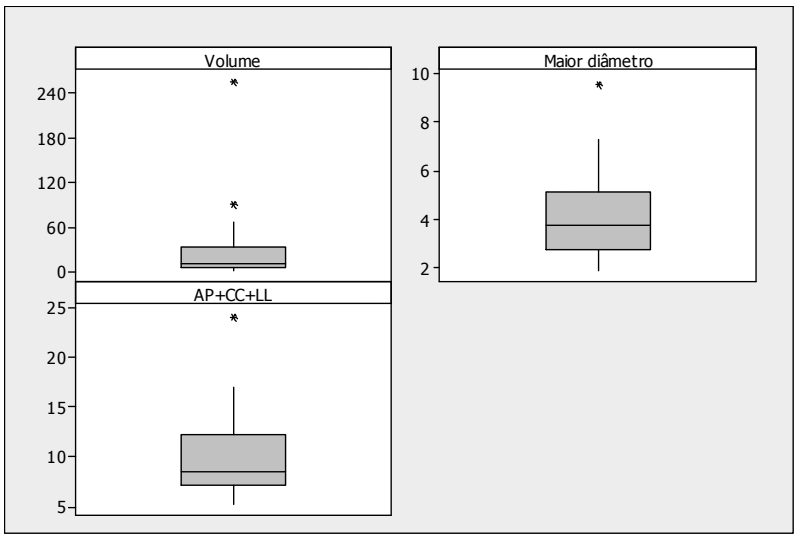


Figura 10. "Box-plots" para as dimensões do tumor: volume (cm^3), maior diâmetro (cm) e soma dos diâmetros, ânterop-osterior, crânio-caudal e látero-lateral (cm)

5.3. Achados intra e pós-operatórios

Todas as cirurgias foram realizadas utilizando-se a via transesfenoidal, exceto em uma paciente (caso #6) que apresentava convulsão tônico-clônica generalizada, devido a tumor com grande expansão sólido cística para a região temporal esquerda que foi operada por via fronto-temporal esquerda. Na tabela 6 apresentam-se os dados operatórios de cada paciente.

Foi constatado tumor mole e aspirável em 26 dos 30 casos (87%).

Ocorreram complicações cirúrgicas pós-operatórias em cinco dos casos: três fístulas de líquido cefalorraquidiano (10%), dois casos de meningite (6,7%) e dois óbitos (6,7%). Um óbito decorreu de meningite (#4) e outro em paciente (#29) internada com histórico de duas cirurgias realizadas previamente em outro serviço, cega em olho esquerdo, apresentando convulsões, sonolência, bloqueio atrioventricular de primeiro grau e púrpura e apresentou complicações clínicas graves no período pós-operatório que culminaram em choque séptico e morte.

5.4. Resultados do exame histológico diagnóstico

O adenoma hipofisário foi confirmado no exame histológico em todos os pacientes. Na tabela 6 apresentam-se os resultados dos exame pela IHQ para pesquisa dos hormônios hipofisários nos tumores em cada doente. Em 18 destes (60%) a IHQ foi negativa ("null cell") para todos antígenos estudados (GH, ACTH, LH, FSH, TSH e PRL). Nos demais 12 casos (40%) havia células positivas de um ou mais hormônios. O TSH foi o mais prevalente, estando presente isoladamente ou associadamente a outros hormônios glicoproteicos (LH e FSH). Em um caso constatou-se positividade para o GH e, em outro, para o ACTH, ambos sem manifestação clínica ou sérica de hiperfunção. Foi observada IHQ negativa em um

paciente com nível inapropriadamente elevado de FSH. Nos outros dois casos em que o FSH estava alterado e no caso com o TSH elevado inapropriadamente, a IHQ confirmou a presença destes hormônios embora focal em menos de 10% das células.

5.5. Resultado da imuno-histoquímica

5.5.1. Imuno-histoquímica para Ki-67

A pesquisa por IHQ revelou ausência da proteína Ki-67 em 11 dos doentes (37%), positividade em menos de 3% das células em 15 (50%) e positividade em mais de 3% das células em apenas quatro (13%) (tabela 6).

A figura 11 exemplifica a positividade por IHQ da proteína Ki-67 em dois doentes, em menos de 3% (A) ou em mais de 3% das células tumorais (B).

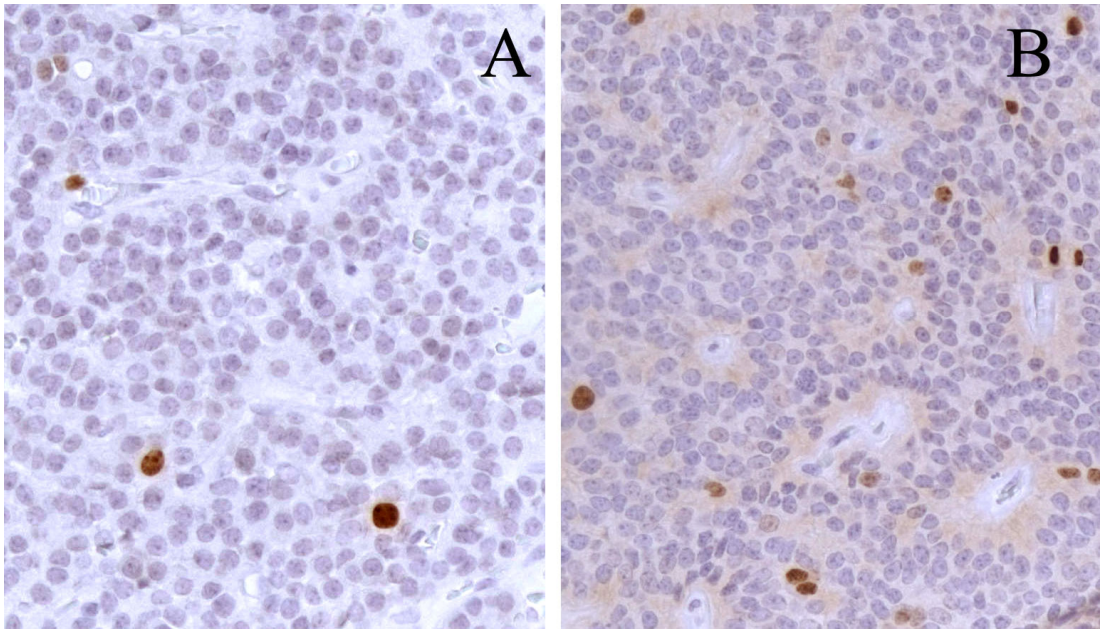


Figura 11. Lâminas coradas para Ki-67 por imuno-histoquímica em menos de 3% das células, paciente #11 (A) e em mais de 3% das células, paciente #21 (B).

Tabela 6. Dados relativos à cirurgia, exame anátomopatológico e imuno-histoquímico (IHQ) do tumor, para hormônios hipofisários, Ki-67 e BCL-2, e complicações cirúrgicas

no.	iniciais	data da cirurgia	via da cirurgia	tumor mole	Invasão dural	IHQ para hormônios hipofisários	Ki-67	BCL-2	complicações PO
1	AMJ	08/08/08	TS	sim	não	"null cell"	<3%	neg	
2	ALM	04/02/09	TS	sim	sim	"null cell"	>3%	neg	
3	ASN	29/10/08	TS	sim	sim	"null cell"	0	neg	
4	ACB	04/07/08	TS	sim	sim	TSH (focal) FSH (focal)	<3%	neg	fistula e meningite com óbito
5	EML	09/09/08	TS	sim	sim	"null cell"	<3%	neg	
6	ERS	24/03/09	TC	sim	sim	"null cell"	0	neg	
7	GAP	24/09/08	TS	não	na	"null cell"	0	neg	
8	GJS	03/03/09	TS	sim	sim	TSH (focal) FSH (focal)	<3%	neg	
9	JAA	30/09/08	TS	sim	não	"null cell"	<3%	neg	
10	JAS	22/07/08	TS	sim	sim	TSH (focal) FSH (focal)	0	neg	
11	JBA	31/10/08	TS	sim	não	"null cell"	<3%	neg	
12	JGS	11/02/09	TS	sim	não	TSH (focal)	>3%	neg	
13	JPS	30/07/08	TS	sim	sim	ACTH (focal) FSH (focal) TSH (focal)	<3%	neg	
14	JPL	27/01/09	TS	sim	não	"null cell"	0	neg	
15	JF	10/02/09	TS	sim	sim	TSH (focal)	>3%	neg	
16	MAS	20/08/08	TS	sim	sim	TSH (focal) FSH (focal)	<3%	neg	fistula
17	MBS	12/09/08	TS	sim	não	"null cell"	<3%	neg	
18	MIA	11/11/08	TS	sim	na	"null cell"	0	neg	
19	MLC	26/08/08	TS	não	na	TSH (focal) FSH (focal) LH (focal)	<3%	neg	meningite
20	MPS	22/10/08	TS	não	sim	"null cell"	0	neg	fistula
21	MTN	07/04/09	TS	sim	não	TSH (focal) LH (focal)	>3%	neg	
22	MVG	10/06/08	TS	sim	na	GH (focal)	<3%	pos	
23	MA	16/07/08	TS	sim	não	"null cell"	0	neg	
24	PCO	16/09/08	TS	não	não	"null cell"	<3%	neg	
25	RDL	16/12/08	TS	sim	não	"null cell"	0	neg	
26	SFO	28/05/08	TS	sim	sim	"null cell"	0	neg	
27	SFJ	03/10/08	TS	sim	não	TSH (focal) FSH (focal) LH (focal)	<3%	neg	
28	SLS	10/09/08	TS	sim	na	TSH (focal) FSH (focal) LH (focal)	0	pos	
29	TMS	18/06/08	TS	sim	na	"null cell"	<3%	pos	óbito
30	ZML	27/06/08	TS	sim	não	"null cell"	<3%	neg	

TS: transesfenoidal TC: transcraniana na:não acessível "null cell" ausência de grânulos de secreção corados à IHQ PO: pós-operatórias
neg: negativo pos:positivo

5.5.2. imuno-histoquímica para p-53

A pesquisa por IHQ foi negativa para p-53 em todos doentes.

5.5.3. Imuno-histoquímica para BCL-2

A pesquisa por IHQ revelou positividade para a proteína BCL-2 em apenas 3 doentes (tabela 6).

5.6. Resultados da análise molecular

A extração do RNA foi obtida satisfatoriamente em todos os casos. Os valores relativos à concentração e o grau de pureza obtidos com a leitura no espectrofotômetro estão apresentados no anexo B.

Os resultados individuais da análise por transcrição reversa da reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) dos genes estudados, Bcl-2, Bax e Caspase 3, descritos como CT, delta CT e delta-delta CT estão apresentados individualmente no anexo C.

A avaliação da expressão destes genes em comparação aos resultados obtidos para os casos do grupo e hipófise normal está listada na tabela 7, onde o resultado para hipófise normal é um. A figura 12 apresenta gráfico em barras dos valores obtidos na expressão gênica para o Bcl-2, Bax e caspase 3 (QR) em relação à hipófise normal (que tem valor de um).

Tabela 6. Dados relativos à cirurgia, exame anátomopatológico e imuno-histoquímico (IHQ) do tumor, para hormônios hipofisários, Ki-67 e BCL-2, e complicações cirúrgicas

no.	iniciais	data da cirurgia	via da cirurgia	tumor mole	Invasão dural	IHQ para hormônios hipofisários	Ki-67	BCL-2	complicações PO
1	AMJ	08/08/08	TS	sim	não	"null cell"	<3%	neg	
2	ALM	04/02/09	TS	sim	sim	"null cell"	>3%	neg	
3	ASN	29/10/08	TS	sim	sim	"null cell"	0	neg	
4	ACB	04/07/08	TS	sim	sim	TSH (focal) FSH (focal)	<3%	neg	fistula e meningite com óbito
5	EML	09/09/08	TS	sim	sim	"null cell"	<3%	neg	
6	ERS	24/03/09	TC	sim	sim	"null cell"	0	neg	
7	GAP	24/09/08	TS	não	na	"null cell"	0	neg	
8	GJS	03/03/09	TS	sim	sim	TSH (focal) FSH (focal)	<3%	neg	
9	JAA	30/09/08	TS	sim	não	"null cell"	<3%	neg	
10	JAS	22/07/08	TS	sim	sim	TSH (focal) FSH (focal)	0	neg	
11	JBA	31/10/08	TS	sim	não	"null cell"	<3%	neg	
12	JGS	11/02/09	TS	sim	não	TSH (focal)	>3%	neg	
13	JPS	30/07/08	TS	sim	sim	ACTH (focal) FSH (focal) TSH (focal)	<3%	neg	
14	JPL	27/01/09	TS	sim	não	"null cell"	0	neg	
15	JF	10/02/09	TS	sim	sim	TSH (focal)	>3%	neg	
16	MAS	20/08/08	TS	sim	sim	TSH (focal) FSH (focal)	<3%	neg	fistula
17	MBS	12/09/08	TS	sim	não	"null cell"	<3%	neg	
18	MIA	11/11/08	TS	sim	na	"null cell"	0	neg	
19	MLC	26/08/08	TS	não	na	TSH (focal) FSH (focal) LH (focal)	<3%	neg	meningite
20	MPS	22/10/08	TS	não	sim	"null cell"	0	neg	fistula
21	MTN	07/04/09	TS	sim	não	TSH (focal) LH (focal)	>3%	neg	
22	MVG	10/06/08	TS	sim	na	GH (focal)	<3%	pos	
23	MA	16/07/08	TS	sim	não	"null cell"	0	neg	
24	PCO	16/09/08	TS	não	não	"null cell"	<3%	neg	
25	RDL	16/12/08	TS	sim	não	"null cell"	0	neg	
26	SFO	28/05/08	TS	sim	sim	"null cell"	0	neg	
27	SFJ	03/10/08	TS	sim	não	TSH (focal) FSH (focal) LH (focal)	<3%	neg	
28	SLS	10/09/08	TS	sim	na	TSH (focal) FSH (focal) LH (focal)	0	pos	
29	TMS	18/06/08	TS	sim	na	"null cell"	<3%	pos	óbito
30	ZML	27/06/08	TS	sim	não	"null cell"	<3%	neg	

TS: transesfenoidal TC: transcraniana na:não acessível "null cell" ausência de grânulos de secreção corados à IHQ PO: pós-operatórias
neg: negativo pos:positivo

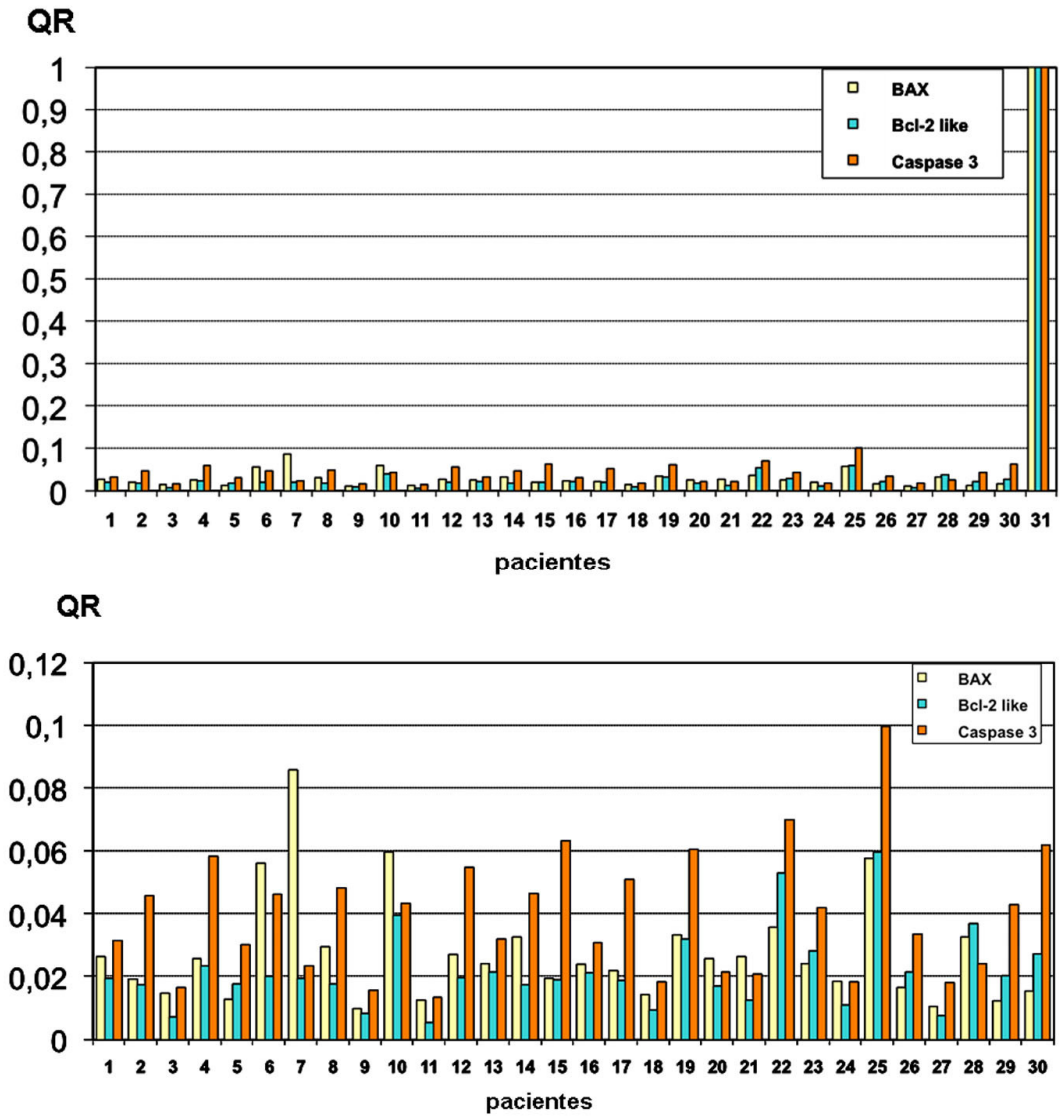


Figura 12. Comparação entre a expressão gênica, representada pela quantificação relativa (QR) obtidos para Bax, Bcl-2 e caspase 3 nos pacientes em comparação à hipófise normal (gráfico superior) ou apenas entre os pacientes (gráfico inferior)

Tabela 7. Resultados relativos da expressão dos genes estudados (Bcl-2, Bax e caspase 3) em comparação aos resultados obtidos para o controle (hipófise normal) e resultado da imunohistoquímica (IHQ) para BCL-2.

no.	iniciais	QR Bcl-2 like	QR BAX	QR Caspase 3	IHQ BCL-2
1	AMJ	0,0193	0,0262	0,0314	negativo
2	ALM	0,0172	0,0190	0,0457	negativo
3	ASN	0,0070	0,0145	0,0164	negativo
4	ACB	0,0233	0,0255	0,0582	negativo
5	EML	0,0176	0,0126	0,0300	negativo
6	ERS	0,0200	0,0559	0,0462	negativo
7	GAP	0,0194	0,0857	0,0234	negativo
8	GJS	0,0175	0,0293	0,0482	negativo
9	JAA	0,0082	0,0096	0,0154	negativo
10	JAS	0,0395	0,0595	0,0433	negativo
11	JBA	0,0051	0,0124	0,0133	negativo
12	JGS	0,0196	0,0270	0,0546	negativo
13	JPS	0,0214	0,0240	0,0319	negativo
14	JPL	0,0172	0,0325	0,0463	negativo
15	JF	0,0189	0,0193	0,0632	negativo
16	MAS	0,0211	0,0237	0,0306	negativo
17	MBS	0,0186	0,0218	0,0509	negativo
18	MIA	0,0093	0,0141	0,0181	negativo
19	MLC	0,0318	0,0332	0,0605	negativo
20	MPS	0,0168	0,0256	0,0213	negativo
21	MTN	0,0124	0,0262	0,0207	negativo
22	MVG	0,0529	0,0356	0,0698	positivo
23	MA	0,0280	0,0239	0,0419	neagtivo
24	PCO	0,0107	0,0185	0,0182	negativo
25	RDL	0,0596	0,0576	0,0996	negativo
26	SFO	0,0212	0,0163	0,0335	negativo
27	SFJ	0,0074	0,0104	0,0179	negativo
28	SLS	0,0368	0,0325	0,0241	positivo
29	TMS	0,0203	0,0122	0,0427	positivo
30	ZML	0,0271	0,0153	0,0619	negativo
hipófise normal		1	1	1	

5.7. Resultados da análise estatística

5.7.1. Resultados da correlação do tamanho do tumor com achados clínicos

De acordo com os dados apresentado na tabela 8 houve forte correlação entre as três medidas de dimensão do tumor, pois os valores observados dos coeficientes de correlação de Spearman (r) foram maiores ou iguais a 0,85. Portanto, uma dessas medidas é suficiente para representar o tamanho do tumor. No restante da análise, o volume será utilizado com essa finalidade.

Tabela 8. Coeficientes de correlação de Spearman entre as dimensões do tumor

		maior diâmetro	**AP+CC+LL**
Volume	r	0,85	0,91
	p	0,000	0,000
	n	29	29
maior diâmetro	r		0,96
	p		0,000
	n		29

Na figura 13 demonstra-se graficamente a forte correlação observada entre as medidas.

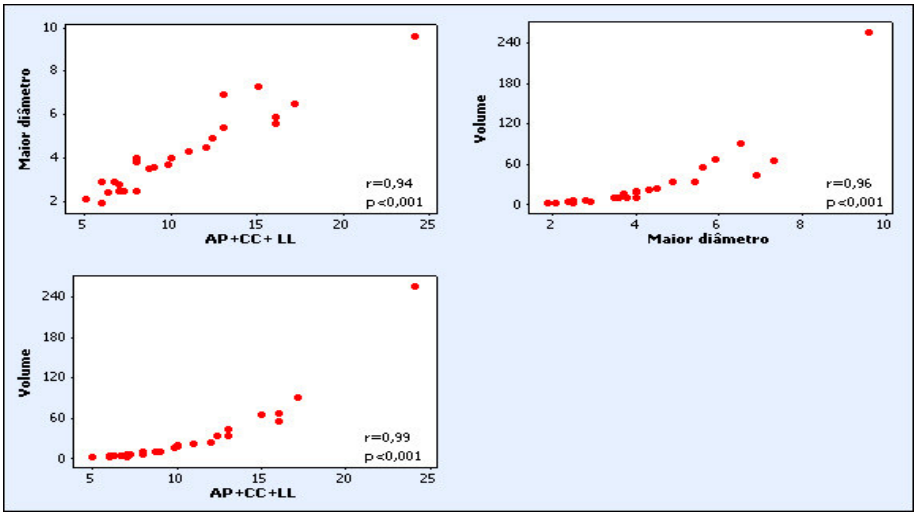


Figura 13. Diagramas de dispersão do maior diâmetro do tumor (cm) x a soma dos seus três diâmetros (cm), do maior diâmetro (cm) x volume do tumor (cm^3) e da soma dos três diâmetros (cm) x volume do tumor (cm^3).

Considerando-se como marcadores de agressividade, o volume do tumor, o número de deficiências hormonais, o grau de invasão do tumor e a duração da história clínica, foram testadas hipóteses de correlação.

Na figura 14 são apresentados diagramas de dispersão do volume e idade, volume e duração dos sintomas e volume e número de deficiências hormonais.

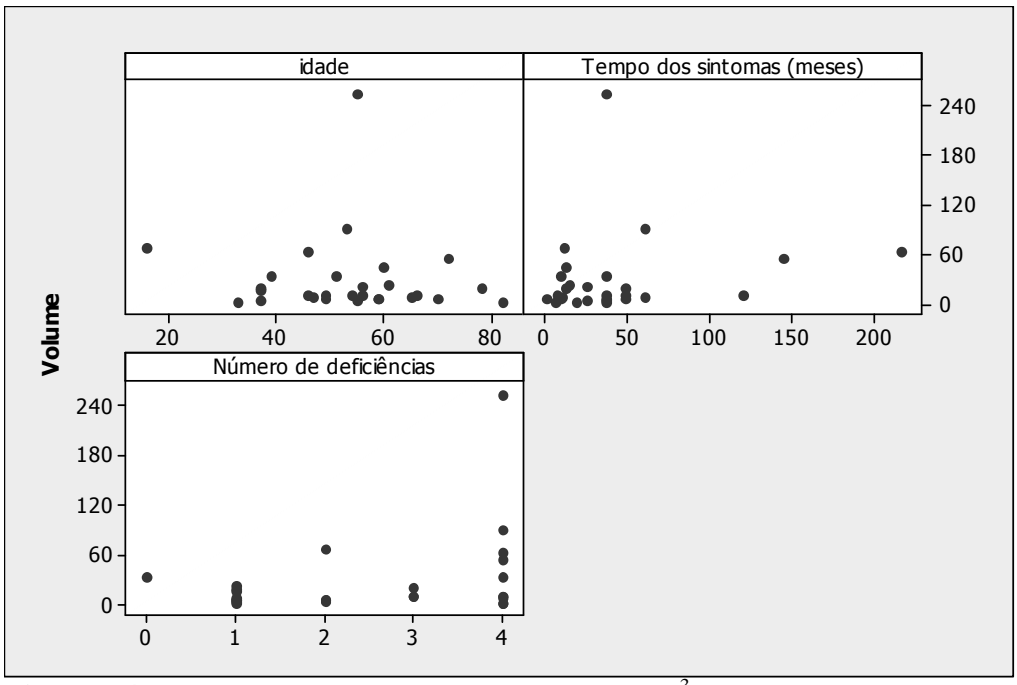


Figura 14. Diagramas de dispersão do volume (cm^3) x idade (anos), volume (cm^3) x duração dos sintomas (meses) e volume (cm^3) x número de deficiências hormonais.

Para medir-se a correlação entre as variáveis foi considerado o coeficiente de correlação de Spearman, cujos valores são apresentados na tabela 9. Observa-se nessa tabela que não houve correlação entre o volume das lesões com a idade (p=0,737), do volume com a duração dos sintomas (p=0,380) ou do volume com o número de deficiências (p=0,111).

Tabela 9. Coeficientes de correlação de Spearman (r) do volume com a idade, duração dos sintomas e número de deficiências

Volume	idade	tempo dos sintomas	deficiências
	-0,066	0,176	0,320
p	0,737	0,380	0,111
n	29	27	26

5.7.2. Resultados da correlação da dimensão do tumor e imuno-histoquímica para hormônios hipofisários

Para verificar-se a existência ou não da associação entre o volume do tumor e os resultados da IHQ para os hormônios hipofisários, os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com IHQ negativa ou positiva para qualquer hormônio. Na tabela 10 demonstra-se os valores das estatísticas descritivas.

Tabela 10. Estatísticas descritivas para os volume dos tumores em cada categoria de imuno-histoquímica (IHQ)

IHQ	n	Média cm^3	desvio padrão cm^3	Mínimo cm^3	Mediana cm^3	Máximo cm^3
negativo	18	36,7	60,2	2,9	11,3	255,6
positivo	11	18,8	16,7	3,0	11,8	64,9

n= número de pacientes

Como se observa na tabela 10, a média e o desvio padrão do volume nos doentes com IHQ negativa são superiores à media e ao desvio padrão dos do grupo com IHQ positiva. Isto pode decorrer da existência de um tumor com volume de 255,6 cm^3, considerado discrepante em relação aos volumes dos demais tumores. As medianas do volume nos dois grupos foram similares. Para testar a existência de associação foi adotado o teste de Kruskal-Wallis, que atribui “ranks” às observações; a hipótese testada foi a da igualdade das médias dos “ranks” nos dois grupos. Não

houve diferença entre as médias nos dois grupos (p=0,916), e concluiu-se que não há associação entre o volume e a positividade à IHQ.

Na figura 15 apresenta-se graficamente os valores individuais do volume em cada categoria de IHQ.

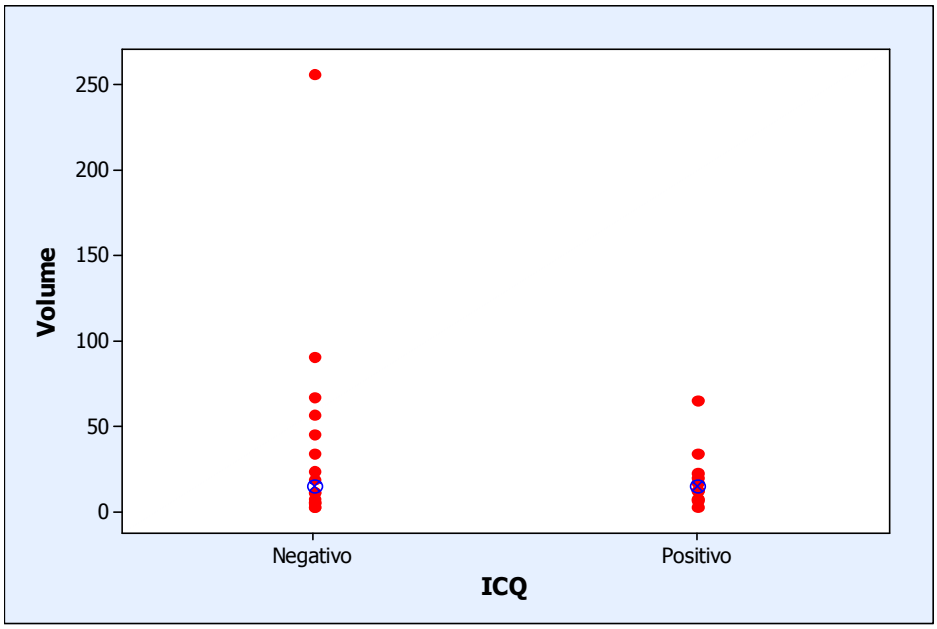


Figura 15. Valores individuais e medianos do volume (cm3) em cada categoria de doentes de acordo com o exames imuno-histoquímico (ICQ)

5.7.3. Resultados das correlações considerando-se a expressão gênica

Na tabela 11 demonstram-se os valores das estatísticas descritivas para os resultados de QR (quantificação relativa do gene, normalizada para o padrão endógeno, em relação à hipófise normal, considerada como valor de 1) dos genes bax, bcl-2 e caspase 3 pesquisados.

Tabela 11- Estatísticas descritivas para as QR Bax, QR Bcl-2 e QR caspase 3

QR	n	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo
Bax	30	0,0273	0,0171	0,0096	0,0240	0,0857
Bcl-2	30	0,0215	0,0125	0,0051	0,0193	0,0596
Caspase 3	30	0,0393	0,0201	0,0133	0,0377	0,0996

n: número de pacientes estudados

Nos “box-plots” da figura 16 observa-se a ocorrência de alguns valores discrepantes das QRs.

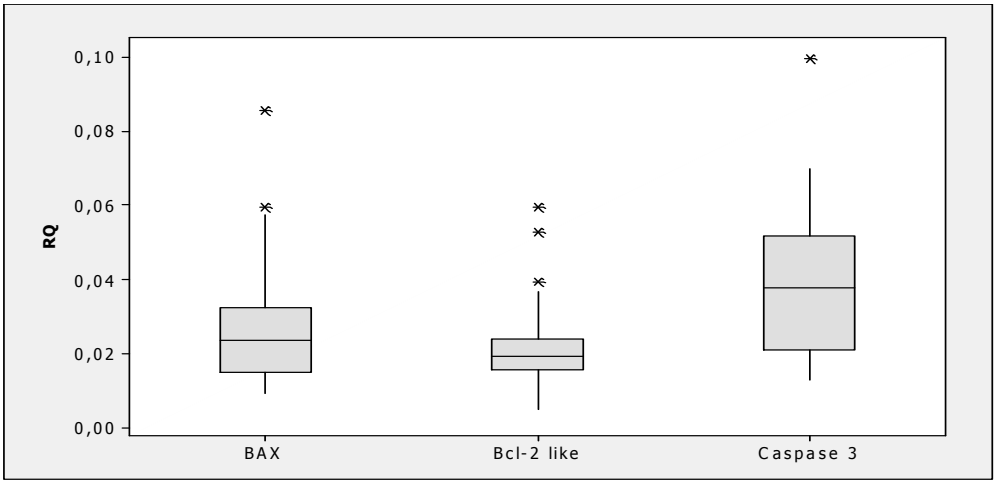


Figura 16. “Box-plots” para os valores de QR Bax, QR Bcl-2 e QR Caspase 3

Para avaliar-se a relação existente entre as QRs foram calculados os coeficientes de correlação de Spearman entre as QRs. Observou-se correlação positiva entre as QR (tabela 12).

Tabela 12- Coeficientes de correlação de Spearman (r) entre QR BAX, QR Bcl-2 e QR Caspase 3

		Bax	**Bcl-2 like**	**Caspase 3**
Bax	r	1	0,573	0,494
	p		0,001	0,006
	n	30	30	30
Bcl-2	r	0,573	1	0,687
	p	0,001		<0,001
	n	30	30	30

Foram calculados os valores do coeficiente de correlação de Spearman (r) para avaliar-se a correlação das expressões QR com a idade. Não se observou correlação dos QRs com a idade (tabela 13).

Tabela 13. Coeficientes de correlação de Spearman (r) da idade com QR bax, QR bcl-2 e QR caspase 3

Idade *versus*	**QR bax**	**QR bcl-2**	**QR caspase**
r	0,11	0,21	0,33
p	0,555	0,256	0,074
n	30	30	30

n: número de pacientes QR: quantificação relativa

Também não houve correlação do volume do tumor com a QR Bax, QR Bcl-2 ou QR Caspase 3 calculados pelo coeficiente de correlação de Spearman (tabela14).

Tabela 14. Coeficientes de correlação de Spearman (r) do volume do tumor com QR bax, QR bcl-2 e QR caspase 3

Volume do tumor	**QR bax**	**QR bcl-2**	**QR caspase**
r	0,17	0,11	0,13
p	0,378	0,556	0,509
n	29	29	29

n: número de pacientes QR: quantificação relativa

Na tabela 15 apresenta-se os resultados obtidos e a aplicação do teste de Kruskal-Wallis, com objetivo de se avaliar a existência ou não de associação entre as QR e os marcadores qualitativos dos tumores, ou seja, a IHQ positiva, a consistência e a invasão tumoral. Foram considerados tumores invasivos aqueles que apresentavam invasão do SC, do seio esfenoidal e/ou dura-máter.

Tabela 15. valores de p obtidos no teste de Kruskal-Wallis para testar a asociação de duas variáveis

marcador	**QR Bax**	**QR Bcl-2**	**QR Caspase 3**
IHQ positiva	0,095	0,087	0,172
Tumor mole	0,220	0,746	0,461
Tumor invasivo	0,465	0,692	0,917

IHQ: imuno-histoquímica QR: quantificação relativa

Embora não tenha sido observada associação entre as QR de Bax, Bcl-2 e caspase 3 e os marcadores do tumor (tabela 15), os valores de p obtidos na comparação das médias dos "ranks" de QR Bax e QR Bcl-2 na categoria IHQ positiva foram menores que 0,10, mas sem significância estatística. A falta de poder estatístico pode, neste caso, ser atribuída ao pequeno tamanho da amostra. Os valores individuais e as medianas da QR Bax e QR Bcl-2 nas duas categorias da IHQ estão representados na figura 17. Observa-se na figura 17 e na tabela 16, que os valores de QR BAX e QR Bcl-2 tendem a ser maiores na categoria IHQ positiva.

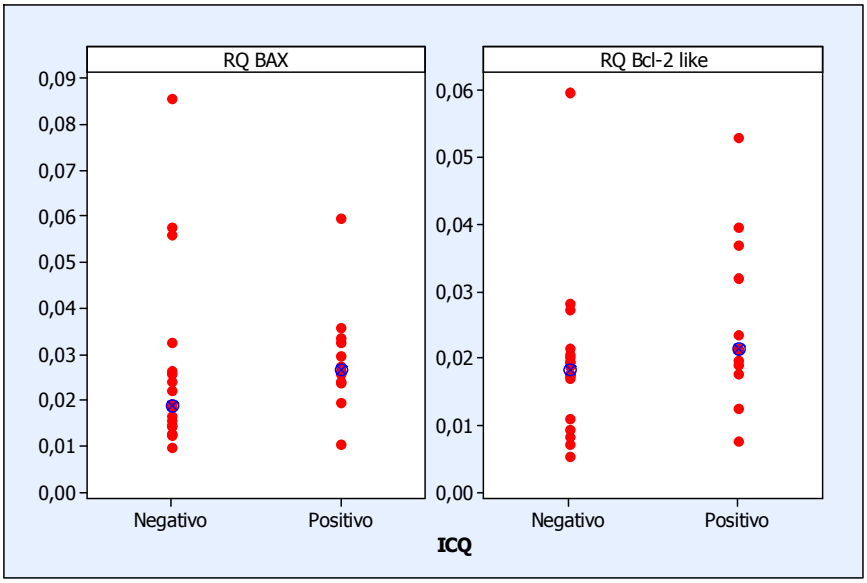


Figura 17. Valores individuais e medianas de QR Bax e QR Bcl-2 em cada categoria de imuno-histoquímica (ICQ) positiva ou negativa para qualquer hormônio hipofisário

Tabela16. Número de casos, média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo para QR bax e QR bcl-2 em cada grupo de imuno-histoquímica (IHQ) positiva ou negativa

QR	IHQ	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
QR bax	Negativo	18	0,0263	0,0202	0,0096	0,0188	0,0857
	Positivo	12	0,0289	0,0118	0,0104	0,0266	0,0595
QR bcl-2	Negativo	18	0,0190	0,0120	0,0051	0,0181	0,0596
	Positivo	12	0,0252	0,0128	0,0074	0,0212	0,0529

Na figura 18estão apresentadas em “box-plots” a distribuição das QRs para Bax, Bcl-2 e caspase 3 nos doentes com (sim) ou sem (não) tumor invasivo.

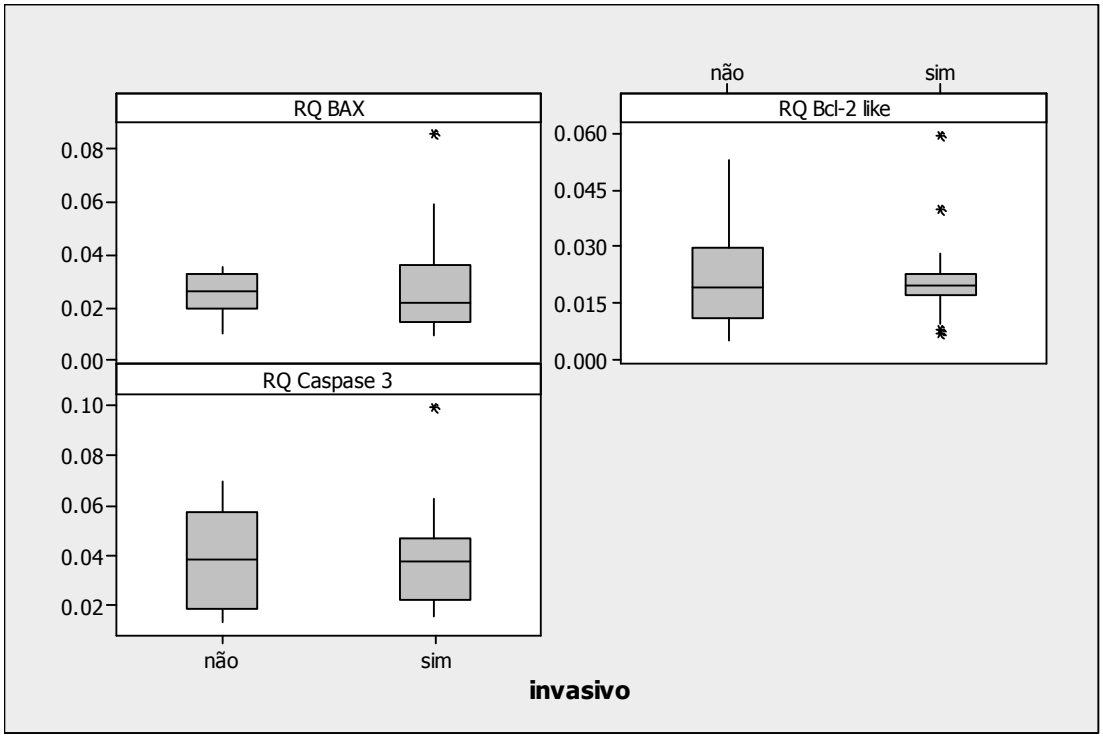


Figura 18. Box-plots para QR Bax, QR Bcl-2 e QR caspase 3 nos doentes com (sim) ou sem (não) tumores invasivos.

5.7.4. Comparação dos dados obtidos do exame de imuno-histoquímica para a proteína BCL-2 com os resultados da análise molecular para o gene Bcl-2 (QR Bcl-2)

Não foi possível analisar estatisticamente os dados obtidos da QR Bcl-2 e a positividade para a proteína correspondente, já que em apenas três pacientes havia positividade para a BCL-2 na IHQ. A análise da distribuição das QRs apresentadas na figura 19 sugere que os doentes com positividade para BCL-2 na IHQ apresentaram valores de QR Bcl-2 semelhantes aos com achado negativo para a proteína.

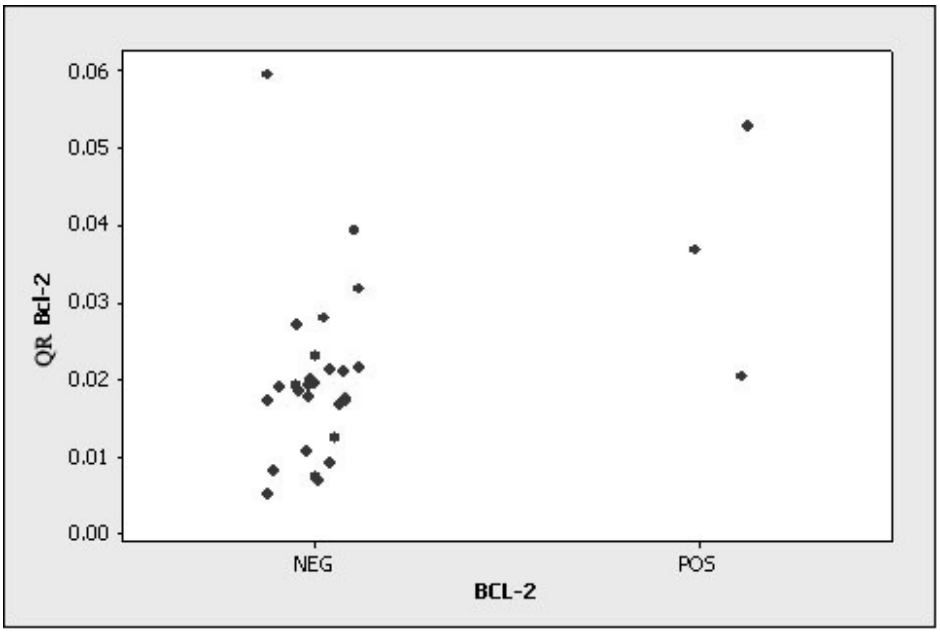


Figura 19. Distribuição dos valores de quantificação relativa (QR) do gene bcl-2 obtidos para cada paciente em relação à positividade da proteína BCL-2 à imuno-histoquímica (NEG=negativo, POS=positivo).

5.7.5. Resultados da análise considerando-se a relação entre a expressão do Bcl-2 e do Bax

Considerando-se que o Bcl-2 é um gene anti-apoptótico e o Bax, pró-apoptótico, analisou-se a relação entre eles, via diferença dos valores de QR de ambos.

Com a aplicação do teste de Mann-Whitney não se observou diferença significativa entre a média dos "ranks" da QR Bcl-2 – QR Bax nos doentes com ou sem tumores invasivos (p=0,602). Na tabela 17 apresentam-se os resultados estatísticos descritivos para os valores da diferença: QR Bcl-2 – QR Bax nos casos com ou sem invasão.

Tabela 17. Estatísticas descritivas para diferença QR Bcl-2 - QR Bax nos doentes com (sim) ou sem (não) tumor invasivo

invasivo	n	média	desvio padrão	mínimo	mediana	máximo
não	12	-0.0039	0.0086	-0.0153	-0.0051	0.0174
sim	18	-0.0071	0.0184	-0.0663	-0.0022	0.0118

Não houve também correlação estatisticamente significante, avaliada com o coeficiente de correlação de Spearman entre o volume do tumor e a diferença QR Bcl-2 – QR Bax (r=-0,285; p=0,135).

No entanto quando se analisou o grupo de pacientes com QR Bcl-2 maior ou menor que QR Bax (diferença positiva, predomínio do Bcl-2 ou negativa, predomínio do Bax) observou-se que a média e a mediana do volume do tumor foi maior no grupo com predomínio do Bax. Por outro lado, seis dos oito pacientes em que havia predomínio do QR Bcl-2 apresentaram tumor invasivo, o mesmo ocorrendo em apenas 12 dos 22 doentes do grupo com predomínio do QR Bax, embora sem diferença estatisticamente significante (p=0,419). Os três pacientes com IHQ positiva para Bcl-2 apresentaram maior QR bcl-2 do que para o QR Bax.

5.7.6. Análise estatística das correlações com o Ki-67

Não houve associação estatisticamente significativa entre invasão e positividade do Ki-67, de acordo com o teste exato de Fisher (tabela 18).

Tabela 18. Distribuição dos doentes com (sim) ou sem (não) tumor invasivo em relação à positividade do Ki-67.

Ki-67	**tumor invasivo**		**total**
	Sim (n)	**Não (n)**	**(n)**
Negativo	9	2	11
<3%	7	8	15
>3%	2	2	4

n=número de doentes

Na tabela 19 apresentam-se as medidas descritivas do volume tumoral e da idade nos três grupos classificados conforme resultado obtido na IHQ para Ki-67, ou seja, negativo, positivo em menos de 3% das células ou positivo em mais de 3% das células. O volume tumoral foi estatisticamente maior no grupo negativo para o Ki-67

em relação ao grupo positivo para o Ki-67 em menos de 3% das células (p=0,043), mas não para os quatro doentes com Ki-67 positivo em mais de 3% das células (fig. 20). Não houve diferença estatisticamente significante entre as medianas das idades para Ki-67 negativo ou positivo (fig. 20).

Tabela 19. Medidas descritivas para volume tumoral e idade para cada grupo de doentes classificados segundo a positividade para o Ki-67 na imuno-histoquímica.

variável	Ki-67	n	média	DP	mínimo	mediana	máximo
volume	negativo	11	52,00	72,90	5,76	33,90	255,60
tumoral	<3%	15	16,57	19,25	2,65	6,90	64,86
	>3%	3	15,68	3,59	11,60	17,09	18,36
idade	negativo	11	50,64	14,12	16,00	53,00	66,00
	<3%	15	55,87	15,06	33,00	56,00	82,00
	>3%	4	48,75	14,57	37,00	45,50	67,00

n: número de pacientes DP: desvio padrão

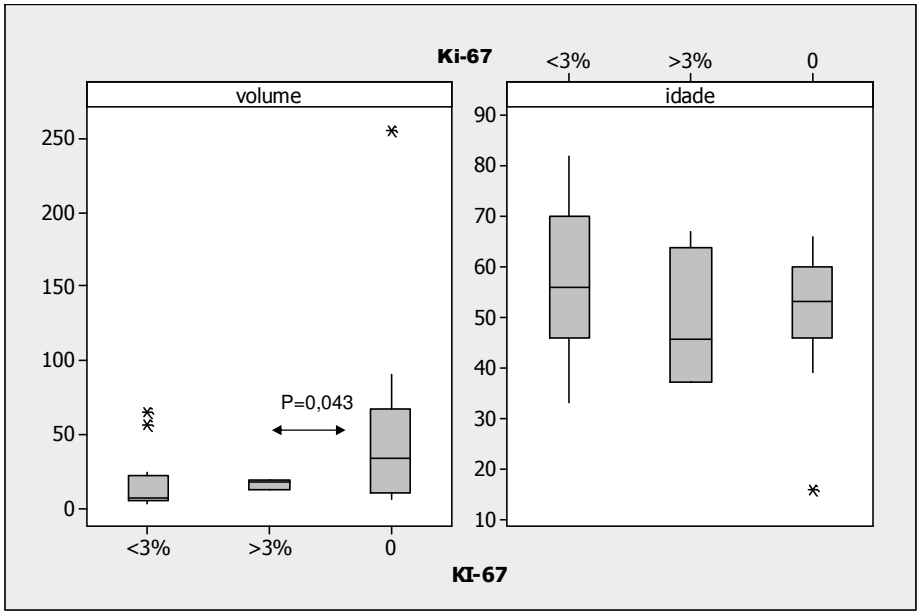


Figura 20. Box-plots para volume tumoral (cm) e idade (anos) em cada grupo de doentes classificados segundo a positividade para o Ki-67analisada na imuno-histoquímica: negativo (0), positivo em menos de 3% das células (<3%) ou positivo em mais de 3% das células (>3%).

6 . DISCUSSÃO

6.1. Caracterização da casuística

Foram confirmados na presente pesquisa que envolveu 30 doentes com ACNF os achados dos trabalhos já publicados referentes à distribuição por gênero, faixa etária, duração dos sintomas e número de deficiências hormonais e neurológicas, ou seja, que os ACNF ocorrem com freqüência discretamente superior no sexo masculino, no indivíduo adulto e que causam como manifestações mais importantes sinais e sintomas relacionados à compressão de estruturas encefálicas (déficit visual, cefaléia) e/ou hipopituitarismo. [12,3,52]. Todos doentes analisados no presente estudo, exceto um, eram sintomáticos sob o ponto de vista neurológico e/ou oftalmológico e a maioria apresentava deficiência hormonal por ocasião do diagnóstico.

O primeiro questionamento no estudo dos ACNF refere-se à avaliação do tamanho ou do volume tumoral. As fórmulas para medida de volume não são precisas quando a lesão é muito irregular ou não apresenta forma geométrica definida. Como nas publicações são utilizadas diferentes maneiras para avaliar o tamanho dos tumores, optou-se pela avaliação do diâmetro maior, a soma dos três diâmetros (ântero-posterior, crânio-caudal e látero-lateral) e cálculo do volume tumoral com a fórmula: AP x CC x LL x 0,5.[48] Estatisticamente, os três modos de se avaliar o tamanho tumoral se equivaleram e houve forte correlação entre eles. Portanto, qualquer uma destas medidas pode ser adotada para representar o tamanho do tumor. Optamos, entretanto, pela utilização do volume tumoral calculado de acordo com a fórmula descrita previamente.[48]

Ocorre invasão do SC em seis a 10% dos doentes com adenoma.[53] No entanto, há controvérsias quanto aos critérios de invasão baseados nos métodos de imagem. Na classificação de invasão do SC fundamentada nos achados de RM proposta por Knosp e Steiner[49] que é a mais utilizada e baseada na localização das linhas intercarotídeas, na percentagem do envolvimento da artéria carótida interna (ACI) e na visibilização dos compartimentos venosos do SC, as lesões são divididas em cinco graus de zero a IV, ou seja, zero quando o adenoma não ultrapassa a linha intercarotídea medial, I quando não ultrapassa a linha mediana, II quando não ultrapassa a linha lateral, III quando ultrapassa a linha lateral, IV quando a ACI é totalmente envolvida pelo tumor. Estes autores evidenciaram invasão do SC em todos os doentes com graus III e IV e em nenhum com graus zero e I.

Vieira Jr. e colaboradores[54] observaram que a existência de tecido hipofisário entre o tumor e o SC, presença de compartimento venoso medial intacto, percentagem de envolvimento da ACI inferior a 25% e linha intercarotídea medial não ultrapassada pelo tumor indicam ausência de invasão do SC; o envolvimento da ACI superior a 45% de sua circunferência, oclusão de três ou mais compartimentos e oclusão do compartimento venoso lateral do SC indicam invasão do SC. A invasão é sugestiva com probabilidade superior a 90% quando o compartimento venoso inferior não é visibilizado, a linha intercarotidea lateral é ultrapassada ou quando a parede lateral do SC é abaulada.

Cottier e colaboradores[50] sugeriram que há invasão do SC quando a ACI é envolvida mais de 67% pelo tumor; a ocorrência de invasão é muito sugestiva quando o compartimento do sulco venoso carotídeo não é visibilizado e quando a linha carotídea lateral é ultrapassada pelo tumor e que não há invasão quando o

envolvimento da ACI é inferior a 25% e o tumor não ultrapassa a linha carotídea medial.

No presente trabalho considerou-se que havia invasão do SC quando mais de 67% do diâmetro da ACI estava envolvido pelo tumor ou quando havia envolvimento maior que 50% associadamente ao apagamento do sulco venoso carotídeo e/ou expansão até linha carotídea lateral. Utilizando-se estes critérios, a invasão foi sugerida pela imagem em 12 pacientes, estava ausente em 12 e era duvidosa em 6. A cirurgia confirmou a invasão em apenas um dos casos duvidosos, o que não invalida a suspeita pois, apenas grandes invasões podem ser confirmadas cirurgicamente.

A análise dos dados de imagem mostrou ainda que todas as lesões eram macroadenomas e apresentavam volume médio de 29,9 cm^3, média do maior diâmetro de 4,2 cm e que 48% eram adenomas gigantes (diâmetro $\geq$ 4cm).

De acordo com outros autores[12,13] e na experiência da Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP, tumores grandes, funcionantes ou não, têm menor probabilidade de cura cirúrgica. Muitos necessitam mais de um procedimento pela mesma via ou não para obtenção de resultado satisfatório, seja ele a cura ou a citorredução para tratamento complementar ulterior ou descompressão das estruturas encefálicas, notadamente das vias ópticas.[52,55] Oito dos 30 doentes incluídos no presente estudo já haviam sido submetidos a uma ou mais cirurgias prévias no tratamento do adenoma hipofisário.

A craniectomia transesfenoidal é boa via para o acesso cirúrgico, mesmo em casos de tumores muito grandes.[12,13,55] Foi a primeira opção adotada em todos os doentes exceto em um que apresentava manifestação clínica inicial de alteração de

memória e crise convulsiva, sem alteração visual (caso #6), que foi submetido inicialmente à craniotomia pterional tendo em vista apresentar grande expansão para o lobo temporal esquerdo e SC. A consistência do tumor foi amolecida em 26 dos casos o que reforça a preferência pelo uso da via transesfenoidal na maioria dos casos como acesso à lesão.

A elevada ocorrência de complicações pós-operatórias observado no presente estudo não significa que tal se manifeste na maioria das cirurgias hipofisárias da Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP. Nos doentes incluídos no presente estudo os tumores eram grandes, invadiam e destruíam as estruturas anatômicas circunvizinhas. Além disso, em cinco deles haviam sintomas neurológicos como convulsão e alteração da consciência, manifestações pouco freqüentes no repertório dos sinais e sintomas observados nos tumores hipofisários. Todos estes achados aumentam os riscos da cirurgia[12,13].

A pesquisa dos hormônios hipofisários com a IHQ revelou grânulos em apenas 12 tumores, ou seja, foram diagnosticados adenomas sem nenhum grânulo de secreção ou "null cell" em 60 % dos casos, percentagem superior ao relatado por outros autores[12,11,56]. Entretanto, deve-se salientar que a pesquisa de subunidade alfa dos hormônios glicoproteicos por IHQ não é realizada rotineiramente para o estudo anátomo-patológico dos adenomas. Isto pode ser um dos fatores que explicam a maior freqüência dos tumores tipo "null cell".

6.2. Relação dos marcadores com agressividade tumoral

O Ki-67 é um antígeno nuclear detectado pelo anticorpo monoclonal MIB-1 que reage com proteínas nucleares expressas nas fases G1, G2, S, M do ciclo celular.

É o marcador de proliferação celular mais utilizado para avaliar-se os adenomas hipofisários, relacionando-se à taxa de crescimento, poder de invasão e prognóstico destes tumores[57]. Thapar e colaboradores estabeleceram que 3% do índice de proliferação celular medido pelo Ki-67 era o limite para a distinção entre adenomas invasivos e não invasivos[58]. Este índice foi adotado na atual classificação dos tumores publicada pela Organização Mundial de Saúde[9].

Os estudos que relacionaram a agressividade tumoral com o índice proliferativo do Ki-67 revelaram resultados, às vezes, conflitantes conforme foi relatado em revisão publicada recentemente por Salehi e colaboradores. [59]

Vários autores demonstraram que índice de Ki-67 elevado é indicativo de maior agressividade tumoral, está associado à invasão e tem valor prognóstico[60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71]. No entanto, a maioria destes trabalhos estudou adenomas em geral e não apenas os casos de ACNF. Foi observada correlação positiva do Ki-67 com a velocidade de crescimento em ACNF[72] e recorrência tumoral tanto em adenomas em geral[73,74,75,76,77,78,79] como em ACNF[80,81]. Tanaka e colaboradores estudaram a velocidade de recrescimento dos ACNF com a avaliação do tempo necessário para duplicação do volume tumoral residual e concluíram que este se correlacionou positivamente com a idade do paciente e negativamente com o Ki-67 e não foi influenciado pelo gênero ou invasão tumoral.[10]

Outros, porém, não encontraram relação entre o índice do Ki-67 e tamanho[82], recorrência [83] ou invasão tumoral, tanto em casos de ACNF[84,85,86,87,88] como em adenomas em geral[10,72,75,78]. Jaffrain-Rea e colaboradores observaram que havia relação do Ki-67 com invasão tumoral apenas nos tumores funcionantes, mas não notaram nenhuma correlação deste marcador com invasão, idade ou tamanho dos

ACNF[89]. Losa e colaboradores também não observaram relação do Ki-67 com o prognóstico, estes autores concluíram que a invasão tumoral observada nas imagens de RM previamente à cirurgia foi o fator preditivo mais forte de recorrência dos ACNF[87]. De acordo com Dubois e colaboradores o Ki-67 também não tem valor preditivo para recorrência ou progressão dos adenomas gonadotróficos; o diâmetro ântero-posterior e a idade do doente foram os fatores de risco com significado estatístico em sua casuística[90]. A maioria dos autores observou positividade mais elevada do Ki-67 nos tumores funcionantes do que nos ACNF[61,64,67,70,89] entretanto, esta conclusão não foi considerada por outros autores.[68,71,73,78]

Alguns autores observaram que há relação inversa entre o índice proliferativo dos tumores medido pelo Ki-67 e a faixa etária[**Erro! Indicador não definido.**,70,86,87,90]; enquanto outros não observaram esta correlação.[68,78,79,88,91]

No presente estudo o índice do Ki-67 pela IHQ foi maior que 3% em apenas quatro doentes (13%). Percentual semelhante ao observado por outros autores[68]. Estatisticamente não houve relação entre o Ki-67 maior que 3% e a invasão tumoral, tamanho do tumor ou idade do doente, o que talvez possa decorrer da dimensão da amostragem do grupo. O volume dos tumores foi maior no grupo em que o Ki-67 era negativo, o que talvez possa significar crescimento mais lento do tumor e quadro clínico insidioso retardando o diagnóstico.

Muitos autores observaram relação do Ki-67 com a invasão tumoral em grupo heterogêneo de doentes que incluiu tumores funcionantes e ACNFs; para grupos de doentes apenas com ACNFs a relação do Ki-67 foi maior com a velocidade de recrescimento e/ou recidiva pós-operatória, que não foram avaliadas no presente estudo.

O gene supressor tumoral P53 produz uma fosfoproteína que pode ser indicativa de prognóstico desfavorável em várias neoplasias humanas em que há elevado índice de proliferação. A expressão da proteína P53 também foi utilizada como marcador de proliferação celular e, portanto, de prognóstico dos adenomas hipofisários. Suliman e colaboradores[92] observaram associação entre a expressão da proteína P53 e o estado proliferativo dos adenomas hipofisários. Thapar e colaboradores demonstraram que positividade para a proteína P53 em 100% dos carcinomas, em 15% os adenomas invasivos e em nenhum adenoma não invasivo, e concluíram que esta proteína indica que o tumor tem comportamento mais agressivo, ou seja, que ela pode ser considerada marcador prognóstico, tanto em tumores funcionantes como em ACNF[93]. Estes autores também observaram índice de Ki-67 mais elevado nos tumores positivos para P53. Ferreira e colaboradores observaram correlação inversa entre a proteína P53 e o tamanho do tumor em ACNF[88].

Na presente casuística a pesquisa da proteína p53 por IHQ foi negativa em todos os tumores o que não permitiu análise da sua correlação com os fatores de agressividade tumoral ou idade dos doentes.

A BCL-2 prolonga a vida celular ao suprimir a apoptose em vários tecidos. Também previne a apoptose de células neoplásicas induzidas por várias modalidades terapêuticas como irradiação e quimioterapia.[94,95,96] Nakasu e colaboradores estudaram a expressão da proteína BCL-2 com a IHQ em 140 tumores intracranianos e espinais, incluindo-se 31 adenomas hipofisários. Estes autores classificaram estes tumores em quatro graus de acordo com a reação IHQ, como negativo ou três graus de positividade (±, +, ++). Dos seus 31 adenomas, 11 foram negativos, sete ±, um + e 12 ++. A maioria dos tumores difusamente positivos (++) eram funcionantes, ou seja,

oito dos 11 adenomas funcionantes e quatro dos 20 ACNF. Entretanto, este marcador não foi relacionado com a agressividade do adenoma. Adicionalmente os mesmos autores observaram relação inversa da proteína com o grau de malignidade dos gliomas[44].

Contrariamente, Faria e colaboradores observaram que a relação BCl-2 (anti-apoptótica) – Bax (pró-apoptótica) aumentava de acordo com a progressão maligna nos tumores astrocíticos humanos o que indicou que há predomínio da ação anti-apoptótica (super-expressão do BCl-2) nos fenótipos mais agressivos[97].

Por outro lado, Das e colaboradores não observaram correlação entre os indices de BCl-2 com subtipos histopatológicos do meduloblastoma[98].

Zhu e colaboradores[99] e Jiang e colaboradores[100] demonstraram que havia considerável inibição do crescimento tumoral e aumento da sensibilidade aos quimioterápicos em culturas de gliomas malignos após o bloqueio "antisense" da proteína BCl-2.

Sambaziotis e colaboradores correlacionaram a presença das proteínas BCL-2 e Bax com técnica de IHQ em 81 adenomas hipofisários com o índice de apoptose[46]. A proteina BCL-2 foi detectada tanto em tumores funcionantes como nos ACNF, mas apresentou valor mais elevado nestes últimos. Estes achados diferem dos de Nakasu e colaboradores[44], enquanto que a Bax foi mais detectada nos adenomas funcionantes. Adicionalmente, a relação BCL-2/Bax foi maior nos ACNF e nos microadenomas em relação aos funcionantes e macroadenomas. Os autores concluíram que estes genes podem ter papel na regulação dos mecanismos apoptóticos dos adenomas hipofisários[46].

Huang e colaboradores estudaram a expressão da Galetina 3, BCl-2 e Bax com RT-PCR e IHQ nos adenomas hipofisários demonstraram aumento da expressão dos dois primeiros nos tumores invasivos em relação aos não invasivos e que a expressão da Bax era semelhante nos dois grupos. A Galetina 3 correlacionou-se positivamente com o BCL-2, mas não com o Bax, que apresentou relação inversa ao Bcl-2. Os autores concluíram que a Galectina possa inibir a apoptose através da proteína BCl-2 e ter papel importante na proliferação dos adenomas, mas não relataram se os tumores avaliados eram funcionantes ou não funcionantes.[101]

Ozer e colaboradores avaliaram com técnica IHQ a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax e o fator de proliferação Ki-67 nos fragmentos de 41 adenomas hipofisários embebidos em parafina, sendo 15 deles ACNF que apresentaram expressão diminuída da Bcl-2 em relação aos tumores funcionantes[47]. Observaram que houve maior expressão do Bax nos tumores sem recidiva em relação aos recidivantes. Os autores concluíram que estas proteínas podem relacionar-se à função hormonal e ao controle do tumor[47].

No presente estudo, observou-se que havia expressão acentuadamente reduzida do RNAm dos genes, Bcl-2, Bax e caspase-3, em todos os tumores analisados, em relação aos encontrados no “pool” de hipófise normais. A pesquisa da proteína Bcl-2 por IHQ também foi positiva em apenas três doentes, o que não permitiu análise estatística de sua correlação com a agressividade dos tumores. No presente estudo, embora não tenha sido observada associação estatisticamente significativa entre a expressão de Bax ou Bcl-2 e a positividade da IHQ para qualquer hormônio, os valores de p foram menores que 0,10, talvez devido ao pequeno tamanho da amostra.

Esse achado concorda com a evidência de maior expressão destas proteínas nos tumores funcionantes em outros trabalhos.[47]

Adicionalmente observou-se correlação positiva entre os três genes, contrariamente ao observado por Huang e colaboradores que constataram relação inversa entre o Bcl-2 e o Bax.[101] Também não se observou correlação entre expressão gênica e idade dos doentes e volume ou invasão tumoral, conclusão que difere dos achados de Huang e colaboradores.[101]

Foi também analisada a relação da expressão do Bcl-2 / Bax nos mesmos tumores. Não se observou relação desta razão com a agressividade do tumor medida pela invasão ou volume tumoral. Apenas constatou-se que seis, dos oito doentes com predomínio do Bcl-2, apresentavam tumor invasivo contra 12 (54%) dos 22 com predomínio do Bax.

Apesar de não ter sido demonstrada relação direta ou inversa dos genes Bcl-2, Bax e caspase 3 com as características clínicas e morfológicas sugestivas de agressividade nos ACNF, a significativa menor expressão dos genes encontrada nos ACNF em relação à hipófise normal sugere que a apoptose exerce papel central na tumorigênese ou na progressão tumoral. É possível que esta menor expressão em relação à hipófise normal reflita que o fenômeno apoptótico é muito menos eficiente na célula tumoral do que na hipófise normal.

De acordo com resultados da pesquisa apresentada recentemente por Pinto e colaboradores[102] sobre tumores hipofisários, da qual participou o grupo da Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP, há participação de outro gene (iASPP) na cascata da apoptose.

A análise molecular dos genes estudados permite discussão extensa e ainda não encerrada que justifica a continuidade das pesquisas nesta área como tentativa de esclarecer o envolvimento da cascata apoptótica no resultado das intervenções terapêuticas. Foram realizados ensaios em que se utilizou técnicas de "microarray" para analisar milhares de genes do genoma humano que revelaram resultados interessantes e promissores quanto à análise dos adenomas hipofisários[103,104]. Shereen Ezzat, endocrinologista canadense, observou, de maneira elegante e didática a um jovem pesquisador, durante o Congresso da Sociedade Internacional de Patologia Hipofisária, no Japão, em outubro de 2009, que o 'microarray" é útil quando não se sabe onde procurar o defeito gênico; quando se procura a expressão de um gene específico, outras técnicas devem ser empregadas. Isto significa que, uma vez que a apoptose parece estar implicada no desenvolvimento ou progressão dos ACNF, como indicam os resultados do presente trabalho, é provável que estudos por "microarray" poderão auxiliar.

6.3. Considerações finais

Até a presente data, o modo mais eficaz e seguro de se tratar os doentes com ACNF é a cirurgia, utilizando-se a via mais adequada. Em muitos pacientes há necessidade de mais de um procedimento operatório.

Frequentemente os achados dos exames de imagem pós-operatória, mesmo realizados três a quatro meses após a cirurgia, para minimizar as alterações causadas pelo procedimento operatório, são duvidosos em relação à presença de resíduos do tumor o que torna o acompanhamento pós-operatório com exames de imagem seriados por vários anos obrigatório, uma que a recidiva ou recrescimento dos

adenomas hipofisários é comum e para muitos deles não há marcadores séricos conhecidos e confiáveis.

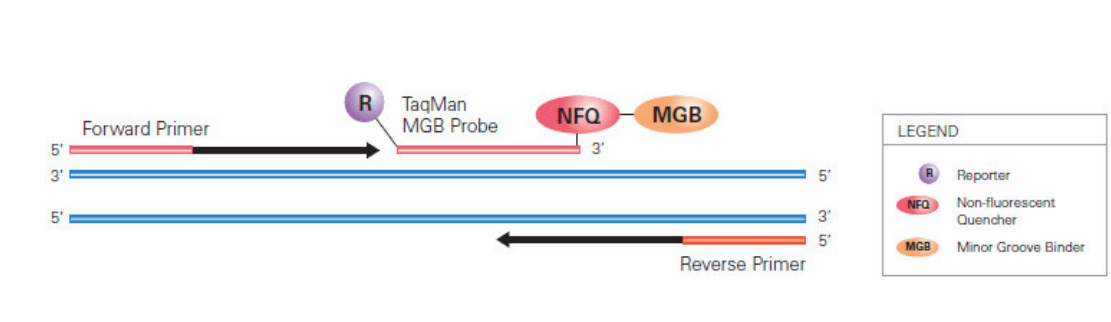
Os adenomas hipofisários residuais podem ser acompanhados quando estáveis ou quando presentes em pacientes mais idosos ou re-operados quando causam manifestações clínicas ou sofrem re-crescimento e forem abordáveis cirurgicamente ou irradiados quando já apresentarem características invasivas pré-operatórias e não houver possibilidade de cura. Dentre os ACNF, os tumores residuais, com localização não factível de cura cirúrgica e que apresentem IHQ positiva para ACTH devem ser irradiados após a cirurgia.

O tratamento dos adenomas hipofisários deve, preferencialmente, ser efetuado por grupo multidisciplinar composto por neurocirurgião, anestesista, endocrinologista, radiologista, patologista e radioterapeuta, entre outros, especialmente dedicados a esta área de atuação, para obtenção dos melhores resultados.

7. CONCLUSÕES

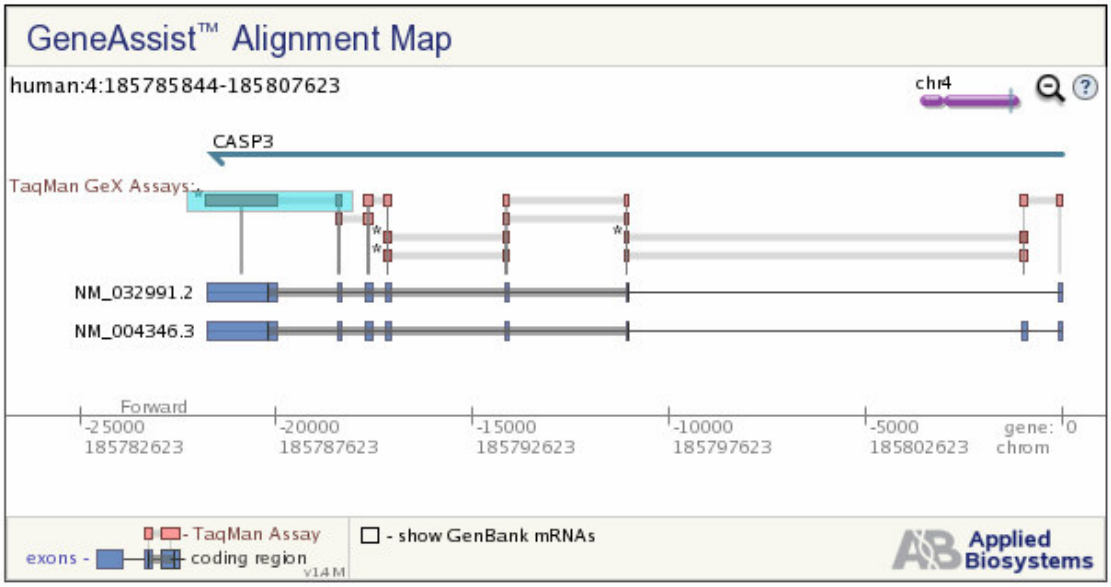
- Qualquer dos três métodos: maior diâmetro, soma das medidas máximas ou cálculo do volume são equivalentes para avaliar-se o tamanho tumoral dos adenomas hipofisários.
- A pesquisa do Ki-67 por IHQ não se correlacionou com idade ou agressividade dos ACNF.
- A pesquisa do P53 não foi útil na avaliação de agressividade dos ACNF.
- Houve baixa positividade da proteína Bcl-2 por IHQ nos ACNF.
- Ocorreu expressão muito inferior dos genes Bcl-2, Bax e caspase 3 nos ACNF em relação à expressão do tecido hipofisário normal. Houve correlação positiva entre os genes Bcl-2, Bax e caspase 3, mas nenhum deles se correlacionou com os fatores de agressividade: idade, tamanho e invasão do tumor.

Anexo A (página 1)

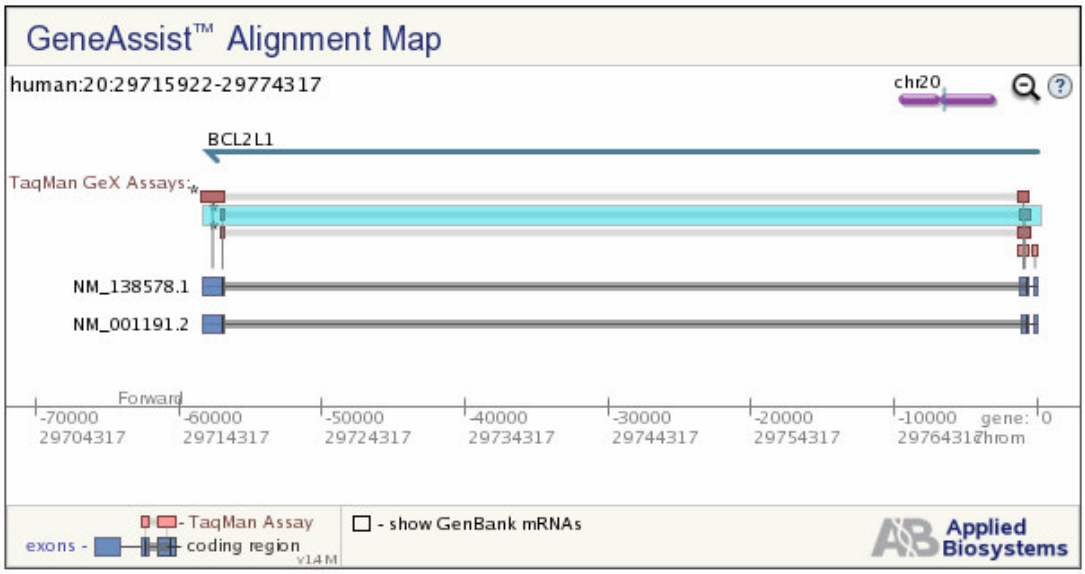


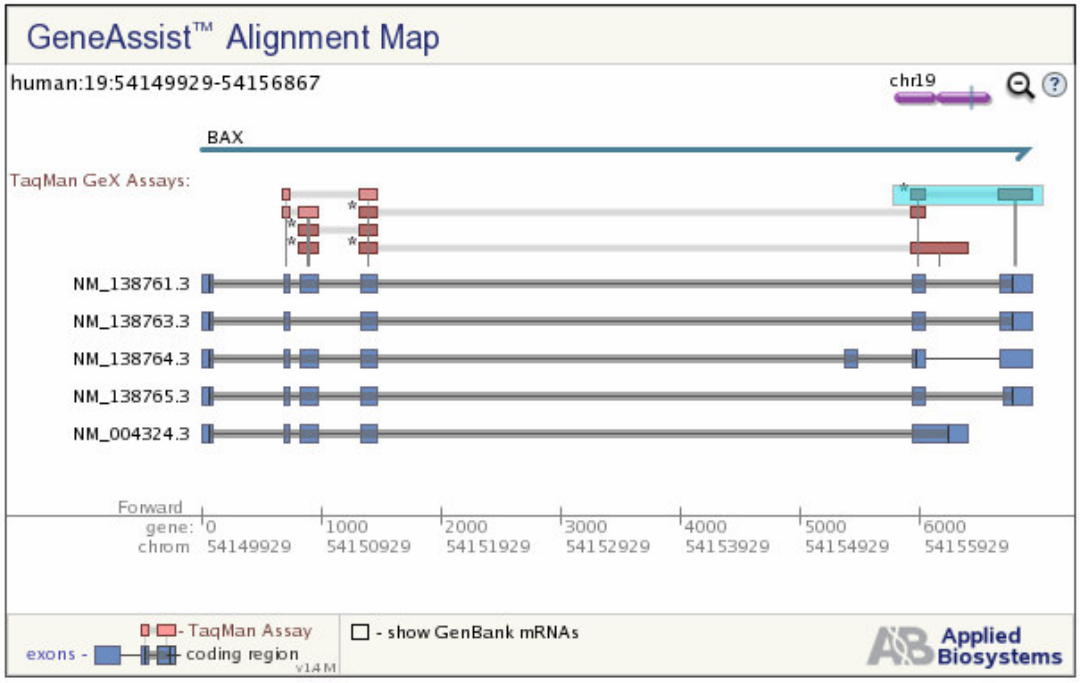
Ensaios TaqMan utilizados na análise de expressão

Nome do Gene	Símbolo	Ensaio
caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP3	Hs00263337_m1
BCL2-associated X protein	BAX	Hs00414514_m1
BCL2-like 1	BCL2L1	Hs00169141_m1



Anexo A (página 2)





Anexo B.

Concentração e grau de pureza do RNA extraído obtidos através de leitura em espectrofotômetro.

Paciente	iniciais	RNA concentração ng/µl	Relação 260/280 e 260/230
1	AMJ	4463,3	1,55 / 1,53
2	ALM	241,1	1,99 / 0,79
3	ASN	4625,6	1,14 / 1,16
4	ACB	4592,4	1,29 / 1,14
5	EML	4601,6	1,23 / 1,23
6	ERS	81,4	1,48 / 0,73
7	GAP	407,5	1,92 / 1,38
8	GJS	1420	1,74 /1,65
9	JAA	1749,9	2,04 / 0,61
10	JAS	4642,5	1,21 / 1,24
11	JBA	1456,8	1,89 / 0,85
12	JGS	4213,1	1,76 / 1,77
13	JPS	4060,1	1,83 / 1,70
14	JPL	844,8	2,01 / 1,34
15	JF	4630,2	1,22 / 1,18
16	MAS	175,1	1,93 / 1,18
17	MBS	2760,5	1,99 / 1,22
18	MIA	4496,7	1,46 / 1,44
19	MLC	472	1,93 / 0,69
20	MPS	1688,9	2,01 / 0,98
21	MTN	2877,3	1,94 / 1,74
22	MVG	4636,5	1,16 / 1,21
23	MA	143,3	2,01 / 0,26
24	PCO	3984,3	1,80 / 1,91
25	RDL	1382,1	1,99 / 1,45
26	SFO	4042,1	1,81 / 1,66
27	SFJ	1484,5	2,01 / 0,75
28	SLS	4638	1,09 / 1,10
29	TMS	4652,6	1,04 / 1,09
30	ZML	502,2	1,97 / 0,41

Anexo C. Expressão Gênica

no.	iniciais	ΔCT BAX	ΔCT Bcl2-like	ΔCT Caspase	ΔΔCT BAX	ΔΔCT Bcl2-like	ΔΔCT Caspase 3
1	AMJ	4.917.969.409.389.920	843.847.192.189.644	5.467.016.478.346.930	5.252.995.967.935.770	56.962.202.790.361.900	4.992.923.358.901.160
2	ALM	53.834.574.896.596.900	860.237.111.220.028	4.926.487.536.320.430	5.718.484.048.205.530	58.601.194.693.400.300	44.523.944.168.746.600
3	ASN	5.775.805.184.908.660	9.895.905.745.095.020	640.598.461.704.279	6.110.831.743.454.510	7.153.654.102.234.770	5.931.891.497.597.010
4	ACB	4.960.067.524.417.910	816.708.748.939.877	4.576.367.731.982.660	5.295.094.082.963.760	54.248.358.465.385.200	4.102.274.612.536.880
5	EML	5.973.882.081.914.720	8.568.582.129.616.050	5.534.671.291.695.770	6.308.908.640.460.570	5.826.330.486.755.810	50.605.781.722.500.000
6	ERS	38.267.634.626.414.300	838.712.598.003.925	491.150.268.126.589	4.161.790.021.187.270	5.644.874.337.179.000	4.437.409.561.820.110
7	GAP	32.100.934.506.403.000	843.040.294.263.728	5.893.550.699.729.330	35.451.200.091.861.400	5.688.151.299.777.030	5.419.457.580.283.550
8	GJS	4.757.189.315.063.960	8.579.085.277.721.420	48.474.741.637.105.800	509.221.587.360.981	5.836.833.634.861.170	4.373.381.044.264.810
9	JAA	63.716.155.953.379.900	9.673.962.936.781.950	6.493.435.157.291.480	6.706.642.153.883.840	6.931.711.293.921.700	6.019.342.037.845.710
10	JAS	37.362.062.526.199.700	7.404.843.176.723.180	6.706.678.994.288.400	4.071.232.811.165.820	46.625.915.338.629.400	45.281.000.567.092.700
11	JBA	6.002.013.136.624.440	10.356.596.361.442.100	46.699.644.031.722.200	633.703.969.517.029	7.614.344.718.581.900	6.232.585.874.842.630
12	JGS	4.874.594.792.000.110	8.415.424.876.319.180	49.083.549.917.076.900	5.209.621.350.545.960	5.673.173.233.458.930	4.195.871.283.726.450
13	JPS	5.042.915.614.873.280	8.288.107.287.048.690	500.219.317.615.505	5.377.942.173.419.130	5.545.855.644.188.440	4.972.483.335.861.550
14	JPL	4.606.737.536.171.860	8.604.122.547.643.330	5.446.576.455.307.320	4.941.764.094.717.710	5.861.870.904.783.090	4.434.261.872.261.920
15	JF	5.358.757.807.451.310	846.775.572.120.578	4.457.532.482.907.070	56.937.843.659.971.600	57.255.040.783.455.300	3.983.439.363.461.300
16	MAS	5.063.715.338.889.780	8.312.253.630.650.020	55.033.930.040.176.900	53.987.418.974.356.300	5.570.001.987.789.770	5.029.299.884.571.920
17	MBS	5.183.740.824.388.660	8.491.804.166.728.630	4.771.490.098.124.130	5.518.767.382.934.510	5.749.552.523.868.380	4.297.396.978.678.360
18	MIA	5.812.120.617.503.700	9.488.633.252.910.570	6.264.025.629.006.200	614.714.717.604.955	6.746.381.610.050.320	578.993.250.956.043
19	MLC	457.671.665.557.946	7.715.329.745.818.180	4.520.997.571.762.090	4.911.743.214.125.300	4.973.078.102.957.940	4.046.904.452.316.320
20	MPS	4.952.069.711.664.430	863.853.158.216.125	6.024.243.567.515.750	5.287.096.270.210.280	5.896.279.939.301.000	5.550.150.448.069.980
21	MTN	4.918.406.994.023.410	907.851.434.721.914	6.068.677.829.304.020	5.253.433.552.569.260	6.336.262.704.358.890	5.594.584.709.858.250
22	MVG	4.478.305.469.325.620	6.982.070.851.065.460	4.314.854.666.401.690	4.813.332.027.871.470	4.239.819.208.205.210	38.407.615.469.559.200
23	MA	5.053.291.506.238.010	79.018.830.692.861.200	5.050.880.564.186.370	53.883.180.647.838.600	5.159.631.426.425.870	4.576.787.444.740.590
24	PCO	5.418.903.101.362.170	9.284.421.129.092.410	6.254.672.758.740.770	5.753.929.659.908.020	6.542.169.486.232.160	5.780.579.639.294.990
25	RDL	37.821.715.771.311.800	6.811.037.845.018.620	3.801.660.105.439.370	4.117.198.135.677.030	4.068.786.202.158.380	3.327.566.985.993.600
26	SFO	5.601.423.128.978.550	8.298.955.991.319.140	5.373.113.609.636.310	59.364.496.875.244.000	5.556.704.348.458.890	4.899.020.490.190.540
27	SFJ	6.255.712.100.802.310	9.824.038.135.343.080	6.280.403.236.054.930	6.590.738.659.348.160	7.081.786.492.482.830	5.806.310.116.609.160
28	SLS	460.966.313.587.241	7.506.115.841.215.820	58.506.053.100.678.400	4.944.689.694.418.250	4.763.864.198.355.580	5.376.512.190.622.060
29	TMS	6.017.940.340.245.050	8.361.576.424.556.610	5.024.945.393.286.110	6.352.966.898.790.900	5.619.324.781.696.360	4.550.852.273.840.340
30	ZML	5.694.763.258.743.650	7.946.719.607.512.660	4.488.074.093.648.420	6.029.789.817.289.500	5.204.467.964.652.410	4.013.980.974.202.650

8. REFERÊNCIAS

[1] Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumors. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:97-126. Review.

[2] Pelletier G, Robert F, Hardy J,. Identification of human anterior pituitary cells by imunoelectron microscopy. *J Clin Endocrinol Metab* 1978, 46: 534-42.

[3] Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumors. *Endocrine Reviews* 1998, 19:798-827.

[4] Costello RT. Subclinical adenoma of the pituitary gland. *American Journal of Pathology* 1936, 12: 205-15.

[5] Burrow GN, Wotrzman G, Rewcastle NB et al. Microadenomas of the pituitary and abnormal sellar tomograms in an unselected autopsy series. *New England Journal of Medicine* 1981, 304: 156-8.

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

[7] Kontogeorgos G, Kovacs K, Horvath E, Scheithauer BW. Multiple adenomas of the human pituitary. A retrospective autopsy study with clinical implications. *J Neurosurg.* 1991;74(2):243-7.

[8] Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogeneesis of pituitary adenomas. *Endocrine Reviews.* 1998;19(6):798-827.

[9] Lloyd RV, Kovacs K, Young Jr WF, Farrell WE, Asa SL, Trouillas J, Kontogerogos G, Sano T, Scheithauer BW, Horvath E. Pituitary tumours: Introduction. In:DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, editores. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. Lyon: IARC Press; 2004. p.10-3.

[10] Tanaka Y, Hongo K, Tada T, Sakai K, Kakizawa Y, Kobayashi S. Growth pattern and rate in residual nonfunctioning pituitary adenomas: correlations among tumor volume doubling time, patient age, and MIB-1 index. *J Neurosurg*. 2003;98(2):359-65.

[11] Sano T, Yamada S, Watson Jr RE. Null cell adenoma. In:DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, editores. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. Lyon:IARC Press;2004. p.33-4.

[12] Cury ML, Fernandes JC, Machado HR, Elias LL, Moreira AC, Castro M. Non-functioning pituitary adenomas: clinical feature, laboratorial and imaging assessment, therapeutic management and outcome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(1):31-9.

[13] Laws ER, Jane JA Jr. Neurosurgical approach to treating pituitary adenomas. *Growth Horm IGF Res*. 2005;15 (Suppl A):S36-41.

[14] Alameda C, Lucas T, Pineda E, Brito M, Uria JG, Magallon R, Estrada J, Barcelo B. Experience in management of pituitary adenomas: indications for post-operative radiotherapy. *J Endocrinol Invest.* 2005; 28:18-22.

[15] Soto-Ares G, Cortet-Rudelli C, Assaker R, Boulinguez A, Dubest C, Dewailly D, Pruvo JP. MRI protocol technique in the optimal therapeutic strategy of non-functionaing pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*. 2002; 146: 179-86.

[16] Saeger W. Pituitary tumors. *Endocrine.* 2005;28(1):57-66.

[17] Meij BP, Lopes MB, Ellegala DB, Alden TD, Laws ER Jr. The long-term significance of microscopic dural invasion in 354 patients with pituitary adenomas treated with transsphenoidal surgery. *J Neurosurg.* 2002;96(2):195-208.

[18] Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Endocr Metab Clin North Am* 1999;28: 1-12.

[19] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;112: 925-31.

[20] Knudson AG. Retinoblastoma: a prototypic hereditary neoplasm. *Semin Oncol*. 1975; 5:57-60.

[21] Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg.* 1995;222(6):695-9.

[22] 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.

[23] McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, Heaney AP, Stratford AL, Khaira JS, Hussain S, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittoes NJ. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(9):4238-44.

[24] Vidal S, Kovacs K, Lloyd RV, Meyer FB, Scheithauer BW. Angiogenesis in patients with craniopharyngiomas: correlation with treatment and outcome. *Cancer.* 2002;94(3):738-45.

[25] 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.

[26] Gong J, Zhao Y, Abdel-Fattah R, Amos S, Xiao A, Lopes MB, Hussaini IM, Laws ER. Matrix metalloproteinase-9, a potential biological marker in invasive pituitary adenomas. *Pituitary.* 2008;11(1):37-48.

[27] Minematsu T, Suzuki M, Sanno N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY. PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas. *Endocr Pathol.* 2006;17(2):143-53.

[28] Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, Esiri MM, Wass JA, Harris AL. Proliferation, bcl-2 expression and angiogenesis in pituitary adenomas: relationship to tumour behaviour. *Br J Cancer.* 2000;82(8):1441-5.

---

[29] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.

[30] Kuan CY, Kuida K. Cell death in mammalian development. In: Yin XM, Dong Z, editors. Essentials of Apoptosis. New Jersey:Humana Press Inc.;2003.p.163-75.

[31] Mittler R, Shulaev V. Apoptosis in plants, yeast, and bacteria. In: In: Yin XM, Dong Z, editors. Essentials of Apoptosis. New Jersey:Humana Press Inc.;2003.p.125-33.

[32] Lewis K. Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(3):503-14.

[33] Wu YC, Xue D. Programmed cell death in *C. elegans*. In: Yin XM, Dong Z, editors. Essentials of Apoptosis. New Jersey:Humana Press Inc.;2003.p.135-44.

[34] Yin XM, Ding WX, Zhao Y. Bcl-2 family proteins. In: Yin XM, Dong Z, editors. Essentials of Apoptosis. New Jersey:Humana Press Inc.;2003.p.13-27.

[35] Shi Y. Structural biology of programmed cell death. . In: Yin XM, Dong Z, editors. Essentials of Apoptosis. New Jersey:Humana Press Inc.;2003.p.47-65.

[36] Batistatou A, Merry DE, Korsmeyer SJ, Greene LA. Bcl-2 affects survival but not neuronal differentiation of PC12 cells. *J Neurosci.* 1993;13(10):4422-8.

[37] Fisher TC, Milner AE, Gregory CD, Jackman AL, Aherne GW, Hartley JA, Dive C, Hickman JA. bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res.* 1993;53(14):3321-6.

[38] Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* 1990;348(6299):334-6.

[39] Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature.* 1993;361(6410):365-9.

[40] Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell.* 1991;67(5):879-88.

[41] Strasser A, Harris AW, Cory S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell.* 1991;67(5):889-99.

[42] Walton MI, Whysong D, O'Connor PM, Hockenbery D, Korsmeyer SJ, Kohn KW. Constitutive expression of human Bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993;53(8):1853-61.

[43] Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science.* 1993;262(5137):1274-7.

[44] Nakasu S, Nakasu Y, Nioka H, Nakajima M, Handa J. bcl-2 protein expression in tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 1994;88:520-526.

[45] Murphy BM, Martim SJ. Caspases. In: Yin XM, Dong Z, editors. Essentials of Apoptosis. New Jersey: Humana Press Inc.;2003.p.3-12

[46] Sambaziotis D, Kapranos N, Kontogeorgos G. Correlation of bcl-2 and bax with apoptosis in human pituitary adenomas.*Pituitary.* 2003;6(3):127-33.

[47] Ozer E, Canda MS, Ulukus C, Guray M, Erbayraktar S. Expression of Bcl-2, Bax and p53 proteins in pituitary adenomas: an immunohistochemical study. *Tumori.* 2003; 89(1):54-9.

[48] Lundin P, Pedersen F. Volume of pituitary macroadenomas: assessment by MRI. *J Comput Assist Tomogr.* 1992 Jul-Aug;16(4):519-28.

[49] 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.

[50] Cottier JP, Destrieux C, Brunereau L, Bertrand P, Moreau L, Jan M, Herbreteau D. Cavernous sinus invasion by pituitary adenoma: MR imaging. *Radiology.* 2000;215(2):463-9.

[51] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method. *Methods.* 2001;25:402-408.

[52] Dekkers OM, Pereira AM, Romijn JA. Treatment and follow-up of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Oct;93(10):3717-26.

[53] Ahmadi J, North CM, Segall HD, Zee CS, Weiss MH. Cavernous sinus invasion by pituitary adenomas. *AJR Am J Roentgenol.* 1986;146(2):257-62.

[54] Vieira JO Jr, Cukiert A, Liberman B. Magnetic resonance imaging of cavernous sinus invasion by pituitary adenoma diagnostic criteria and surgical findings. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62(2B):437-43.

[55] Goel A, Nadkarni T, Muzumdar D, Desai K, Phalke U, Sharma P. Giant pituitary tumors: a study based on surgical treatment of 118 cases. *Surg Neurol.* 2004 May;61(5):436-45; discussion 445-6

[56] Kurosaki M, Lüdecke DK, Flitsch J, Saeger W. Surgical treatment of clinically nonsecreting pituitary adenomas in elderly patients. *Neurosurgery.* 2000;47(4):843-8

[57] Saeger W. Proliferation markers and cell cycle inhibitors in pituitary adenomas. *Front Horm Res.* 2004;32:110-26.

[58] Thapar K, Kovacs K, Scheithauer BW, Stefaneanu L, Horvath E, Pernicone PJ, Murray D, Laws ER Jr. Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody. *Neurosurgery.* 1996;38(1):99-106

[59] Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV, Cusimano M. Ki-67 in pituitary neoplasms: a review--part I. Neurosurgery. 2009;65(3):429-37.

[60] Burger PC, Shibata T, Kleihues P. The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol.* 1986;10(9):611-7.

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

[62] Kitz K, Knosp E, Koos WT, Korn A. Proliferation in pituitary adenomas: measurement by MAb KI 67. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1991;53:60-4.

[63] Daita G, Yonemasu Y. Dural invasion and proliferative potential of pituitary adenomas. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1996;36(4):211-4.

[64] Thapar K, Kovacs K, Scheithauer BW, Stefaneanu L, Horvath E, Pernicone PJ, Murray D, Laws ER Jr. Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody. *Neurosurgery.* 1996;38(1):99-106.

[65] Pernicone PJ, Scheithauer BW, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, Young WF Jr, Lloyd RV, Davis DH, Guthrie BL, Schoene WC. Pituitary carcinoma: a clinicopathologic study of 15 cases. *Cancer.* 1997;79(4):804-12.

[66] Zhao D, Tomono Y, Nose T. Expression of P27kip1 and Ki-67 in pituitary adenomas: an investigation of marker of adenoma invasiveness. *Acta Neurochir (Wien).* 1999;141(2):187-92.

[67] 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.

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

[69] Wolfsberger S, Kitz K, Wunderer J, Czech T, Boecher-Schwarz HG, Hainfellner JA, Knosp E. Multiregional sampling reveals a homogenous distribution of Ki-67 proliferation rate in pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien).* 2004;146(12):1323-7.

[70] Wolfsberger S, Wunderer J, Zachenhofer I, Czech T, Böcher-Schwarz HG, Hainfellner J, Knosp E. Expression of cell proliferation markers in pituitary adenomas--correlation and clinical relevance of MIB-1 and anti-topoisomerase-IIalpha. *Acta Neurochir (Wien).* 2004;146(8):831-9.

[71] Mahta A, Haghpanah V, Lashkari A, Heshmat R, Larijani B, Tavangar SM. Non-functioning pituitary adenoma: immunohistochemical analysis of 85 cases. *Folia Neuropathol.* 2007;45(2):72-7.

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

---

[73] Shibuya M, Saito F, Miwa T, Davis RL, Wilson CB, Hoshino T. Histochemical study of pituitary adenomas with Ki-67 and anti-DNA polymerase alpha monoclonal antibodies, bromodeoxyuridine labeling, and nucleolar organizer region counts. *Acta Neuropathol.* 1992;84(2):178-83.

[74] Kawamoto H, Uozumi T, Kawamoto K, Arita K, Yano T, Hirohata T. Analysis of the growth rate and cavernous sinus invasion of pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien).* 1995;136(1-2):37-43.

[75] Abe T, Sanno N, Osamura YR, Matsumoto K. Proliferative potential in pituitary adenomas: measurement by monoclonal antibody MIB-1. *Acta Neurochir (Wien).* 1997;139(7):613-8.

[76] Mizoue T, Kawamoto H, Arita K, Kurisu K, Tominaga A, Uozumi T. MIB1 immunopositivity is associated with rapid regrowth of pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien).* 1997;139(5):426-31.

[77] Nakabayashi H, Sunada I, Hara M. Immunohistochemical analyses of cell cycle-related proteins, apoptosis, and proliferation in pituitary adenomas. *J Histochem Cytochem.* 2001;49(9):1193-4.

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

[79] Gejman R, Swearingen B, Hedley-Whyte ET. Role of Ki-67 proliferation index and p53 expression in predicting progression of pituitary adenomas. *Hum Pathol.* 2008;39(5):758-66.

[80] Ekramullah SM, Saitoh Y, Arita N, Ohnishi T, Hayakawa T. The correlation of Ki-67 staining indices with tumour doubling times in regrowing non-functioning pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien).* 1996;138(12):1449-55.

[81] Widhalm G, Wolfsberger S, Preusser M, Fischer I, Woehrer A, Wunderer J, Hainfellner JA, Knosp E. Residual nonfunctioning pituitary adenomas: prognostic value of MIB-1 labeling index for tumor progression. *J Neurosurg.* 2009 Sep;111(3):563-71.

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

[83] Buchfelder M, Fahlbusch R, Adams EF, Kiesewetter F, Thierauf P. Proliferation parameters for pituitary adenomas. *Acta Neurochir Suppl.* 1996;65:18-21.

[84] Hentschel SJ, McCutcheon E, Moore W, Durity FA. P53 and MIB-1 immunohistochemistry as predictors of the clinical behavior of nonfunctioning pituitary adenomas. *Can J Neurol Sci.* 2003;30(3):215-9.

[85] Yamada S, Ohyama K, Taguchi M, Takeshita A, Morita K, Takano K, Sano T. A study of the correlation between morphological findings and biological activities in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurosurgery.* 2007;61(3):580-4.

[86] Yonezawa K, Tamaki N, Kokunai T. Clinical features and growth fractions of pituitary adenomas. *Surg Neurol.* 1997;48(5):494-500.

[87] Losa M, Franzin A, Mangili F, Terreni MR, Barzaghi R, Veglia F, Mortini P, Giovanelli M. Proliferation index of nonfunctioning pituitary adenomas: correlations with clinical characteristics and long-term follow-up results. *Neurosurgery.* 2000;47(6):1313-8.

[88] Ferreira JE, de Mello PA, de Magalhães AV, Botelho CH, Naves LA, Nosé V, Schmitt F. Non-functioning pituitary adenomas: clinical features and immunohistochemistry. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005;63(4):1070-8.

[89] Jaffrain-Rea ML, Di Stefano D, Minniti G, Esposito V, Bultrini A, Ferretti E, Santoro A, Faticanti Scucchi L, Gulino A, Cantore G. A critical reappraisal of MIB-1 labelling index significance in a large series of pituitary tumours: secreting versus non-secreting adenomas. *Endocr Relat Cancer.* 2002;9(2):103-13.

[90] Dubois S, Guyétant S, Menei P, Rodien P, Illouz F, Vielle B, Rohmer V. Relevance of Ki-67 and prognostic factors for recurrence/progression of gonadotropic adenomas after first surgery. *Eur J Endocrinol.* 2007;157(2):141-7.

[91] Suzuki M, Minematsu T, Oyama K, Tahara S, Miyai S, Sanno N, Osamura RY, Teramoto A. Expression of proliferation markers in human pituitary incidentalomas. *Endocr Pathol.* 2006;17(3):263-75.

[92] Suliman M, Royds J, Cullen D, Timperley W, Powell T, Battersby R, Jones TH. Mdm2 and the p53 pathway in human pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001;54(3):317-25.

[93] Thapar K, Scheithauer BW, Kovacs K, Pernicone PJ, Laws ER Jr. p53 expression in pituitary adenomas and carcinomas: correlation with invasiveness and tumor growth fractions. *Neurosurgery.* 1996;38(4):765-70.

[94] Fisher TC, Milner AE, Gregory CD, Jackman AL, Aherne GW, Hartley JA, Dive C, Hickman JA. bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res.* 1993;53(14):3321-6.

[95] Reed JC, Meister L, Tanaka S, Cuddy M, Yum S, Geyer C, Pleasure D. Differential expression of bcl2 protooncogene in neuroblastoma and other human tumor cell lines of neural origin. *Cancer Res.* 1991;51(24):6529-38.

[96] Walton MI, Whysong D, O'Connor PM, Hockenbery D, Korsmeyer SJ, Kohn KW. Constitutive expression of human Bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993;53(8):1853-61.

[97] Faria MHG, Patrocínio RMSV, Moraes Filho MO, Rabenhorst SHB. Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42(4):271-8.

[98] Das P, Puri T, Suri V, Sharma MC, Sharma BS, Sarkar C. Medulloblastomas: a correlative study of MIB-1 proliferation index along with expression of c-Myc, ERBB2, and anti-

apoptotic proteins along with histological typing and clinical outcome. *Childs Nerv Syst.* 2009;25(7):825-35.

[99] Zhu CJ, Li YB, Wong MC. Expression of antisense bcl-2 cDNA abolishes tumorigenicity and enhances chemosensitivity of human malignant glioma cells. *J Neurosci Res.* 2003;74(1):60-6.

[100] Jiang Z, Zheng X, Rich KM. Down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL expression with bispecific antisense treatment in glioblastoma cell lines induce cell death. *J Neurochem.* 2003;84(2):273-81.

[101] Huang CX, Hou YH, Liu YS. Expression of galectin-3 correlates with apoptosis in pituitary adenoma cells. *Neurosci Bull.* 2008;24(1):34-8.

[102] Pinto EM, Lu X, Musolino NRC, Soares IC, Wakamatsu A, Cescato VAS, Oliveira E, Salgado LR, Bronstein MD. Signaling pathway in pituitary tumorigenesis: evidence for interaction between iASPP andNFKappaB p656 subunit. Annals of the 91st Annual Meeting (Presented at 91st Annual Meeting of The Endocrine Society; Abstracts Washington, USA 2009, June 10-13).

[103] Ruebel KH, Leontovich AA, Jin L, Stilling GA, Zhang H, Qian X, Nakamura N, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV. Patterns of gene expression in pituitary carcinomas and adenomas analyzed by high-density oligonucleotide arrays, reverse transcriptase-quantitative PCR, and protein expression. *Endocrine.* 2006;29(3):435-44.

[104] Bottoni A, Zatelli MC, Ferracin M, Tagliati F, Piccin D, Vignali C, Calin GA, Negrini M, Croce CM, Degli Uberti EC. Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *J Cell Physiol.* 2007;210(2):370-7.