

CLARISSA GROBERIO BORBA HERKENHOFF

**Avaliação dos marcadores das vias de apoptose e proliferação
celular em somatotropinomas invasivos e/ou resistentes ao
tratamento com ligantes do receptor de somatostatina**

Versão Original

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

Área de Concentração: Endocrinologia

Orientadora: Dra. Raquel Soares Jallad

São Paulo

2022

CLARISSA GROBERIO BORBA HERKENHOFF

**Avaliação dos marcadores das vias de apoptose e proliferação
celular em somatotropinomas invasivos e/ou resistentes ao
tratamento com ligantes do receptor de somatostatina**

Versão Original

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

Área de Concentração: Endocrinologia

Orientadora: Dra. Raquel Soares Jallad

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Herkenhoff, Clarissa Grobério Borba
Avaliação dos marcadores das vias de apoptose e
proliferação celular em somatotropinomas invasivos
e/ou resistentes ao tratamento com ligantes do
receptor de somatostatina / Clarissa Grobério Borba
Herkenhoff. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado) --Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Raquel Soares Jallad.

Descritores: 1. Acromegalia 2. Somatostatina 3.
Apoptose 4. Proliferação de células 5. Survivina 6.
Neoplasias hipofisárias

USP/FM/DBD-197/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Para Renato e Cecília,
amores da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado a vida e ter me conduzido até aqui para a realização deste sonho.

Ao Renato, meu amor, e, com certeza, o meu maior incentivador! Pelo compartilhamento tão igual das nossas vidas, pelo apoio incansável, compreensão e por cuidar tão bem de mim e da nossa família. Meu crescimento pessoal e profissional se deve em grande parte a ele.

À Cecília, que ao longo desta tese me tornou aquilo que eu mais amo ser: mãe. Ela me trouxe leveza, sorrisos e novos e importantes desafios. Me alimentou diariamente com amor e paz.

Aos meus pais, Graça e Paulo, e meus irmãos Rodrigo, Marcela e Paula por acreditarem em mim e no meu sonho, sempre me incentivando a seguir adiante. Essa vitória é nossa!

À minha orientadora Dra. Raquel Jallad, pela confiança e estímulo durante o processo de orientação. O exemplo da medicina que a Sra exerce ficará marcado em mim para sempre.

Ao Dr. Marcelo Bronstein, chefe da Unidade de Neuroendocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo exemplo acadêmico e conhecimentos compartilhados.

Aos demais assistentes, em especial aos queridos Dr. Rafael Loch e Dra. Ericka Trarbach. Vocês dois me ofereceram não apenas conhecimento, mas também amizade, afeto e colo em diversos momentos deste caminho.

Às companheiras de pós-graduação Paula Paes e Isabella Pacetti pelo incentivo e cooperação científica.

À Alda e Aline, pela paciência e cuidado na realização das reações de imunohistoquímica.

Ao Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, pela gentileza em me ceder os anticorpos necessários para a realização desta tese.

Ao Dr. Iberê Cauduro, pelo conhecimento compartilhado e pelo exemplo de dedicação.

À Cida e a Rosana, pelo auxílio desde o início da elaboração desta tese.

À banca do exame de qualificação pela preciosa ajuda na construção desta tese.

Por fim, agradeço a cada paciente por contribuir na minha formação e, em especial, àqueles que participaram voluntariamente deste estudo.

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho” (Abraham Lincon).

RESUMO

Herkenhoff CGB. Avaliação dos marcadores das vias de apoptose e proliferação celular em somatotropinomas invasivos e/ou resistentes ao tratamento com ligantes do receptor de somatostatina [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: A acromegalia é uma doença rara, causada na maioria dos casos por um adenoma hipofisário secretor de hormônio do crescimento (GH) e consequente elevação sérica do fator de crescimento similar à insulina 1 (IGF-1). O tratamento de escolha é cirúrgico. A taxa de cura cirúrgica é de aproximadamente 40-70% e assim um grande contingente de pacientes necessita de tratamento medicamentoso adjuvante com Ligantes do Receptor de Somatostatina (LRS). Entretanto, a resposta a estas drogas varia de 30-50%. Fatores prognóstico de resposta aos LRS já foram descritos, todavia não explicam a totalidade dos casos. **Objetivos:** Avaliar as vias de apoptose e proliferação celular em somatotropinomas invasivos e/ou resistentes ao tratamento com os LRS. **Métodos:** Em uma coorte de 52 pacientes tratados primariamente com cirurgia foram avaliados por imuno-histoquímica (IHQ) os seguintes marcadores: receptores de somatostatina subtipos 2 e 5 (SSTR2 e SSTR5); marcadores das vias de apoptose e proliferação celular (survivina e 4EBP-1, respectivamente); proteínas do citoesqueleto (filamina e E-caderina); Ki-67; e citoqueratina 18 (CK18) para análise da granulação tumoral. Os achados foram correlacionados com os dados clínicos, laboratoriais e de imagem. **Resultados:** Baixa expressão de survivina ($P=0,04$), idade mais jovem ($P=0,01$), tumores ao diagnóstico com hiperssinal em imagem de ressonância magnética ponderada em T2 ($P=0,01$), granulação esparsa ($P=0,04$), GH e IGF-1 pós-operatórios elevados ($P=0,04$ e $P<0,01$, respectivamente) e maior resto tumoral ($P=0,02$) foram associados aos LRS resistentes. Pacientes mais jovens, níveis basais de GH e IGF-1 mais elevados e maior diâmetro tumoral basal foram fatores associados a invasão tumoral ($P=0,03$; $P=0,01$; $P=0,02$ e $P=0,04$, respectivamente). Menor remissão cirúrgica e baixa expressão de SSTR2 e de E-caderina também se associaram a tumores invasivos ($P<0,001$; $P=0,03$ e $P=0,04$). A menor expressão de survivina e de E-caderina associaram-se a tumores esparsamente granulados ($P=0,03$; $P=0,03$, respectivamente), enquanto a elevada expressão de 4EBP-1 também foi associada a

este padrão de granulação ($P < 0,01$). Conclusão: A baixa expressão de survivina surge como um novo marcador de resistência aos LRS e abre uma nova visão para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novas opções de tratamento.

Palavras-chave: Acromegalia. Somatostatina. Apoptose. Proliferação de células. Survivina. Neoplasias hipofisárias.

ABSTRACT

Herkenhoff CGB. Evaluation of markers of apoptosis and cell proliferation pathways in invasive somatotropinomas and/or resistant to treatment with somatostatin receptor ligands [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Introduction: Acromegaly is a disease caused in most cases by a growth hormone (GH)-secreting pituitary adenoma and consequent elevation of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in serum. The treatment of choice is surgical. The surgical cure rate is approximately 40-70% and thus a large contingent of patients require adjuvant drug treatment with Somatostatin Receptor Ligands (SRLs). However, the response to these drugs varies from 30-50%. Prognostic factors of response to LRS have already been described, however, they do not explain all cases. Objectives: To evaluate the pathways of apoptosis and cell proliferation in invasive somatotropinomas and/or resistance to treatment with LRS. Methods: A cohort of 52 patients treated primarily with surgery was evaluated clinically, through laboratory and imaging (magnetic resonance imaging-MRI). Subsequently, immunohistochemical analysis (IHC) of the following markers was performed: somatostatin receptors 2 and 5 (SSTR2 and SSTR5); markers of apoptosis and cell proliferation pathways (survivin and 4EBP-1, respectively); cytoskeletal proteins (filamin and E-cadherin); KI-67; and CK18 for analysis of tumor granulation. Results: Low expression of survivin ($P=0.04$), younger age ($P=0.01$), tumors with hypersignal on T2-weighted magnetic resonance imaging ($P=0.01$), sparse granulation ($P=0.04$), elevated postoperative GH and IGF-1 levels ($P=0.04$ and $P<0.01$, respectively) and greater tumor remnants ($P=0.02$) were associated with LRS resistance. Lower expression of survivin and e-cadherin were associated with sparsely granulated tumors ($P=0.03$; $P=0.03$, respectively), while high expression of 4EBP-1 was associated with this granulation pattern ($P<0.01$). Younger patients, with high baseline levels of GH and IGF-1 and greater baseline tumor diameter were factors associated with tumor invasion ($P=0.03$; $P=0.01$; $P=0.02$ and $P=0.04$, respectively). Lower surgical remission and low expression of SSTR2 and E-cadherin were also associated with invasive tumors ($P<0.001$; $P=0.03$ and $P=0.04$). Conclusion: The low expression of survivin appears as a new marker of resistance to

LRS. The description and correlation of intracellular pathways with resistance to the main drugs for the treatment of acromegaly open a new vision for future research lines.

Keywords: Acromegaly. Somatostatin. Apoptosis. Cell proliferation. Survivin. Pituitary neoplasms.

LISTAS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Manifestações clínicas da acromegalia.....	24
Quadro 2 - Classificação imuno-histoquímica dos somatotropinomas	28
Quadro 3 - Propriedades de ligação da somatostatina -14 e dos ligantes sintéticos aos receptores de somatostatina.	31
Quadro 4 - Definição de resposta ao tratamento com ligantes do receptor de somatostatina	32
Quadro 5 - Marcadores das vias de proliferação e apoptose celular em diversos tipos de tumores	41
Quadro 6 - Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica com seus respectivos registros internacionais.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação neuro-radiológica de Knosp-Steiner atualizada.	26
Figura 2 - Fatores preditivos de resposta aos ligantes do receptor de somatostatina	33
Figura 3 - Vias extrínseca e intrínseca da apoptose celular.....	34
Figura 4 - Vias de proliferação celular.....	40
Figura 5 - Desenho do estudo.....	49
Figura 6 - Lâmina corada com hematoxilina e eosina do TMA-1 (a) e TMA-2 (b).....	53
Figura 7 - Resultados das análises de imuno-histoquímica de amostras de somatotropinomas para os marcadores survivina, CK18 e SSTR2.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Boxplots do nível de expressão proteica dos marcadores (survivina, 4EBP1, SSTR2, SSTR5, E-caderina e filamina) entre somatotropinomas LRS resistentes e LRS responsivos.	62
Gráfico 2 - Gráfico de barras mostrando a distribuição de (a) DGA e SGA, P=0,041 e (b) T2W, P=0,01 entre somatotropinomas LRS resistentes e LRS responsivos.	62
Gráfico 3 - Matriz de correlação de Spearman´s entre as variáveis selecionadas e a expressão proteica dos marcadores avaliados nos somatotropinomas (a) antes e (b) depois do tratamento com LRS. As correlações significantes são mostradas em preto.....	63
Gráfico 4 - Gráficos de dispersão mostrando a diferença nos níveis sérios basais de (a) GH e IGF-1 e (b) do diâmetro tumoral pré e pós-operatórios entre os tumores invasivos e não invasivos.	66
Gráfico 5 - Gráfico de barras mostrando a diferença na taxa de remissão entre tumores invasivos e não invasivos, P<0,001.....	66
Gráfico 6 - Boxplots do nível de expressão proteica dos marcadores (survivina, 4EBP1, SSTR2, SSTR5, E-caderina e filamina) entre somatotropinomas invasivos e não invasivos.	67
Gráfico 7 - Boxplots do nível de expressão proteica dos marcadores selecionados (survivina, 4EBP1, SSTR2, SSTR5, E-caderina e filamina) entre DGA e SGA.....	69
Gráfico 8 - Gráficos de dispersão mostrando a diferença nos níveis séricos de GH (pré e pós-cirúrgico), IGF-1 e diâmetro tumoral basais entre os somatotrofinomas com sinal T2W-hipo, T2W-hiper e T2W-iso.	70
Gráfico 9 - Boxplots do nível de expressão proteica dos marcadores selecionados (survivina, 4EBP1, SSTR2, SSTR5, E-caderina e filamina) entre somatotropinomas com T2W-hipo, T2W-hiper e T2W-iso.....	72
Gráfico 10 - Gráficos de dispersão mostrando a diferença nos níveis séricos de GH, IGF-1 e diâmetro tumoral basais e idade de diagnóstico entre casos com e sem remissão cirúrgica.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas, imuno-histopatológicas e de imagem dos pacientes	58
Tabela 2 - Imunoreatividade da survivina, 4EBP1, SSTR2, SSTR5, E-caderina e filamina em somatotropinomas e hipófises normais	59
Tabela 3 - Comparação entre as características clínicas, imuno-histopatológicas e de imagem entre pacientes LRS resistentes e LRS responsivos	61
Tabela 4 - Comparação entre as características clínicas, imuno-histopatológicas e de imagem entre pacientes com tumores invasivos e não invasivos	65
Tabela 5 - Comparação entre as características clínicas, imuno-histopatológicas e de imagem entre tumores densamente e esparsamente granulados (DGA e SGA, respectivamente).	68
Tabela 6 - Comparação entre as características clínicas e imuno-histopatológicas em tumores com diferentes sinais na imagem de ressonância magnética ponderada em T2	71
Tabela 7 - Comparação entre as características clínicas, imuno-histopatológicas e de imagem entre pacientes com remissão após o tratamento cirúrgico.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4EBP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AD	Agonistas dopaminérgicos
AIP	<i>Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein</i>
Akt	Proteína quinase b
Apaf-1	Fator de ativação de apoptose 1
ARGH	Antagonistas do Receptor de GH
ATP	Adenosina trifosfato
Bak	<i>Bcl-2 Associated Killer</i>
BAX	Proteína X associada a Bcl-2
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
Bcl-XL	B cell lymphoma extra large
Bid	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CK18	Citoqueratina 18
Cdc-2	Quinase dependente de ciclina 1
CK	Citoqueratina
CTS	Cirurgia transesfenoidal
D2R	Receptor 2 de dopamina
DGA	Adenoma densamente granuloso
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eIF4G	eukaryotic initiation factor 4G
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
ER α	Receptor de estrógeno alfa
FC	Fator de crescimento
FLNA	Filamina
G1	Primeiro <i>gap</i> da interfase do ciclo celular
G2/M	Intervalo entre a fase S e início da mitose
GH	Hormônio do crescimento
GH4C1	Linhagem celular mamosomatotrófica isogênica

GHRH	Hormônio liberador de hormônio do crescimento
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GSK3 β	Glicogênio sintase quinase 3B
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da da Universidade de São Paulo
IAP	Proteínas Inibidoras da Apoptose
IGA	Adenoma de granulação intermediária
IGF-1	Fator de crescimento similar à insulina 1
IHQ	Imuno-histoquímica
IRS	Escore de imunorreatividade
Ki67 ou MIB-1	<i>E3 ubiquitin-protein ligase MIB1</i>
LRS	Ligantes do Receptor de Somatostatina
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia-1</i>
Mdm-2	<i>Murine Double Minute 2</i>
MEK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>
mLST8	<i>Mammalian Lethal with Sec-13 Protein 8</i>
mRNA	RNA mensageiro
mSin1	<i>Mammalian-Stress Activated Map interacting Protein 1</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
mTORC1	Complexo mTOR 1
mTORC2	Complexo mTOR 2
P70 S6K	P70 ribossomal S6 kinase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
Pit-1	Fator de transcrição 1 da hipófise
PRAS40	<i>Proline-Rich Akt Substrat 40kDA</i>
PRL	Prolactina
PTEN	<i>Phosphatase with tensin homology</i>
Raf	Proteínas-quinases relacionadas com oncogenes retrovirais
Raptor	<i>Regulatory associated protein of mTOR</i>
Ras	Proteínas oncogênicas de vírus tumorais
Rictor	<i>Rapamycin Insensitive Companion of mTOR</i>
RM	Ressonância magnética
rTNF	Receptores de fatores de necrose tumoral

SGA	Adenoma esparsamente granuloso
SH2	Proteína tirosina quinase com domínios homólogos a Src
SHBG	Globulina ligadora de hormônios sexuais
SMAC/DIABLO	Segundo ativador de caspase derivado de mitocôndria/ Inibidor direto da proteína de ligação à apoptose
SHP	Pequeno heterodímero hepático
SST	Somatostatina
SSTR	Subtipo de receptor da somatostatina
T1W	Imagem de ressonância magnética ponderada em T1
T2W	Imagem de ressonância magnética ponderada em T2
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TL	Testosterona Livre
TMA	Micromatriz tecidual
TMD	Domínio transmembrana
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
TSH	Hormônio tireotrófico
TT	Testosterona Total

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Acromegalia.....	24
1.2	Ligantes do receptor de somatostatina.....	29
1.2.1	Aspectos gerais.....	29
1.2.2	Resistência aos ligantes de somatostatina.....	31
1.3	Homeostase tecidual.....	33
1.3.1	Apoptose celular.....	33
1.3.1.1	Marcador celular de apoptose.....	35
1.3.2	Proteínas do citoesqueleto.....	36
1.3.3	Proliferação celular.....	38
1.3.3.1	Receptores de tirosina-quinase.....	38
1.3.3.2	Via PI3K/Akt/mTOR.....	38
2	OBJETIVOS.....	42
2.1	Primário.....	43
2.2	Secundários.....	43
3	JUSTIFICATIVA.....	44
3.1	Perspectivas.....	45
4	PACIENTES E MÉTODOS.....	46
4.1	Considerações éticas.....	47
4.2	Tipo do estudo.....	47
4.3	Desenho do estudo.....	47
4.4	Casuística.....	47
4.4.1	Critérios de inclusão.....	47
4.4.2	Critérios de exclusão:.....	48
4.5	Metodologia.....	50
4.5.1	Avaliação clínica.....	50

4.5.2	Parâmetros laboratoriais.....	50
4.5.3	Diagnóstico por imagem	51
4.5.4	Análise histopatológica diagnóstica.....	52
4.5.5	Crítérios clínicos de resposta ao tratamento.....	52
4.5.6	Micromatriz tecidual (TMA).....	53
4.5.7	Análise imuno-histoquímica dos marcadores Ki-67, SSTR2, SSTR5, CK18, survivina, 4EBP-1, filamina e E-caderina.....	54
4.6	Análise estatística.....	55
5	RESULTADOS	56
5.1	Caracterização clínica, anatomopatológica e de imagem dos pacientes.....	57
5.2	Expressão dos marcadores survivina, 4-EBP1, CK18, SSTR2, SSTR5, E-caderina, filamina em somatotrofinomas e na hipófise normal	57
5.3	Tumores LRS resistentes <i>versus</i> LRS responsivos: marcadores imuno-histoquímicos, parâmetros clínicos/hormonais e tumorais	59
5.4	Tumores invasivos <i>versus</i> não invasivos: marcadores imuno-histoquímicos, parâmetros clínicos/hormonais e tumorais	64
5.5	Outras associações	67
5.5.1	Padrão de granulação tumoral	67
5.5.2	Ressonância magnética ponderada em T2	69
5.5.3	Remissão cirúrgica	72
5.6	Adenomas gigantes	73
6	DISCUSSÃO.....	75
7	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
	APÊNDICES.....	107
	ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acromegalia

A acromegalia é uma doença sistêmica crônica resultante da hipersecreção de hormônio do crescimento (GH) e, conseqüentemente, do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1)^{1; 2}. É uma doença rara^{3; 4}, geralmente acomete ambos os sexos na mesma proporção e o diagnóstico é realizado entre 30 e 50 anos de idade, com um retardo médio de 5 anos⁴.

Na grande maioria dos casos ($\geq 95\%$) a doença é causada por um tumor hipofisário benigno (adenoma) secretor de GH, denominado somatotropinoma. Em casos muito raros pode ocorrer hipersecreção extra-hipofisária de GH ou do hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH) por um tumor de células das ilhotas pancreáticas, carcinoide brônquico ou linfoma não-Hodgkin⁵.

As manifestações da acromegalia são decorrentes dos efeitos locais do tumor hipofisário e das ações periféricas da hipersecreção crônica de GH/IGF-1 (Quadro 1). O desenvolvimento de comorbidades pela hipersecreção hormonal contribui para o aumento da morbi-mortalidade nestes pacientes⁵.

Quadro 1 - Manifestações clínicas da acromegalia

Mudanças físicas	Efeitos locais do tumor
Macroglossia	Cefaleia
Prognatismo	Deficiência visual
Aumento de extremidades	Hipopituitarismo
Aumento de partes moles	Hiperprolactinemia
Bócio	Compressão de pares cranianos
Alterações metabolismo de carboidratos	Alterações de pele
Diabetes Mellitus	Acantose nigricans
Dislipidemia	Acne
Complicações respiratórias	Complicações gastrointestinais
Apneia do sono	Pólipos colônicos
Ronco excessivo	Dolicomegacolon
Complicações musculoesqueléticas	Complicações cardiovasculares
Síndrome do túnel do carpo	Hipertensão arterial
Artropatia	Cardiomiopatia
Osteoporose	Arritmias
Fratura vertebral	Doença valvar

Fonte: Adaptado de Vieira Neto, L 2011⁶

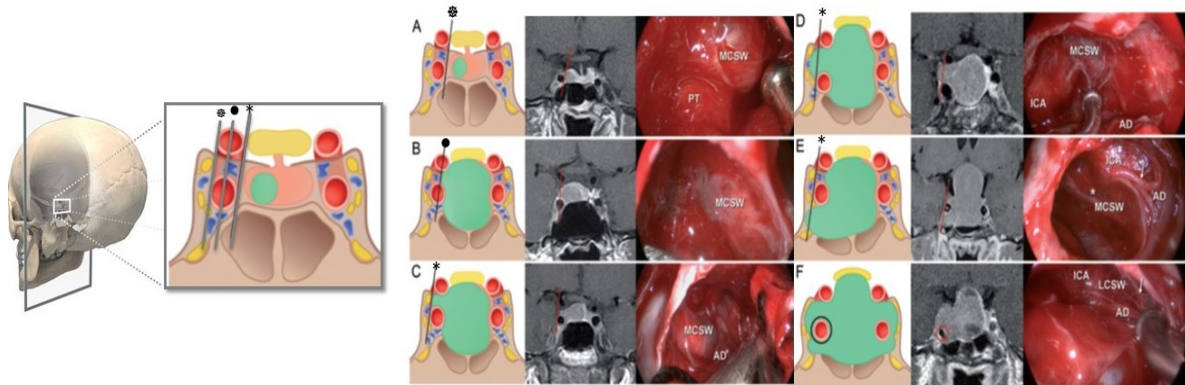
O diagnóstico bioquímico da acromegalia é baseado na hipersecreção autônoma de GH e níveis séricos elevados de IGF-1^{5; 7; 8}. Devido à pulsatilidade e à meia-vida curta do GH, amostras aleatórias isoladas de GH não são recomendadas

para diagnóstico de acromegalia^{5; 8; 9}. Em contraste, os níveis séricos de IGF-1 são relativamente estáveis, mostram uma correlação logarítmica-linear com o GH e têm uma meia-vida longa, cerca de 15-18 horas¹⁰. Na ausência de fatores interferentes, valores de IGF-1 dentro do intervalo normal ajustado para a idade e gênero, praticamente excluem o diagnóstico de acromegalia^{5; 11; 12; 13; 14}. Em situações nas quais os valores séricos de IGF-1 se encontram discretamente acima do limite superior da normalidade, é necessário demonstrar a ausência de supressão de GH para valores menores que 0,4 µg/L após hiperglicemia documentada durante o teste oral de tolerância à glicose (TOTG)⁵. Ressalta-se que há uma variabilidade inter e intra-individual entre os diferentes imunoenaios de IGF-1¹⁵, de forma que as dosagens devem ser realizadas, preferencialmente, no mesmo laboratório durante o monitoramento hormonal de longo prazo⁵.

Após confirmação bioquímica, avaliação por imagem da região selar é recomendada. A tomografia computadorizada (TC) foi suplantada pela ressonância magnética (RM), sendo realizada apenas quando esta é contraindicada, indisponível, e/ou quando há necessidade de avaliação da presença de erosão óssea da sela túrcica⁵. Baseado no diâmetro máximo do tumor, os adenomas hipofisários podem ser classificados em microadenomas (diâmetro < 1 cm) e macroadenomas (diâmetro ≥ 1 cm)¹⁶.

Duas classificações radiológicas contemplam a variabilidade no padrão do crescimento tumoral^{17; 18; 19; 20}. A classificação de Wilson-Hardy avalia o padrão de crescimento craniocaudal e lateral do tumor^{17; 18}. A classificação de Knosp gradua a extensão parasselar do tumor em relação ao seio cavernoso e a artéria carótida intracavernosa¹⁹. Esta classificação foi reavaliada na era da neuroendoscopia^{20; 21}. Os graus intermediários foram considerados consistentemente menos envolvidos em comparação com aquele determinado por inspeção microscópica. O risco atualizado de invasão do seio cavernoso foi de 1,5% para o grau 1; 9,9% para o grau 2; 37,9% para o grau 3; e 100% para tumores de grau 4. O grau 3 é dividido em 3A e 3B para distinguir o envolvimento dos compartimentos do seio cavernoso superior e inferior, respectivamente. A taxa de invasão é significativamente diferente, 26,5% no grau 3A e 70,6% no grau 3B^{20; 21} (Figura 1). Os tumores hipofisários de grau 3 e 4 são considerados invasivos.

Figura 1 - Classificação neuro-radiológica de Knosp-Steiner atualizada.



Desenhos gráficos (esquerda), imagens coronais na ressonância magnética (centro) e visão endoscópica (direita) do seio cavernoso e estruturas adjacentes. Três linhas são traçadas entre as partes supra (ACIS) e intracavernosas da artéria carótida interna (ACII): linha medial (conecta a parede medial das ACIS e ACII); linha mediana (intercarotídea - traçada entre os centros transversais das ACIS e ACII); linha lateral (conecta as paredes laterais das ACIS e ACII). A: Grau 0: o tumor não ultrapassa a linha medial; B: Grau 1: o tumor ultrapassa a linha medial, mas não atinge a linha mediana; C: Grau 2: o tumor se estende além da linha mediana, mas não ultrapassa a linha lateral; D: Grau 3A: o tumor se estende até a linha lateral superiormente (sobre ACI); E: Grau 3B: o tumor se estende para a linha lateral inferiormente (sob ACI). F: Grau 4: envolvimento total da ACII

Fonte: modificada de Micko *et al.*, 2015²⁰.

Ao diagnóstico da acromegalia, a avaliação da imagem da RM ponderada em T1 (T1W) e T2 (T2W) permite a avaliação do comportamento dos tecidos, tanto normais quanto patológicos^{22; 23; 24}. A comparação visual da intensidade do sinal do adenoma na T2W com o tecido hipofisário normal circundante ou com a substância cinzenta cerebral do lobo temporal, na ausência de tecido hipofisário normal, permite a classificação do sinal em: hipointenso (hipossinal, T2W-hipo, sinal mais escuro), isointenso (isossinal, T2W-iso, sinal similar) ou hiperintenso (hiperssinal, T2W-hiper, sinal mais claro)^{22; 25; 26; 27; 28; 29}.

Estudos prévios mostraram uma relação entre a intensidade do sinal ponderado em T2 e as características do adenoma³⁰, patologia^{30 26; 31} e resposta ao tratamento com ligantes do receptor de somatostatina (LRS)^{26 25}. Os tumores T2W-hipo tendem a ser menores e menos invasivos, embora sejam associados a níveis mais elevados de secreção de GH/IGF-1 do que os tumores T2W-iso e T2W-hiper^{25; 26; 27; 28}. Além disso, se correlacionam com melhor resposta do IGF-1 em pacientes que receberam LRS para doença persistente após a cirurgia transesfenoidal (CTS) ou como tratamento primário^{25; 26}. Potorac e colaboradores associaram negativamente a imagem T2W-hiper com reduções nos níveis de GH, IGF-1 e do volume tumoral em pacientes que receberam tratamento primário com LRS³².

A intensidade do sinal em T2W também é de substancial importância na distinção do tipo histológico do somatotropinoma, uma vez que está associada a granulação tumoral, característica relacionada ao prognóstico²³. No geral, os tumores com granulação esparsa na imuno-histoquímica (IHQ) apresentam T2W-hiper, enquanto os com granulação densa e intermediária são associados com T2W-hipo ou T2W-iso^{23; 26; 30; 33}.

O tratamento primário de escolha é a cirurgia, preferencialmente realizada por acesso transesfenoidal, empregando a técnica endoscópica por via endonasal⁷. Nos adenomas intrasselares bem definidos, as taxas de remissão com a CTS são em torno de 60-85%^{8; 21}. Essas taxas podem cair para valores entre 20-40% nos macroadenomas invasivos³⁴.

A avaliação patológica dos somatotropinomas é fundamental, pois estes tumores têm subtipos histológicos distintos e o delineamento é importante para otimizar o seguimento pós-operatório, a escolha de tratamento adjuvante e o prognóstico³⁵ (Quadro 2). Os subtipos histológicos, adenomas densamente granulados (DGA) e adenoma esparsamente granulados (SGA) e de granulação intermediária (IGA), são classificados com base na densidade dos grânulos secretores contendo GH e na presença de corpos fibrosos³⁵. Atualmente são identificados por IHQ como inclusões semelhantes a pontos de queratina de baixo peso molecular³⁶. O tipo IGA também é reconhecido e classificado como DGA, pois demonstra comportamento clínico semelhante³⁷. O padrão de granulação é um importante preditor da agressividade do tumor e da resposta ao tratamento com LRS^{38; 39}. Os SGA são associados a um comportamento mais agressivo e pior resposta a LRS em comparação aos DGA/IGA^{35; 40; 41; 42; 43}.

A maioria dos estudos avaliando as citoqueratinas (CK) hipofisárias utilizam o anticorpo CAM 5.2. No entanto, as CKs identificadas por este anticorpo permanecem controversas. A maioria dos relatórios afirmam que o CAM 5.2 é direcionado a CKs básicas (tipo II) de baixo peso molecular, como a CK8 e, em menor grau, a CK7^{44; 45; 46; 47; 48; 49}, enquanto outros artigos sugerem que o CAM 5.2 reconhece CK8 e CK18⁴⁴. Em recente estudo, o padrão de positividade da CK18 imitou quase completamente o do CAM 5.2 e demonstrou que a marcação para a CK18 é mais delicada e permite melhor visualização subcelular do que com o CAM 5.2⁵⁰. Isto pode, por exemplo, facilitar a distinção de células de Crooke de corticotrofos normais que também têm filamentos de queratina abundantes. Ademais, pode favorecer a visualização de

corpos fibrosos dispersos em DGA, padrão conhecido como intermediário⁵⁰. Adicionalmente, o estudo cita que a marcação com anticorpos para CK18 foi positiva também em tumores mamosomatotróficos e tumores da linhagem Pit-1 plurihormonais⁵⁰. Portanto, a CK18 pode representar uma ferramenta auxiliar melhor para patologias hipofisárias.

Quadro 2 - Classificação imuno-histoquímica dos somatotropinomas

Tipos de Adenoma	Imunofenótipos	Fatores de transcrição e outros cofatores
Adenoma somatotrófico densamente granulado	GH ± PRL ± subα CAM5.2: perinuclear ou difuso	Pit-1
Adenoma somatotrófico esparsamente granulado	GH±PRL CAM5.2: corpos fibrosos	Pit-1
Adenoma mamossomatotrófico	GH+PRL (na mesma célula) ± subunidade alfa	Pit-1, ERα
Adenoma misto somatotrófico-lactotrófico	GH+PRL (em células diferentes) ± subunidade alfa	Pit-1, ERα
Adenoma acidofílico de células-tronco	PRL, GH (focal e inconstante)	
Adenoma plurihormonal positivo Pit-1	GH, PRL, β TSH ± subunidade alfa	Pit-1

PRL: prolactina; Subα: subunidade alfa; ERα: receptor de estrógeno alfa; Pit-1: Fator de transcrição 1 da hipófise; TSH: hormônio tireoestimulante. Fonte: Adaptado de Mete *et al*, 2017³⁵

Como o controle a longo prazo dos níveis séricos de GH e IGF-1 após a ressecção cirúrgica ocorre em geral em 60% dos pacientes, a terapia adicional é frequentemente necessária⁵. As opções para o tratamento medicamentoso compreendem os agonistas dopaminérgicos (AD), os LRS e o antagonista do receptor do GH (ARGH)⁵¹.

O tratamento com os LRS é a opção de escolha, por sua eficácia em proporcionar normalização hormonal e/ou redução tumoral. Eles agem através da ligação aos subtipos de receptores de somatostatina (SSTR1-5) presentes no tumor, preferencialmente o SSTR2⁵. O percentual de remissão bioquímica com estas medicações (normalização média de GH e IGF-1) é em torno de 25-50% e o controle ou redução do volume tumoral é de aproximadamente 70%⁵².

A cabergolina é o AD de escolha e está indicada sobretudo em pacientes com níveis de GH e/ou IGF-1 discretamente elevados e/ou em tumores co-secretores (GH/PRL)^{51; 53}. Ela pode ser utilizada de forma isolada ou em associação com outras

medicações e leva a normalização hormonal em cerca de 30% dos pacientes^{5; 51; 53}. O pegvisomanto é o único ARGH disponível e o índice de normalização hormonal é de 60-97% dos casos⁵¹. Ele age através da ligação aos receptores de GH causando inibição do mesmo e diminuindo assim a secreção de IGF-1. No entanto, apresenta disponibilidade limitada em nosso país^{54; 55}.

Atualmente, a radioterapia tem sido considerada terceira linha de tratamento na maioria dos centros. Ela é recomendada para tumores com comportamento agressivo e naqueles com tratamento medicamentoso adjuvante ineficaz, não tolerado e/ou indisponível^{5; 51; 56}.

1.2 Ligantes do receptor de somatostatina

1.2.1 Aspectos gerais

A somatostatina (SST) é um neuropeptídeo expresso de forma ubíqua em humanos, com altas concentrações em cérebro, fígado, pulmões, pâncreas, tireoide, trato gastrointestinal e glândula adrenal, atuando principalmente como um inibidor das secreções exócrinas e endócrinas em órgãos alvo^{57; 58; 59; 60 61}. Suas ações biológicas ocorrem ligando-se a uma família de receptores de somatostatina (SSTRs) acoplados à proteína G (GPCRs), que possuem 7 domínios transmembrana⁶². Cinco subtipos desses receptores foram caracterizados^{63; 64}.

Em humanos, há duas variantes truncadas, embora funcionais, do SSTR5, geradas por *splicing* não canônico. Elas possuem 5 e 4 domínios transmembrana e são, portanto, referidas como SSTR5TMD4 e SSTR5TMD5^{65; 66}. Os SSTRs são diferentemente expressos nos múltiplos órgãos alvo. No tecido hipofisário normal de adultos observa-se a expressão dos SSTR 1, 2, 3 e 5⁶⁷. Em somatotropinomas pode haver expressão de todos os receptores, porém há predomínio dos receptores 2 e 5^{67; 68}.

Dependendo do tipo de tumor e do conjunto específico de receptores envolvidos, a ligação da SST ou de seus análogos sintéticos aos SSTRs pode provocar efeitos como a diminuição da secreção hormonal, diminuição do crescimento e dos índices mitóticos, aumento da apoptose, inibição da síntese proteica e da produção e secreção de fatores angiogênicos^{69; 70; 71}. Todos os SSTRs apresentam ações inibitórias através de dois segundos mensageiros críticos: a adenosina 3,5-

monofosfato cíclica (cAMP) e Cálcio (Ca^{2+} citosólico). A redução do cAMP (por inibição da adenil ciclase), do Ca^{2+} citosólico ou a diminuição simultânea de ambos leva à inibição da secreção hormonal (devido à supressão da exocitose das vesículas)^{70; 71}. Na hipófise, os SSTR1 e 5 controlam principalmente a secreção de GH e PRL, enquanto o SSTR2 está envolvido na liberação de GH, TSH e ACTH^{67; 72; 73}.

Os ligantes do receptor de somatostatina sintéticos exibem afinidades diferentes aos SSTRs (Quadro 3). As ações antiproliferativas destes são mediadas por duas vias de sinalização: a inibição da fosforilação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e bloqueio da via fosfatidilinositol-3-quinase / Proteína quinase b / Glicogênio sintase quinase 3B (PI3K / Akt / GSK3 β) e a ativação de fosfotirosinas fosfatases, como p60src, fosfolipase C, pequeno heterodímero hepático (SHP) -1 e SHP-2^{60; 71}. A modulação da via MAPK (ativação e inibição) por estímulo dos SSTR 1, 2 e 4 e a ativação da fosfotirosina fosfatase pelo SSTR 2 ativado culminam com o controle da proliferação celular tumoral.

Os SSTR 1, 2, 4 e 5 estão envolvidos principalmente na interrupção da progressão do ciclo celular, enquanto os SSTR 2 e 3 também são capazes de ativar vias pró-apoptóticas e sinais anti-angiogênicos, controlando indiretamente o crescimento tumoral⁷¹. Embora o SSTR2 seja o receptor mais relacionado a estas vias de sinalização, o SSTR5 pode suprimir a proliferação de células tumorais influenciando as fosfotirosinas fosfatases tipo src p60 e a fosfolipase C⁷¹.

Os SSTRs são capazes de heterodimerizar com outros membros da família SSTR, bem como com receptores acoplados à proteína G (GPCR) não relacionados⁷⁴. Isto provoca efeitos diretos e indiretos no tumor, como indução da parada do ciclo celular, apoptose, modulação da angiogênese e do sistema imunológico e controle do fatores de crescimento e liberação hormonal⁷⁴. Além disto, a homo e/ou heterodimerização desempenham um papel fundamental na fusão do receptor com o ligante, expressão do receptor, tráfego, dessensibilização e transdução de sinal^{75; 76; 77}.

Quadro 3 - Propriedades de ligação da somatostatina -14 e dos ligantes sintéticos aos receptores de somatostatina.

Afinidade ligantes pelos SSTRs (IC50, nM)	SSTRs				
	SSTR ₁	SSTR ₂	SSTR ₃	SSTR ₄	SSTR ₅
Somatostatina-14	0.93	0.15	0.56	1.35	0.29
Octreotida	>1000	0.38	4.4	>1000	5.6
Lanreotide	2129	0.75	98	1826	5.2
Pasireotide	9.3	1.0	1.5	>100	0.16

SSTR subtipos de receptor de somatostatina IC50 = metade da concentração inibitória máxima

Fonte:⁶⁰

Entre as interações dos SSTRs com componentes de outras famílias GPCR, aquelas com o receptor 2 da dopamina (D2R) foram amplamente investigadas devido a potenciais implicações terapêuticas^{78;79}. De fato, os SSTRs e D2R são frequentemente co-expressos em tumores endócrinos e hipofisários e a ativação de ambos leva à inibição da secreção hormonal e proliferação celular⁷⁹.

1.2.2 Resistência aos ligantes de somatostatina

A resposta aos LRS é avaliada através da normalização dos níveis de GH e IGF-1 e redução tumoral após 12 meses de uso regular da medicação⁸⁰. A resistência aos LRS pode ser dividida em parcial ou total a depender da porcentagem de diminuição dos níveis hormonais e do volume de redução tumoral⁸⁰ (Quadro 4).

A eficácia dos LRS depende das características individuais do paciente, perfil bioquímico e características do tumor⁸⁰. A compreensão dos mecanismos relacionados a resistência aos LRS permite a identificação de preditores de eficácia, evitando exposição prolongada a uma medicação sem eficácia e reduzindo reações adversas e custo. Alguns fatores têm sido considerados preditivos de resposta aos LRS⁸¹.

Quadro 4 - Definição de resposta ao tratamento com ligantes do receptor de somatostatina

Imunofenótipos	Fatores de transcrição e outros cofatores
Resposta Completa	Controle de GH <u>e</u> IGF-1 <u>e</u> redução do volume tumoral > 20% em pacientes em tratamento primário; Controle de GH <u>e</u> IGF-1 <u>e</u> redução tumoral > 20% <u>ou</u> estabilização do remanescente tumoral em pacientes em tratamento secundário ou em pacientes sem evidência de tumor na RM basal
Resposta parcial	Diminuição significativa (> 50%) de GH <u>e/ou</u> IGF-1, sem normalização hormonal, <u>e/ou</u> Redução tumoral > 20% em pacientes em tratamento primário ou secundário
Resposta discreta ou resistência	Diminuição não significativa de GH <u>e</u> IGF-1, sem normalização hormonal <u>e</u> Ausência de redução tumoral em pacientes em tratamento primário <u>ou</u> aumento de volume tumoral em qualquer paciente

Fonte: Adaptado de Colao *et al*, 2011⁸⁰

Kasuki e colaboradores estudaram a expressão de SSTR2 e *aryl hydrocarbon receptor-interacting protein* (AIP) por IHQ em 35 somatotropinomas esporádicos e concluíram que nesta população a expressão de AIP sem mutações foi um preditor de controle hormonal após uso de LRS independente de SSTR2 e que a avaliação de ambos foi preditiva de resposta aos LRS com elevada acurácia⁸².

Kato e colaboradores avaliaram 82 somatotropinomas (44 DGA e 38 SGA) e observaram que os DGA apresentaram menor expressão de SSTR2 e menor resposta aos LRS⁸³. A Figura 2 compila os principais fatores associados a resistência aos LRS⁸¹. Entretanto, todos esses fatores explicam apenas parcialmente a resposta ou não aos LRS^{82; 84; 85; 86}.

A literatura relata que aproximadamente 25-50% dos pacientes apresentam resistência aos LRS⁸⁰. Porém, na unidade de neuroendocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), observamos que a resistência aos LRS é de aproximadamente 60%. Assim um grande contingente de pacientes permanece não controlado e exposto a hipersecreção de GH e IGF-1.

Figura 2 - Fatores preditivos de resposta aos ligantes do receptor de somatostatina



Fonte: Adaptado de Gadelha MR *et al*, 2013⁸¹.

1.3 Homeostase tecidual

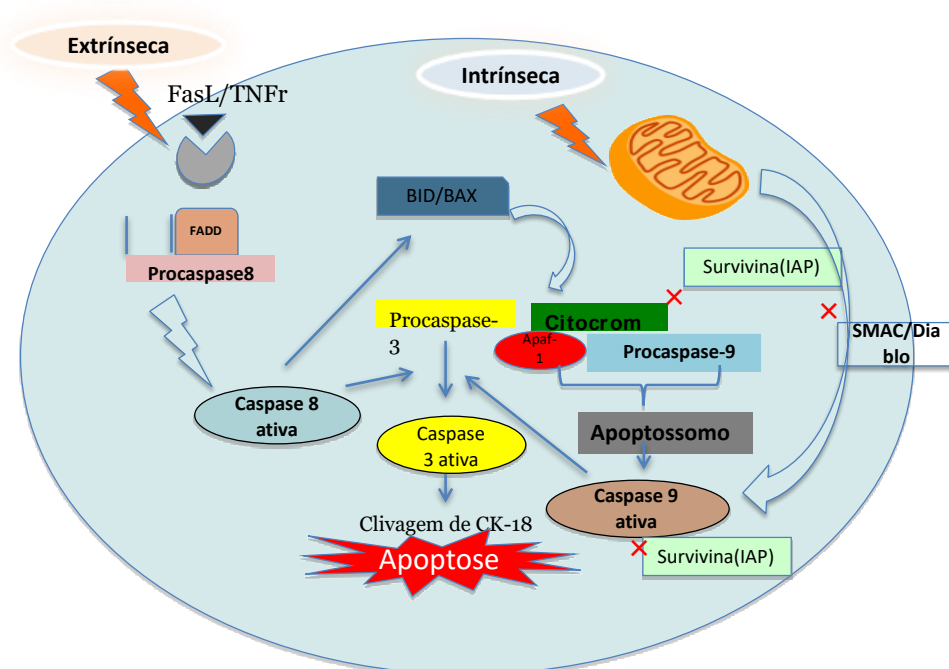
1.3.1 Apoptose celular

Apoptose é um fenômeno de morte celular programada, que ocorre individualmente, de forma que a morte de uma célula não leva à morte de outras células^{87; 88}. Esse mecanismo é rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação célula e meio externo. As alterações celulares morfofuncionais e bioquímicas relacionadas a apoptose são: perda do contato entre as células, fragmentação da membrana nuclear e do arcabouço de lâminas, formação de vacúolos citoplasmáticos, condensação e fragmentação cromatínica, despolarização da membrana mitocondrial com liberação do citocromo C e ativação de caspase-9 (responsável pelo início do processo de apoptose), fragmentação internucleossomal do DNA e externalização de fosfolípidios de membrana

plasmática⁸⁹. Estas alterações são comuns a todas as células em apoptose independentemente do agente indutor^{88; 89}.

O processo de apoptose pode ser iniciado por duas vias diferentes: via extrínseca (citoplasmática) e via intrínseca (mitocondrial)^{90; 91} (Figura 3). A via extrínseca é desencadeada pela interação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação provoca o recrutamento da caspase-8 que ativa a caspase-3 desencadeando a apoptose celular^{90; 91} (Figura 3).

Figura 3 - Vias extrínseca e intrínseca da apoptose celular



Fonte: próprio autor

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular tais como: escassez de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. A mitocôndria é a principal mediadora desta via pois integra os estímulos de morte celular induzindo a permeabilidade da membrana mitocondrial através da ativação das proteínas Bax e Bid (membros da família Bcl-2) e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas como o citocromo c⁹². Este se liga a dATP, Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo. A caspase-9 ativa cliva as caspases efetoras subsequentes (-2, -3, -6, -7, -8, -9, e -10) fragmentando a citoqueratina culminando com a apoptose da célula⁹². A família Bcl-2 também possui membros anti-apoptóticos (Bcl-2 Bcl-Xl, Bcl-w, A1, Mcl-1, Bcl-B) que inibem a formação de poros na

membrana mitocondrial impedindo o extravasamento do citocromo c para o citosol⁹⁰ (Figura 3).

A apoptose possui um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual, sendo especialmente importante em certas condições patológicas como em neoplasias. O avanço do conhecimento dessa via possibilita um potencial alvo terapêutico para novas classes de drogas antineoplásicas.

1.3.1.1 Marcador celular de apoptose

A apoptose celular pode ser estudada através da expressão proteica em diversas fases desta via. Dependendo da fase da cascata a ser avaliada pode-se realizar por exemplo a expressão de caspases, proteínas da família *B cell lymphoma 2* (Bcl-2) ou das proteínas relacionadas a inibição da via de apoptose. Em nosso projeto optamos por realizar a expressão de survivina, uma proteína inibidora de apoptose e associada ao prognóstico em vários tipos de neoplasias^{93; 94; 95}.

A survivina pertence à família das proteínas inibidoras da apoptose (IAP)⁹⁶. Dentre essas proteínas, ela é a única capaz de exercer uma função dual como inibidora de apoptose e reguladora de mitose^{97; 98}. Estudos relatam que fisiologicamente, em tecidos fetais, o mRNA (RNA mensageiro) da survivina está amplamente presente, enquanto na maioria das células diferenciadas normais está praticamente ausente⁹⁹.

Em estudos de tecidos tumorais de pulmão, pâncreas, mama, ovários e cólon, a survivina está expressa em altos níveis o que sugere uma reativação do gene desta proteína nestes tecidos^{99; 100; 101}.

O mecanismo de ação da survivina inibindo a apoptose ainda não está totalmente esclarecido. Alguns mecanismos propostos são: 1) Inibição do segundo ativador de caspase derivado de mitocôndria/ Inibidor direto da proteína de ligação à apoptose(SMAC/DIABLO), uma proteína pró-apoptótica que participa da ativação da caspase 9 na via intrínseca da apoptose; 2) Ligação direta com a caspase-9 inibindo sua ação; 3) Ativação das IAP's formando pontes mais estáveis com a caspase ativa bloqueando a ocorrência da apoptose^{96; 102; 103}.

Além da ação anti-apoptótica, a survivina é a proteína candidata na realização da interface entre a via de apoptose e o ciclo celular normal⁹⁶. Essa proteína é seletivamente expressa na fase G2/M e está localizada nos microtúbulos do fuso

mitótico juntamente com a a quinase dependente de ciclina 2 (Cdc2), uma quinase ciclina-dependente que realiza a sua fosforilação. Durante a fase G1 do ciclo celular a expressão da survivina volta a diminuir, indicando que ela está presente apenas durante a mitose. Isso sugere que a survivina, exercendo um papel de controle na apoptose, contribui para a regulação da divisão celular⁹⁸.

1.3.2 Proteínas do citoesqueleto

A filamina A (FLNA), em conjunto com as filaminas B e C, fazem parte da família das actinas¹⁰⁴. Suas principais funções são assegurar a morfologia celular e organizar as interações entre citoesqueleto e receptores transmembrânicos¹⁰⁵. Mutações nos genes da FLNA têm sido implicadas em diversas neoplasias¹⁰⁶. Em câncer de cólon e pâncreas foi descrito aumento na expressão da FLNA, enquanto redução desta proteína foi sugerida em câncer de rim e estômago^{106; 107}. Os estudos da FLNA em adenomas hipofisários demonstram resultados não conclusivos.

Peverelli e colaboradores descreveram que a expressão de FLNA é importante para a expressão membranosa do D2R em prolactinomas¹⁰⁸. Estudo do mesmo grupo avaliou a expressão da FLNA em somatotropinomas e não encontrou correlação desta com a expressão de SSTR2, entretanto concluiu que a expressão de FLNA parece ser importante na estabilização e nas vias de sinalização do SSTR2, o que poderia influenciar a resposta aos LRS nestes pacientes¹⁰⁹. Corroborando com este estudo, Scott e colaboradores descreveram uma interação direta da FLNA com a beta-arrestina, proteína envolvida com o tráfego de D2R e SSTRs, receptores diretamente relacionados com a resposta ao tratamento medicamentoso de prolactinomas e somatotropinomas, respectivamente^{110; 111}. Entretanto, em estudo recente, Akdemir e colaboradores não encontraram associação entre polimorfismos genéticos de FLNA e beta-arrestina com resposta ao tratamento com LRS em somatotropinomas¹¹².

Portanto, o papel da FLNA em adenomas hipofisários, nas vias intracelulares e na resposta aos tratamentos medicamentosos disponíveis permanece não definido.

A E-caderina é uma proteína localizada na membrana citoplasmática de crucial importância para a adesão celular e integridade de tecidos epiteliais¹¹³. Ela possui uma função supressora tumoral, pois a perda de expressão da E-caderina está relacionada a invasividade e metástase tumoral em diversos tipos de tumores^{114; 115}. O processo biológico de indução da transição epitélio-mesenquimal (EMT - *epithelial-*

mesenchymal transition), parece estar relacionado à conexão entre E-caderina e invasividade pois ele é um fato comumente observado nas fases mais avançadas dos tumores¹¹⁶. A EMT é um processo biológico que permite que uma célula epitelial, que normalmente interage com a membrana basal, sofra modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, que resultam na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal, cuja capacidade de migração, invasão, resistência e apoptose aumenta¹¹⁷.

A redução da expressão de E-caderina em somatotropinomas invasivos e resistentes aos LRS já foi relatada^{118; 119; 120; 121}. Além disso, a expressão da E-caderina também está associada aos subtipos histológicos em somatotropinomas. Em SGA a expressão desta proteína está ausente, enquanto em DGA a E-caderina está hiperexpressa^{122; 123}. A E-caderina também tem sido relacionada a secreção hormonal, pois ela reduz o teor da proteína prolactina por afetar o tráfego de grânulos secretores¹²⁴.

Em tecidos epiteliais a expressão da E-caderina parece ser inversa a expressão de survivina, um marcador da via de apoptose¹²⁵. Peroukides e colaboradores descreveram achado semelhante ao estudarem amostras de tecido hepático com cirrose¹²⁶. Estudo recente sugeriu que o silenciamento da survivina em células tumorais circulantes promoveu elevação da E-caderina, o que reduziu o potencial de invasividade destas células¹²⁷.

Curiosamente, alguns estudos demonstraram associação entre regulação negativa da E-caderina e hipermetilação do seu promotor em somatotropinomas, sugerindo envolvimento de mecanismos epigenéticos^{128; 129; 130}.

Portanto, ao estudar a correlação da E-caderina com os marcadores das vias de apoptose e proliferação em somatotropinomas invasivos e /ou resistentes aos LRS será possível produzir novos conhecimentos importantes para o desenvolvimento de novas terapêuticas.

1.3.3 Proliferação celular

1.3.3.1 Receptores de tirosina-quinase

Os receptores de tirosina quinases são receptores de membrana que contêm um domínio extracelular, um transmembrana e um tirosina-quinase citoplasmático¹³¹. Através da fosforilação do componente citoplasmático e subsequentes reações enzimáticas ocorre a transdução do sinal intracelular. Esses receptores são ativados por fatores de crescimento (FC) que desempenham um papel importante em processos celulares fundamentais como proliferação, diferenciação, metabolismo, sobrevivência celular, migração e controle do ciclo celular¹³¹. Em neoplasias, são demonstradas alterações nos FC, nos seus receptores e/ou nas vias de transdução de sinais por eles desencadeadas^{132 133}.

Após a ligação do FC ao seu receptor, inicia-se o processo de dimerização, resultando na fosforilação do domínio intracelular, através da reação entre adenosina trifosfato (ATP) e resíduos de tirosina. Em seguida, ocorre a fosforilação de proteínas-alvo que possuem o domínio SH2 (homologia Src2), o qual representa um sítio de reconhecimento para as fosfotirosinas¹³¹. A fosforilação intracelular inicia uma cascata de reações citoplasmáticas que ocorrem através de complexas interações enzimáticas sequenciais, que constituem as vias de sinalização. Estas vias envolvem a via PI3K/Akt/mTOR (Fosfatidilinositol 3-quinase/ proteína quinase b/ *Mechanistic Target of Rapamycin*) e a via Ras/Raf/MEK/MAPK, as quais têm funções importantes no crescimento, metabolismo, sobrevivência e divisão celular^{134; 135}.

Estas vias também desempenham papéis críticos na transmissão de sinais que regulam a expressão gênica e evitam a apoptose^{134; 135}. Além disto, elas interagem entre si para regular o crescimento e, em alguns casos, a carcinogênese. Componentes dessas vias como Ras, B-Raf, PI3K, PTEN, Akt podem estar mutados ou hiperexpressos em diversas neoplasias humanas¹³⁴.

1.3.3.2 Via PI3K/Akt/mTOR

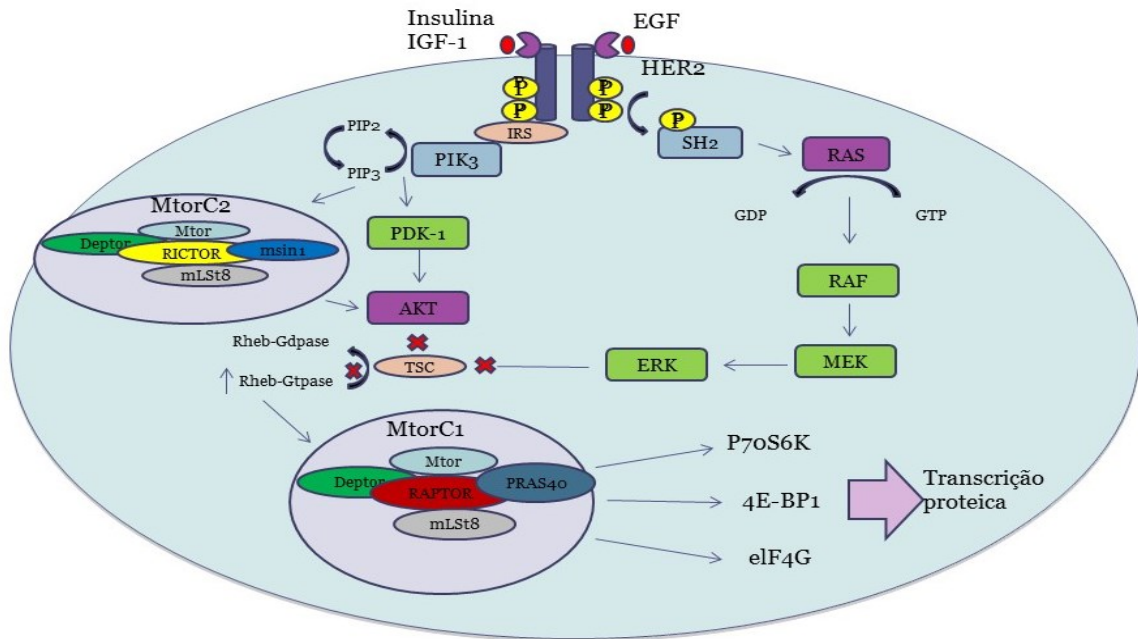
A proteína mTOR é uma serina/treonina quinase com relevante importância na regulação de processos vitais como crescimento e sobrevivência celular em resposta a nutrientes e fatores de crescimento¹³⁴. Ela atua através da ligação a duas

subunidades que formam dois complexos com diferentes funções na sinalização intracelular: complexo mTOR1(mTORC1)¹³⁶ e complexo mTOR 2 (mTORC2). O mTORC1, mais sensível a rapamicina, consiste na proteína mTOR, proteína associada à regulamentação de mTOR (Raptor), dector, mLST8 (*mammalian lethal with sec-13 protein 8*) e Pras40 (*proline-rich Akt substrat 40kDA*), sendo este complexo envolvido no processo de tradução, autofagia, metabolismo da glicose e resposta celular à hipóxia.

O mTORC2 é formado pela mTOR, proteína insensível a rapamicina ligada a mTOR¹³⁷, mLST8 e mSin1 (*mammalian-stress activated map interacting protein 1*), e regula parcialmente a função da quinase Akt por meio da fosforilação do resíduo serina 473¹³⁴. Esse complexo é mais insensível a rapamicina e sua participação no processo de síntese proteica é limitada quando comparada a mTORC1. Os mecanismos envolvidos na ativação da sinalização da mTOR incluem estímulos extracelulares como insulina e IGF-1, que por meio da AKt promovem direta ou indiretamente a ativação da mTOR¹³⁸. Alguns mecanismos de controle da mTOR via Akt têm sido propostos: 1) Akt pode ativar diretamente a mTOR pela fosforilação da Ser2448; 2) fosforilação e dissociação de Raptor da subunidade inibitória da mTOR/PRAS40; 3) fosforilação de múltiplos sítios da proteína TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*), um inibidor endógeno da mTOR¹³⁴.

A mTOR estimula a síntese proteica da célula por meio da expressão de três principais proteínas: P70S6K (*P70 ribosomal S6 kinase*), 4EBP1 (*eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1*) e eIF4G (*eukaryotic initiation factor 4G*). Uma vez ativadas, estas proteínas participam do processo de tradução do mRNA nas etapas de iniciação, alongação e terminação¹³⁴ (Figura 4).

Figura 4 - Vias de proliferação celular



Fonte: próprio autor

Em tumores malignos de outros sítios, o papel da hiperativação das vias de proliferação e aumento de proteínas inibidoras de apoptose são bem descritos^{138; 139; 140;141}. Entretanto, estes marcadores de agressividade/invasividade são eventualmente observados em adenomas hipofisários, considerados tumores benignos^{134; 137; 142}. O quadro 5 descreve alguns estudos que avaliaram os marcadores destas vias em neoplasias diversas e em adenomas hipofisários.

Quadro 5 - Marcadores das vias de proliferação e apoptose celular em diversos tipos de tumores

Ano/Autor	Tipo de Câncer	N	Técnica	Resultados
Khan S, 2021 ¹⁴³	Cabeça e pescoço	96	IF	Expressão ↑ survivina associada a menor sobrevida.
Krafft U, 2019 ¹⁴⁴	Bexiga	106	IHQ	Expressão nuclear de survivina associou-se a menor sobrevida, sobrevida e, menor tempo livre de doença.
Rutkovsky AC, 2019 ¹⁴⁵	Mama	Cultura células	IB e CTF	Expressão de p-4EBP-1 ↑ provocou proliferação celular
Lee HW, 2015 ¹⁴⁶	Estômago	179	IHQ	Expressão 4EBP-1 é mais ↑ em Ca gástrico precoce em relação aos avançados
Kong X, 2017 ¹⁴⁷	Hipófise	489	Diversas metanálise	Maioria dos estudos sugere que ↑ expressão de survivina associa-se a invasividade
Zheng X, 2016 ¹⁴⁸	Hipófise	Revisão	Revisão	Avaliação da relação de invasividade tumoral com expressão de Ki-67, E-caderina e p53 não mostraram resultados uniformes.
Waligorska-Stachura J, 2015 ¹⁴⁹	Hipófise	50	RT-PCR	Expressão de survivina e suas variantes não se associou a invasividade

IF: Imunofluorescência; IB: inunobloting; CTF: citometria de fluxo; Ca: câncer; RT-PCR: reação em cadeia de polimerase. Fonte: próprio autor

Assim, observamos que há uma lacuna na literatura a respeito das vias de proliferação e apoptose em somatotropinomas invasivos e resistentes aos LRS. Portanto, ao esclarecer o comportamento destas vias é possível que novas possibilidades terapêuticas despontem como alternativa às existentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Primário

Avaliar a presença dos marcadores de apoptose (survivina) e proliferação celular (4EBP-1) em somatotropinomas tratados primariamente com cirurgia, correlacionando-os ao comportamento clínico, radiológico e com sua resposta ao tratamento medicamentoso secundário com ligantes do receptor de somatostatina.

2.2 Secundários

- ✓ Avaliar a expressão proteica dos SSTR 2 e 5 nos somatotropinomas invasivos e/ou resistentes ao tratamento com LRS;
- ✓ Avaliar a expressão proteica de fatores relacionados a invasividade e resistência aos LRS (Ki-67, CK18, filamina e E-caderina);
- ✓ Correlacionar a expressão de SSTR2, SSTR5, Ki-67, CK18, filamina e E-caderina com a invasividade tumoral e com a resposta ao tratamento com LRS;
- ✓ Correlacionar a expressão de SSTR2, SSTR5, Ki-67, CK18, filamina e E-caderina com a expressão de survivina e 4EBP-1;
- ✓ Correlacionar o padrão de granulação tumoral com as características clínicas, de imagem e expressão de SSTR2, SSTR5, Ki-67, CK18, filamina e E-caderina, survivina e 4EBP-1;
- ✓ Correlacionar as características clínicas, histopatológicas, invasão tumoral e resistência aos LRS com a imagem tumoral em T2W;
- ✓ Correlacionar as características clínicas, histopatológicas, invasão tumoral e resistência aos LRS com a remissão cirúrgica.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar dos adenomas hipofisários serem compostos por população celular monoclonal de natureza benigna, estes tumores apresentam uma significativa diversidade e imprevisibilidade de comportamento biológico. Múltiplos esforços têm sido efetuados na tentativa de definir fatores que se correlacionem com o comportamento clínico-patológico destes tumores. Consequente, alguns preditores com esta finalidade já foram descritos, tais como níveis hormonais basais, características clínicas, de imagem e características histopatológicas tumorais, entretanto eles explicam parcialmente a invasão tumoral e/ou resistência aos LRS. Considerando que os estudos de marcadores de apoptose e proliferação celular em tumores hipofisários ainda são escassos e a correlação destas vias com a resistência aos LRS permanece inexplorada, o estudo de novos marcadores torna-se de suma importância.

3.1 Perspectivas

Os novos conhecimentos adquiridos a partir do estudo das vias de apoptose e proliferação celular tumoral podem abrir caminhos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Isto torna-se relevante ao se observar o contingente considerável de acromegálicos que se encontram sem controle adequado da doença apesar de tratamentos cirúrgico e medicamentoso. Esta exposição crônica a níveis hormonais elevados provoca maior incidência de complicações, aumentando a morbimortalidade desta doença.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 466/2012 (30). O protocolo de estudo (número 13392918.1.0000.0068) foi aprovado junto a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) (Anexo A). Todos os participantes foram orientados a respeito do projeto e objetivos da pesquisa, e a sua inclusão foi condicionada à assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B) após leitura e compreensão dele.

4.2 Tipo do estudo

Estudo retrospectivo, transversal e observacional.

4.3 Desenho do estudo

Setenta e três pacientes com acromegalia acompanhados na unidade de Neuroendocrinologia do HCFMUSP que apresentavam critérios de inclusão e que não tinham critérios de exclusão, foram selecionados no período de 1995 a 2017. Posteriormente, foram excluídos 19 pacientes por ausência de amostra tecidual em bloco de parafina e adicionalmente mais 2 pacientes por falta de representatividade tumoral em micromatriz tecidual (TMA). Portanto, totalizou-se 52 amostras com material adequado para estudo (Figura 5).

4.4 Casuística

4.4.1 Critérios de inclusão

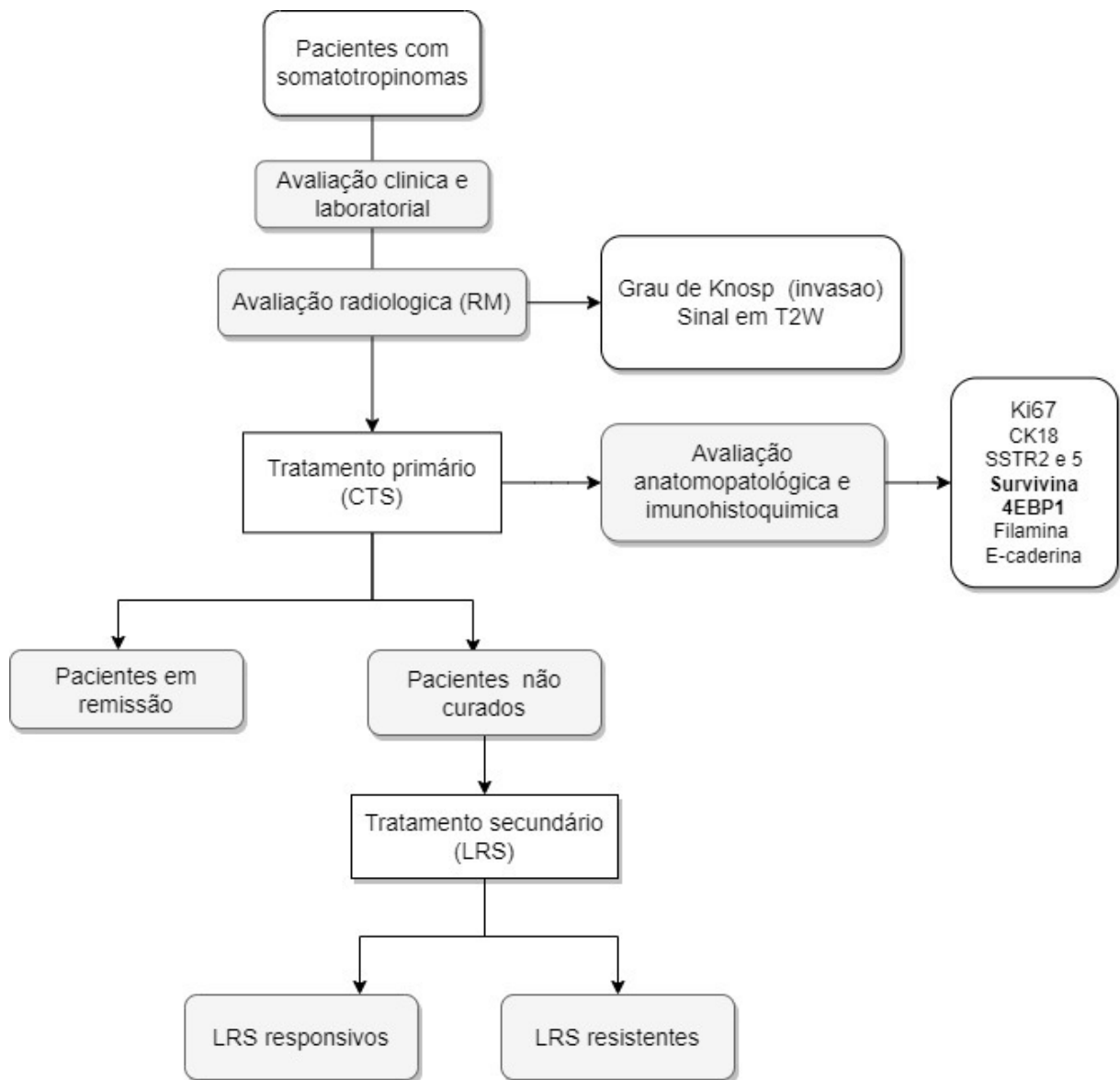
- ✓ Pacientes com diagnóstico de acromegalia submetidos ao tratamento primário cirúrgico;
- ✓ Disponibilidade de dados clínicos e de imagem para as correlações clínico-biológicas;

- ✓ Amostras teciduais com confirmação histopatológica de adenoma hipofisário e imuno-histoquímica positiva para GH;
- ✓ Quantidade e qualidade adequadas de tecido tumoral que permitissem a avaliação proposta.

4.4.2 Critérios de exclusão:

- ✓ Pacientes submetidos a tratamento primário medicamentoso;
- ✓ Radioterapia prévia em região selar;
- ✓ Pacientes com quadros sindrômicos;
- ✓ Pacientes submetidos a tratamento secundário com LRS por menos de 12 meses.

Figura 5 - Desenho do estudo



Fonte: próprio autor

4.5 Metodologia

4.5.1 Avaliação clínica

A caracterização da população do estudo (sexo, idade, registros clínicos-laboratoriais ao diagnóstico, relatório cirúrgico, evolução da abordagem terapêutica e seguimento das comorbidades) foi realizada pela análise retrospectiva dos dados coletados em prontuário eletrônico e pelo sistema de exames HCMED do HCFMUSP.

4.5.2 Parâmetros laboratoriais

A avaliação hormonal foi realizada no Laboratório Central e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 do HCFMUSP. Ao longo do tempo do estudo o GH foi mensurado utilizando dois ensaios monoclonais. O ensaio imunofluorimétrico (Delfia®, Wallac, Turku, Finlândia) de acordo com o padrão internacional 80/505 da OMS, com limite de detecção do ensaio de 0,01 µg/L, foi usado até 2014. Desde então, o GH vem sendo avaliado pelo teste de imunoensaio automatizado por quimioluminescência (Immunodiagnostic Systems Holdings PLC, Tyne & Wear, Reino Unido), calibrado conforme o padrão da OMS IS 98/574 e com um limite de detecção de 0,05 µg/L.

As dosagens de IGF-1 até 2017 foram realizadas pelo imunoensaio automatizado por quimioluminescência (Immulate® 2000, Diagnostic Products Corp, Los Angeles, CA, EUA), calibrado conforme recomendações da OMS IRR 87/518, com coeficientes de variação intra e interensaio de <3,9% e <8,1%, respectivamente. Após esta data, o ensaio adotado foi o IDS-iSYS (Immunodiagnostic Systems Holdings, Boldon Colliery, Reino Unido) com coeficientes de variação intra e interensaio de <0,97% e <0,8%, respectivamente. Embora, os ensaios de dosagem de GH/IGF-1 tenham mudado ao longo do tempo de estudo, as avaliações foram realizadas no mesmo laboratório e apenas dois ensaios foram usados. Portanto, a variabilidade das dosagens séricas do GH e IGF-1 existente entre os diferentes ensaios disponíveis no mercado foi minimizada, o que aumenta o poder estatístico do estudo¹⁵⁰.

O diagnóstico bioquímico de acromegalia foi baseado em IGF-1 elevado para idade e sexo e nadir de GH $\geq 0,4$ ng/ml durante o TOTG. Em pacientes diabéticos com

suspeita clínica de acromegalia, o diagnóstico foi estabelecido pela presença de GH sérico randômico $\geq 1\text{ng/mL}$ associado a IGF-1 elevado para idade e sexo^{5; 8}.

As dosagens hormonais basais dos demais hormônios hipofisários, a saber, prolactina (PRL), hormônio luteinizante e folículo-estimulante (LH/FSH), testosterona total (TT) e livre (TL), globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), hormônio corticotrófico (ACTH), cortisol, hormônio tireoestimulante (TSH) e tetraiodotironina (T4) livre foram realizadas por métodos tradicionais.

4.5.3 Diagnóstico por imagem

Os pacientes foram submetidos a RM em aparelhos GE de 1.5 Tesla para avaliação do diâmetro tumoral, anatomia de esfenoide e extensão do tumor (invasão supra, infra e/ou parasselar e de seio cavernoso). Foram obtidas imagens multiplanares de 3 mm em T1W (sagital e coronal), T2W (coronal), T1 dinâmico coronal pós- contraste e T1 pós contraste (sagital, coronal e alguns com sequência volumétrica - SPGR), conforme protocolo habitual da instituição. Após 3 a 4 meses da CTS a RM foi repetida para averiguar a ressecção tumoral. Após este período, conforme a evolução clínica e laboratorial, a RM foi realizada periodicamente para monitoramento de progressão ou recorrência do tumor.

O tamanho tumoral foi definido como o diâmetro máximo anteroposterior, látero-lateral ou craniocaudal do tumor e o volume foi obtido pelo produto destas três medidas multiplicado por 0,52¹⁵¹. A extensão parasselar para o seio cavernoso foi avaliada pela classificação de Knosp^{20; 21}. Tumores com Knosp 0,1 e 2 foram classificados como tumores não invasivos e aqueles com Knosp 3A, 3B e 4 como invasivos (Figura 1). A intensidade do sinal tumoral em T2W no corte coronal foi definida visualmente por um neuroradiologista experiente. A porção sólida do tumor foi comparada ao tecido hipofisário normal circundante ou com a substância cinzenta do lobo temporal adjacente, em casos de tecido hipofisário normal não visível. Baseado na T2W, o adenoma foi classificado com hipointenso (T2W-hipo), isointenso (T2W-iso) ou hiperintenso (T2W-hiper). Os exames foram realizados pelo Instituto de Radiologia do HCFMUSP e avaliados de forma cega e aleatória por neuroradiologista experiente deste serviço.

4.5.4 Análise histopatológica diagnóstica

Os fragmentos tumorais coletados durante o ato operatório foram enviados para a Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP para a realização do exame anatomopatológico. As amostras foram submetidas a análise histopatológica com coloração pela hematoxilina-eosina confirmando a presença do adenoma e complementada com estudo por IHQ para avaliar a presença dos hormônios hipofisários GH, PRL, LH/FSH, TSH e ACTH.

4.5.5 Critérios clínicos de resposta ao tratamento

Em pacientes submetidos a CTS, remissão hormonal foi definida por normalização dos níveis de IGF-1 ajustados para idade e gênero associado a GH randômico menor que 1 ng/mL ou nadir de GH < 0,4 ng/mL durante o TOTG.

Após 3-4 meses da ressecção do adenoma, baseado na evolução hormonal e de imagem, os pacientes foram considerados em remissão ou com doença em atividade (GH e IGF-1 elevados). Neste último grupo, os LRS foram introduzidos e suas doses foram progressivamente aumentadas a cada 3 meses até a normalização do IGF-1 ou dose máxima do LRS (Octreotid 30 mg a cada 28 dias ou Lanreotide Autogel 120 mg a cada 28 dias).

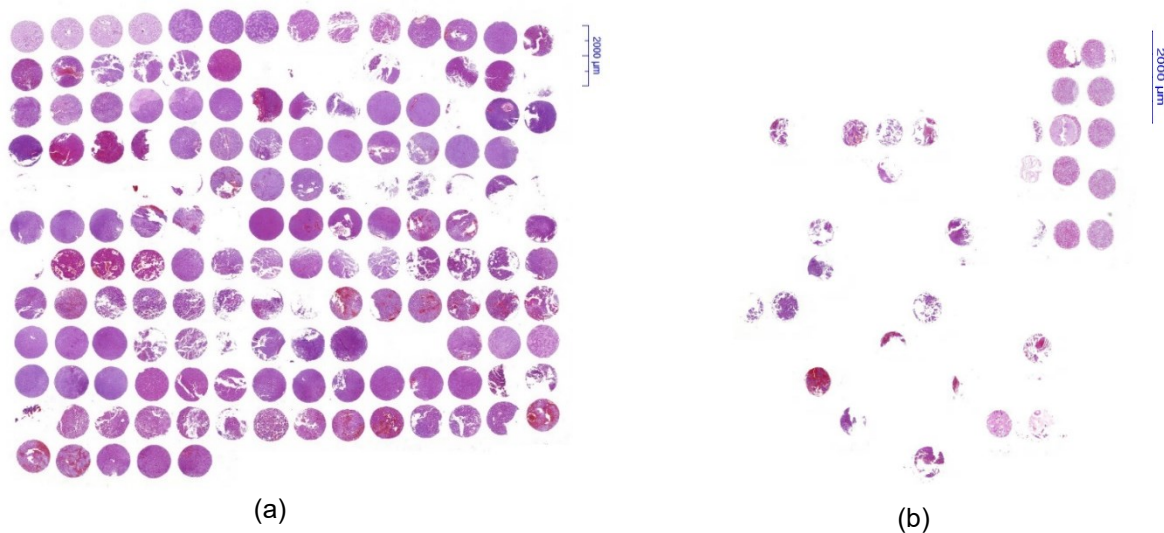
Os pacientes foram seguidos por pelo menos 12 meses em uso de LRS. Neste momento, a resposta ao tratamento foi avaliada e os pacientes foram classificados como sugerido por Colao e colaboradores⁸⁰: 1. Resposta aos LRS: controle dos níveis de GH e IGF-1 e redução tumoral > 20% do remanescente tumoral; 2. Resposta parcial: Redução significativa (> 50%) dos níveis de GH e IGF-1 sem normalização hormonal e/ou redução de < 20% do remanescente tumoral; 3. Resistência aos LRS: Redução dos níveis de GH e IGF-1 < 50% associada a redução tumoral < 20% ou aumento do remanescente tumoral (Quadro 4).

Pautado na resposta aos LRS, os pacientes foram divididos em 2 grupos: 1. LRS responsivos e 2. LRS resistentes (este grupo englobou os pacientes com resposta parcial ou resistência total aos LRS).

4.5.6 Micromatriz tecidual (TMA)

A confecção do TMA ocorreu em colaboração com o LIM-14, Laboratório de Investigação em Patologia Hepática da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Para tal, cortes histológicos das amostras de adenomas somatotróficos corados por hematoxilina e eosina foram revisados e as áreas de interesse foram selecionadas nas lâminas. As mesmas áreas foram marcadas nos respectivos blocos de parafina doadores dos tecidos. Cilindros de 0,6 mm de diâmetro das áreas marcadas foram transportados para um único bloco de parafina receptor através de um sistema mecanizado de precisão (Beecher Instruments), com um intervalo de 0,4 mm entre os cilindros. Os espécimes foram plotados em triplicata. Cada cilindro amostral foi alocado numa posição do bloco receptor definida num sistema cartesiano de coordenadas, e o conjunto das amostras constituiu um TMA com 12 linhas e 14 colunas. Foram incluídas ainda 4 amostras controle para posicionamento da matriz (Figura 6). Uma vez pronto, o bloco de TMA foi cortado em secções histológicas de 3 μ m (Leica Instruments). Um segundo TMA do grupo de neuroendocrinologia do HCFMUSP foi utilizado, pois este comportava amostras de 2 casos selecionados pelos critérios do estudo e 10 amostras de hipófise normal¹⁵².

Figura 6 - Lâmina corada com hematoxilina e eosina do TMA-1 (a) e TMA-2 (b).



Fonte: próprio autor

4.5.7 Análise imuno-histoquímica dos marcadores Ki-67, SSTR2, SSTR5, CK18, survivina, 4EBP-1, filamina e E-caderina.

Cada um dos marcadores foi avaliado nas 2 lâminas de TMA. Os anticorpos primários utilizados foram todos monoclonais e suas respectivas diluições estão descritas no Quadro 6. O apêndice A contém as informações dos procedimentos para a realização da IHQ. O procedimento de validação do anticorpo para a survivina utilizado neste trabalho é apresentado no apêndice B. O preparo das reações de IHQ foi realizado em colaboração com o LIM-14 pela funcionária Alda Wakamatsu, sob supervisão do Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves.

Quadro 6 - Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica com seus respectivos registros internacionais.

Anticorpo	Código	Clone	Título	Fabricante	Registro (RRID)
KI-67	M724001-2	MIB1	1:200	Dako	AB_2631211
SSTR2	Ab134152	UMB-1/rabbit mAb	1:200	Abcam	AB_2737601
SSTR5	Ab109495	UMB-4/ rabbit mAb	1:100	Abcam	
CK18	NCL-CK18	DC-10/mouse mAb	1:400	Novocastra	AB_563798
Survivina	18-7459	1C4A12/mouse mAb	1:10.000	Zymed	AB_1502081
4EBP-1	9644	53H11/rabbit mAb	1:4.000	Cell Signaling	AB_2097841
E-caderina	NCL-E-cad	36B5/ mouse mAb	1:200	Novocastra	AB_442084
Filamina	CBL228	PM6/317/ mouse mAb	1:800	Millipore	AB_93431

RRID: *Research Resource Identifier* (<https://scicrunch.org/resources>)

Fonte: próprio autor

As lâminas foram avaliadas pelos patologistas Dr Iberê Cauduro Soares e Dr Fernando Frassetto sob microscópio de luz, pela análise de intensidade e de extensão da marcação da membrana, citoplasma ou núcleo (a depender do anticorpo) em relação a área do tumor inteiro. Os resultados foram expressos de forma semiquantitativa baseado em um sistema de pontuação de imunorreatividade (IRS) bem estabelecido^{153; 154}. O IRS é calculado pelo produto da porcentagem de células positivas (0= 0%; 1= 1-10%; 2=11-50%; 3=51-80%; 4= > 80%) e a intensidade da

marcação (0= sem coloração; 1=leve; 2=moderada; 3= forte), o que resulta em pontuações de IRS 0 (sem coloração) a 12 (coloração máxima).

Exceções a utilização desse escore são o Ki-67, que é dado em porcentagem de marcação na amostra analisada, e a CK18, que é utilizado para a avaliação do padrão de granulação do GH nos somatotropinomas. Os DGA apresentam um padrão perinuclear de marcação, enquanto os SGA apresentam agregados concêntricos de filamentos de queratina fortemente reagentes, os chamados corpos fibrosos.

4.6 Análise estatística

Inicialmente, os dados quantitativos foram avaliados com o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade de distribuição dos valores. Para as variáveis com distribuição normal, os dados foram apresentados como média e desvio padrão (DP) e avaliados pelo testes de variâncias para amostras independentes (ANOVA independentes). As variáveis com distribuição não-paramétrica foram apresentadas como mediana e 25 e 75 percentis e avaliadas pelo teste de Mann-Whitney U ou Kruskal-Wallis quando comparados dois grupos ou mais, respectivamente. As variáveis categóricas foram expressas em valores absolutos e relativos e avaliadas pelos teste de qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher, conforme apropriado. O coeficiente de correlação de Spearman foi determinado para verificar a relação entre duas variáveis. Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando-se 4 diferentes grupos de comparação, a saber: (1) LRS resistentes *versus* LRS responsivos aos LRS, (2) tumores invasivos *versus* não-invasivos, (3) tumores T2W-hipo *versus* T2W-iso *versus* T2W-hiper e (4) DGA *versus* SGA. As análises foram realizadas utilizando o programa Stata®, versão 14.6, para Windows (Stata Corp LLC, USA). O valor de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização clínica, anatomopatológica e de imagem dos pacientes

A coorte final deste trabalho compreende 52 pacientes com acromegalia tratados primariamente com cirurgia. Dentre estes, 32 (61,5%) são do sexo feminino e a média de idade ao diagnóstico foi de $40,6 \pm 11,8$ anos. Os níveis séricos pré-operatórios de GH, IGF-1 e xULN-IGF-1 foram de 23,1 (9,3-94,6) ng/mL, 1085 (955-1291) ng/mL e 3,9 (3,4-4,6), respectivamente (Tabela 1).

Todos os tumores avaliados apresentaram IHQ positiva para GH, sendo que 32 (61,5%) foram positivos apenas para GH, 17 (32,7%) para GH e PRL e 3 (5,8%) para GH e FSH (Tabela 1).

Na análise das imagens hipofisárias, 50 (96%) dos casos foram classificados como macroadenomas e as medianas do maior eixo e do volume tumoral foram 20,5 (13,5-27,5) mm e 3,7 (0,8-6,5) cm³, respectivamente. Ao estudar o sinal do adenoma em T2W verificou-se que 24 (46%) eram T2W-hipo, 17 (33%) T2W-hiper e 11 (21%) T2W-iso. De acordo com a classificação de Knosp, observamos que 32 (61,5%) adenomas eram invasivos (Knosp 3A, 3B e 4) (Tabela 1).

Dos 52 pacientes analisados, 16 (31%) apresentaram remissão cirúrgica. A maioria dos pacientes com doença em atividade (34 de 36 casos) recebeu LRS como tratamento secundário. Destes, 21 (62%) evoluíram com resistência parcial ou total aos LRS e 13 (38%) obtiveram resposta satisfatória. Os outros dois pacientes que mantiveram acromegalia em atividade no pós-operatório foram tratados e obtiveram controle da doença com cabergolina, estrogênio oral e/ou modulador seletivo do receptor de estrógeno (clomifeno).

No apêndice C são mostrados os valores individuais das variáveis analisadas para cada paciente.

5.2 Expressão dos marcadores survivina, 4-EBP1, CK18, SSTR2, SSTR5, E-caderina, filamina em somatotrofinomas e na hipófise normal

O padrão de marcação da survivina, 4-EBP-1 e filamina foram predominantemente citoplasmáticos enquanto do E-caderina, SSTR2 e SSTR5 membranosos. A Tabela 2 mostra a comparação da expressão desses marcadores em somatotrofinomas e hipófises normais. A Figura 7 ilustra a análise IHQ de alguns marcadores avaliados nesse estudo.

Tabela 1 - Características clínicas, imuno-histopatológicas e de imagem dos pacientes

Variável	
Sexo (M: F) (n/%)	20 (38,5): 32 (61,5)
Idade (anos)	40,6 ± 11,8
<i>Nível hormonal</i>	
GH (ng/mL)	23,1 (9,3-94,6)
IGF-1(ng/mL)	1085 (955-1291)
IGF-1 (xULN)	3,9 (3,4-4,6)
LH: FSH (mUI/mL)	3,5 ±4,8: 9 ±16,7
Estradiol (ng/dL)	31,2 ±20,7
Testosterona T: L(ng/dL)	197,2 ±174: 154 ±121
TSH (mU/L)	1,4 ±0,8
T4 livre (ng/dl)	1,1 ±0,8
PRL (ng/mL)	33 ±68,7
ACTH (pg/mL)	33,3 ±17,7
Cortisol (µg/dL)	10,7 ±5,3
<i>RM</i>	
Maior diâmetro tumoral(mm)	20,5 (13,5-27,5)
Volume (cm ³)	3.7 (0.8-6.5)
Macro: micro (n/%)	50 (96) :2 (4)
<i>T2W</i>	
hipo:iso:hiper (n/%)	24 (46):11 (21):17 (33)
<i>KNOSP</i>	
0: 1: 2: 3A:3B: 4(n/%)	5(9,5):7(13,5):8(15,5):11(21):11(21):10(19,5)
<i>Invasão</i>	
(sim:não) (n/%)	32 (61,5): 20 (38,5)
<i>Imuno-histoquímica</i>	
GH:GH+PRL:GH+FSH (n/%)	32 (61,5): 17 (32,7): 3 (5,8)
<i>Ki67</i>	
>1%:<1% (n/%)	18 (38,3):29 (61,7)
<i>Remissão cirúrgica</i>	
(sim:não) (n/%)	16 (31):36 (69)
<i>Resistência ao LRS</i>	
(sim:não) (n/%)	21 (61,8):13(38,2)

M: masculino; F: feminino; GH: Hormônio do crescimento; IGF-1: fator de crescimento semelhante a insulina 1; xULN: quantidade de vezes acima do limite superior normal; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio folículo estimulante; T: total; L: livre; TSH: hormônio tireoestimulante; T4: Tetraiodotironina; PRL: prolactina; ACTH: hormônio córtico-estimulante; LRS: Ligantes do receptor de somatostatina; RM: ressonância magnética; TW2: sinal da ressonância magnéticas ponderadas em T2. Dados expressos como média ± DP ou como mediana (variação).

Tabela 2 - Imunoreatividade da survivina, 4EBP1, SSTR2, SSTR5, E-caderina e filamina em somatotrofinomas e hipófises normais

Grupos	Descrição qualitativa		Avaliação semiquantitativa (IRS)	
	IRS 3-12 (N)	IRS 0-2 (N)	Mediana	P
Survivina				
Hipófise normal	0	6	1 (1-1)	<0,001
somatotrofinoma	42	10	4 (3-6)	
4EBP1				
Hipófise normal	0	9	0 (0-0)	<0,001
somatotrofinoma	34	18	3.5 (2-8)	
SSTR2				
Hipófise normal	0	9	1 (1-2)	<0,001
somatotrofinoma	45	6	6 (4-8)	
SSTR5				
Hipófise normal	1	9	2 (2-2)	0,01
somatotrofinoma	4	47	0 (0-2)	
E-caderina				
Hipófise normal	0	10	0 (0-0)	0,01
somatotrofinoma	4	47	0 (0-2)	
Filamina				
Hipófise normal	0	10	2 (2-2)	0,01
somatotrofinoma	10	41	0 (0-2)	

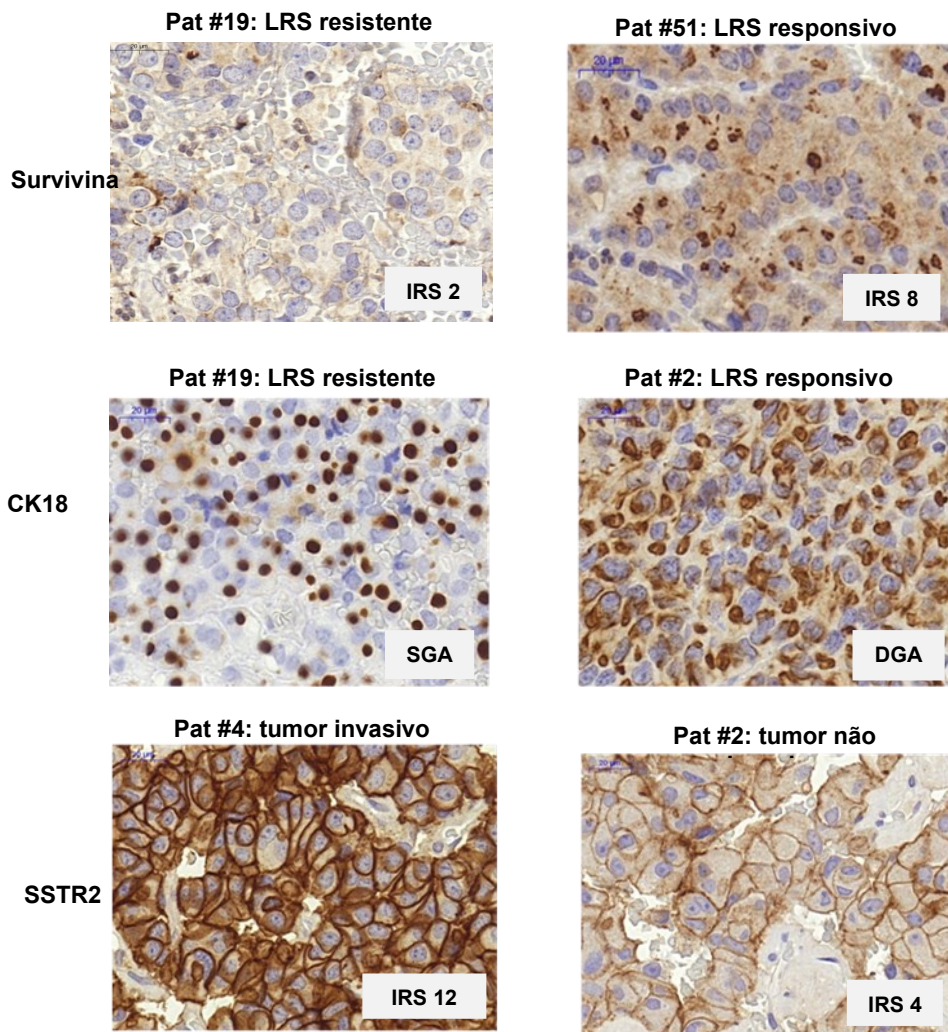
IRS: escore de imunoreatividade

5.3 Tumores LRS resistentes versus LRS responsivos: marcadores imunohistoquímicos, parâmetros clínicos/hormonais e tumorais

Entre os 34 pacientes que receberam LRS como tratamento secundário, a expressão de survivina foi menor nos adenomas LRS resistentes em relação aos LRS responsivos [4 (2–6) vs. 6 (4–7) P=0,042; Tabela 3; Gráfico 1]. O padrão de expressão da CK18 também foi associado a resposta ao LRS, com os SGA sendo menos responsivos que os DGA (7.7% vs. 92.3%, P= 0,041; Tabela 3; Gráfico 2). Além disso, pacientes LRS resistentes apresentavam menor idade ao diagnóstico (34.6±8.8 vs. 43.1±10.0 anos, P=0,01), maior frequência de adenomas com T2W-hiper (57.1% vs. 7.7%; P=0,01; Gráfico 2), níveis mais elevados de GH [6.9 ng/mL (3.4–29) vs. 3.7 ng/mL (1.6–8.3); P=0,045], IGF-1 [892 ng/mL (723–1140) vs. 588 ng/mL (449–731); P<0,01], e maior diâmetro tumoral [18.0 mm (4.0-40) vs. 10.0 mm (2.0-23), P= 0,026] que os LRS responsivos no pós-operatório (Tabela 3). A expressão de SSTR2

apresentou significância muito próxima para associação a resposta aos LRS [4 (3–7) LRS resistentes vs. 8 (4–12) LRS responsivos; $P=0,065$].

Figura 7 - Resultados das análises de imuno-histoquímica de amostras de somatotropinomas para os marcadores survivina, CK18 e SSTR2.



LRS: ligantes do receptor de somatostatina; IRS: escore de imunorreatividade; DGA: adenoma densamente granulado; SGA: adenoma esparsamente granulado
Fonte: próprio autor

Outras características, como o sexo, níveis hormonais e diâmetro tumoral basais, invasividade, Ki-67 e expressão de 4EBP1 não foram associadas a resistência ao tratamento com LRS (Tabela 3). Moderada correlação positiva foi observada entre a expressão da survivina e do SSTR2 ($\rho=0.5$; $P<0,01$, Gráfico 3a). O SSTR2 também apresentou uma correlação positiva moderada com o SSTR5 ($\rho=0.52$; $P=0,032$) e com a E-caderina ($\rho=0.58$; $P=0,01$, Gráfico 3a). Nenhuma outra

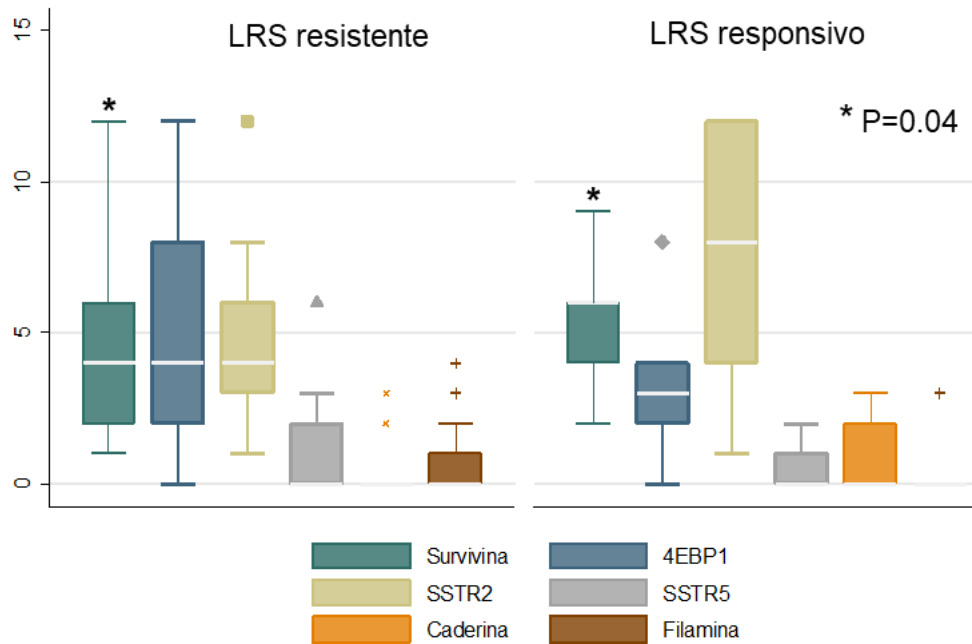
correlação foi observada entre quaisquer outros marcadores e características clínicas e tumorais. O nível de GH apresentou correlação positiva com o nível de IGF-1 e o tamanho tumoral antes e após tratamento com LRS (Gráfico 3a e Gráfico 3b, respectivamente).

Tabela 3 - Comparação entre as características clínicas, imuno-histopatológicas e de imagem entre pacientes LRS resistentes e LRS responsivos

Variável	LRS Resistentes (n=21)	LRS responsivos (n=13)	P
Sexo (F:M) (n/%)	15(71,4): 6(28,6)	7(53,8): 6(46,2)	0,301
Idade (anos)	34,6 ± 8,8	43,1 ± 10,0	0,01
<i>Nível hormonal -basal</i>			
GH (ng/mL)	64,7 (14,5-137,5)	63,7 (16,5-139,4)	0,872
IGF-1 (ng/mL)	1172 (1092-1396)	1087 (962-1385)	0,297
IGF-1 (xULN)	3,9 (3,5-5,1)	4,2 (3,1-5,2)	0,635
<i>RM basal (tamanho do tumor)</i>			
Maior diâmetro (mm)	27(22-34)	20(18-23)	0,135
Volume (cm ³)	6(4,3-13,2)	4(1,8-5)	0,156
Macro: micro	21:0	13:0	-
Invasão (sim:não) (n/%)	19 (90,5): 2 (9,5)	10 (76,9): 3 (23,1)	0,353
<i>Nível hormonal – pós-operatório</i>			
GH (ng/mL)	6,9 (3,4-29)	3,7 (1,6-8,3)	0,045
IGF-1 (ng/mL)	892 (723-1140)	588 (449-731)	<0,01
IGF-1 (xULN)	3,0 (2,2-4,0)	2,0 (1,8-2,9)	0,054
<i>RM pós-operatório (tamanho do tumor)</i>			
Maior diâmetro (mm)	18,0 (4,0-40,0)	10,0 (2,0-23,0)	0,026
<i>T2W (n/%)</i>			
Hipointenso	6 (28,6)	7 (53,8)	0,01
Isointenso	3 (14,3)	5 (38,5)	
Hiperintenso	12 (57,1)	1 (7,7)	
<i>Patologia e imuno-histoquímica</i>			
Ki67 (<1%: ≥1%) (n/%)	10(58,8): 7(41,2)	3(25): 9(75)	0,076
GH:GH+PRL:GH+FSH (n/%)	12(57):7(33):2(10)	9(69):4(31):0	0,744
CK18 (DGA:SGA) (n/%)	10(55,6): 8(44,4)	12(92,3): 1(7,7)	0,041
SSTR2	4 (3-7)	8 (4-12)	0,065
SSTR5	0(0-2)	0(0-1)	0,384
Survivina	4 (2-6)	6 (4-7)	0,042
4EBP1	4 (2-8)	3 (2-4)	0,286
E-caderina	0 (0-0)	0 (0-2)	0,127
Filamina	0 (0-1)	0 (0-0)	0,488

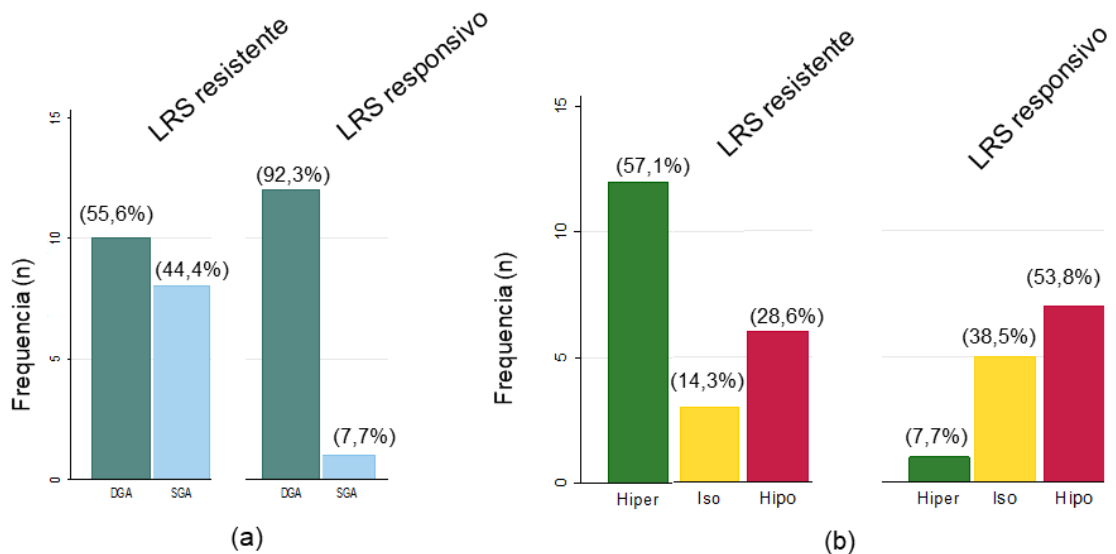
M: masculino; F: feminino; xULNR: quantidade de vezes acima do limite superior normal. Dados expressos como média ± DP ou como mediana (variação).

Gráfico 1 - Boxplots do nível de expressão proteica dos marcadores (survivina, 4EBP1, SSTR2, SSTR5, E-caderina e filamina) entre somatotropinomas LRS resistentes e LRS responsivos.



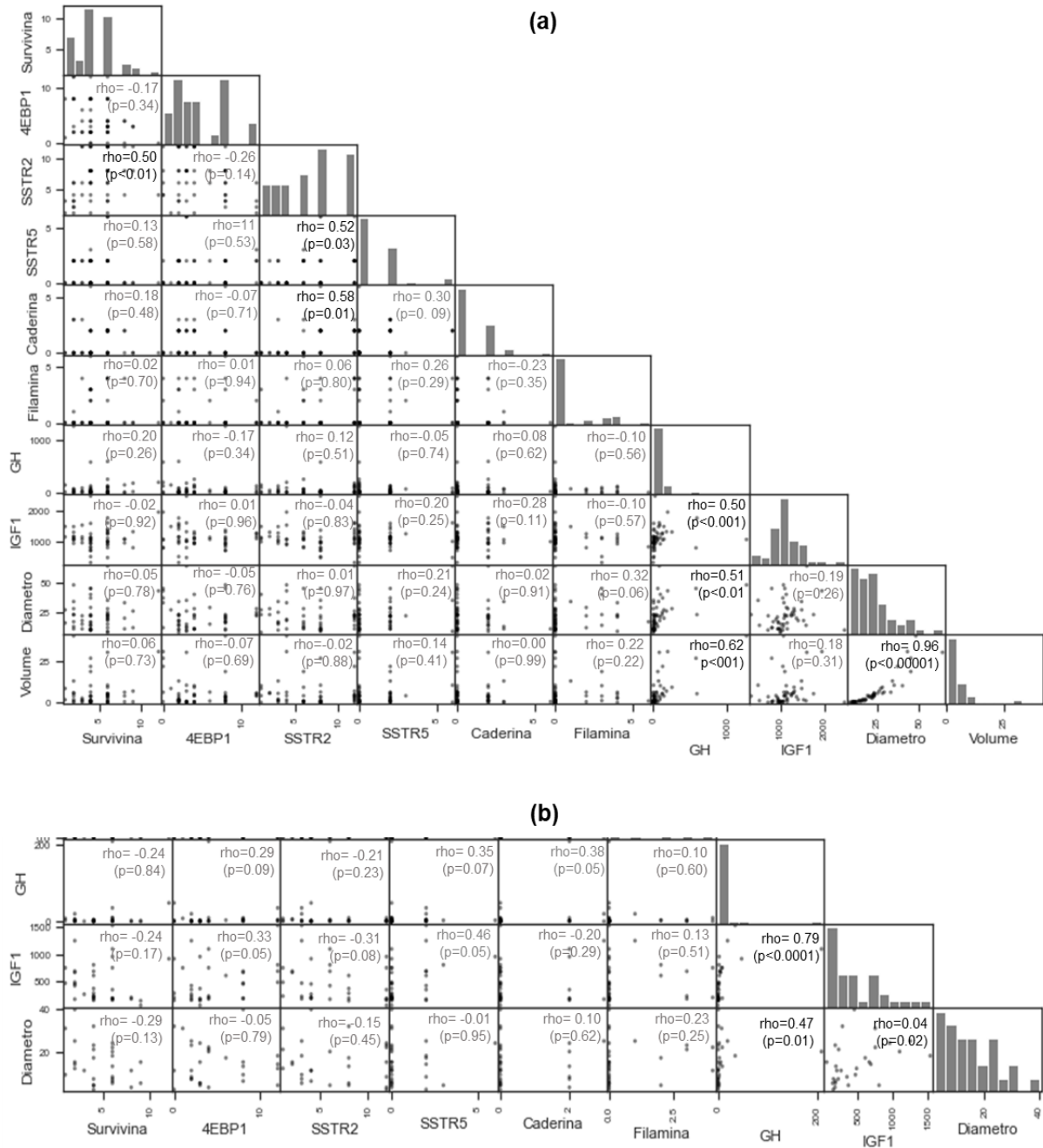
Fonte: próprio autor

Gráfico 2 - Gráfico de barras mostrando a distribuição de (a) DGA e SGA, $P=0,041$ e (b) T2W, $P=0,01$ entre somatotropinomas LRS resistentes e LRS responsivos.



Fonte: próprio autor

Gráfico 3 - Matriz de correlação de Spearman's entre as variáveis selecionadas e a expressão proteica dos marcadores avaliados nos somatotropinomas (a) antes e (b) depois do tratamento com LRS. As correlações significantes são mostradas em preto.



Fonte: próprio autor

5.4 Tumores invasivos versus não invasivos: marcadores imuno-histoquímicos, parâmetros clínicos/hormonais e tumorais

Para esta análise, foram avaliados os 52 pacientes. A tabela 4 apresenta a relação entre a invasividade tumoral e as características clínicas/laboratoriais dos pacientes, o fenótipo tumoral e os marcadores proteicos avaliados.

Menor idade de diagnóstico (37.4 ± 9.2 vs. 45.5 ± 13.8 anos; $P=0,032$) e maior diâmetro tumoral [23.0 mm (15.5–33.5) vs. 17.0 mm (11.5–22.0); $P=0.045$] foram associados a tumores invasivos. Consequentemente, estes últimos também apresentaram maior remanescente tumoral no pós-operatório [14.0 mm (8–21) vs. 6.0 mm (4–8.5); $P=0,006$] (Gráfico 4).

Ainda, os tumores invasivos apresentaram valores basais significativamente mais elevados de GH [56.8 ng/mL (14.6–113.5) vs. 12.8 ng/mL (6.1–23.1); $P=0,01$] e IGF-1 [1138 ng/mL (1038–1343) vs. 988 ng/mL (828–1133); $P= 0,023$] em relação aos não invasivos (Gráfico 4). Adicionalmente, a remissão cirúrgica foi significativamente menor no grupo de tumores invasivos (Tabela 4, Gráfico 5).

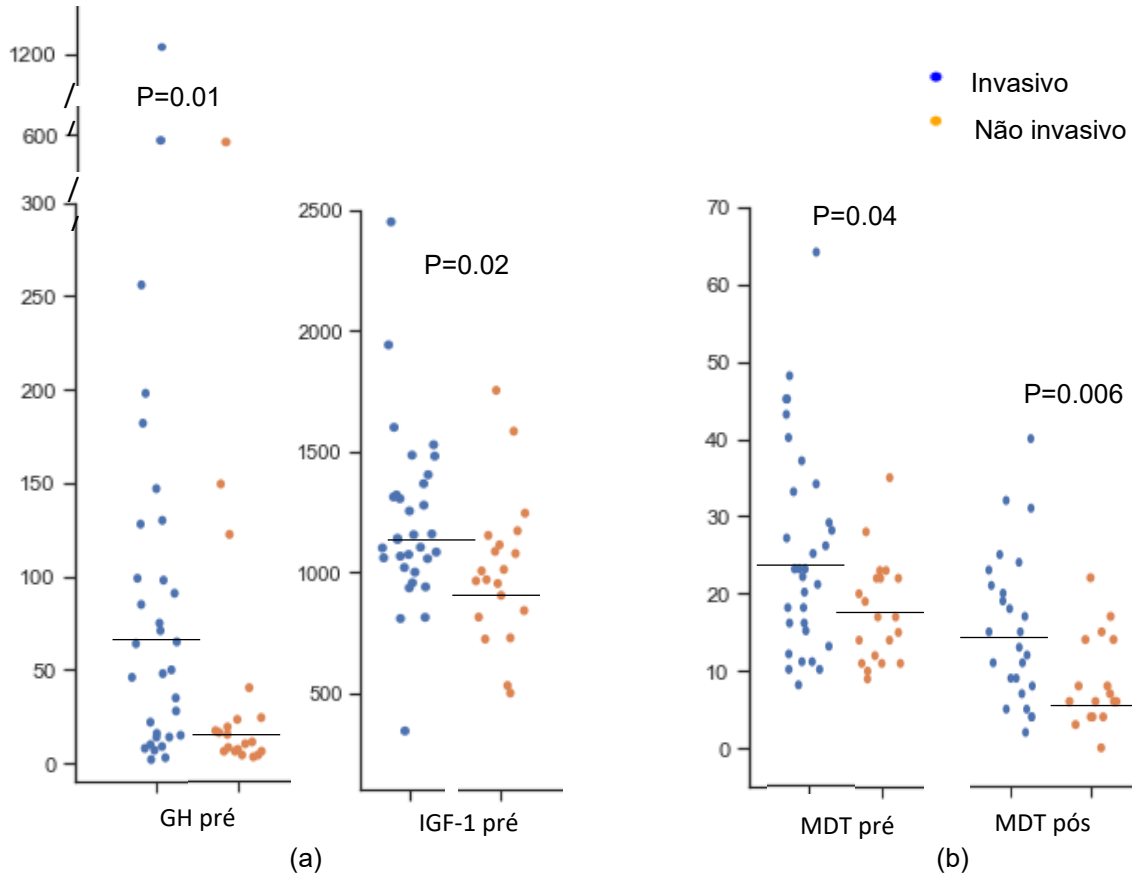
Uma menor expressão de E-caderina [0 (0–1) vs. 2 (0–2); $P=0,043$] e de SSTR2 [6 (0–1) vs. 8 (0–2); $P=0,033$] foram também relacionadas a invasividade tumoral. Em relação a expressão dos outros marcadores não houve diferença estatisticamente significativa neste grupo de pacientes (Tabela 4, Gráfico 6).

Tabela 4 - Comparação entre as características clínicas, imuno-histopatológicas e de imagem entre pacientes com tumores invasivos e não invasivos

Variável	Invasivo (n=32)	Não-invasivo (n=20)	P
Sexo (F:M) (n/%)	21 (65,6): 11 (34,4)	11 (55,0): 9 (45,0)	0,445
Idade (anos)	37,4 ± 9,2	45,5 ± 13,8	0,032
<i>Nível hormonal -basal</i>			
GH (ng/mL)	56,8 (14,6-113,5)	12,8 (6,1-23,1)	0,01
IGF-1 (ng/mL)	1138 (1038-1343)	988 (828-1133)	0,023
IGF-1(xULN)	4,1 (3,4-4,9)	3,8 (3,1-4,2)	0,195
<i>RM (tamanho tumoral)- basal</i>			
Maior diâmetro (mm)	23,0 (15,5-33,5)	17,0 (11,5-22,0)	0,045
Macro: micro (n/%)	31 (96,9) :1 (3,1)	19 (95,0) :1 (5,0)	0,994
Volume (cm ³)	4,3 (1,3-9,9)	1,7 (0,7-4,5)	0,052
<i>Nível hormonal – pós-cirúrgico</i>			
GH (ng/mL)	6,6 (3,1-11,7)	3,7 (1,6-38,7)	0,556
IGF-1 (ng/mL)	776 (606-1100)	630 (383-1144)	0,324
IGF-1(xULN)	2,8 (2,0-3,8)	2,7 (1,8-3,8)	0,796
<i>RM (tamanho tumoral) - pós-cirúrgico</i>			
Maior diâmetro (mm)	14 (8-21)	6 (4-8,5)	0,006
<i>T2W (n/%)</i>			
Hipointenso	13 (40,6)	11 (55,0)	0,574
Isointenso	7 (21,9)	4 (20,0)	
Hiperintenso	12 (37,5)	5 (25,0)	
<i>Remissão cirúrgica (sim:não) (n/%)</i>	2 (6,3):30 (93,8)	15 (75,0):5 (25,0)	<0,001
<i>Patologia e imuno-histoquímica</i>			
Ki67 (<1%: ≥1%) (n/%)	16(57,1):12(42,9)	13(68,4):6(31,6)	0,436
CK18 (DGA:SGA) (n/%)	20 (69,0):9 (31,0)	17 (89,5):2 (10,5)	0,168
SSTR2	6 (0-1)	8 (0-2)	0,033
SSTR5	0 (0-2)	0 (0-2)	0,457
Survivin	4 (2,5-6)	4 (3,5-6)	0,598
4EBP1	3 (2-8)	4 (2,5-8)	0,245
E-caderina	0 (0-1)	2 (0-2)	0,043
Filamina	0 (0-0,5)	0 (0-3)	0,436

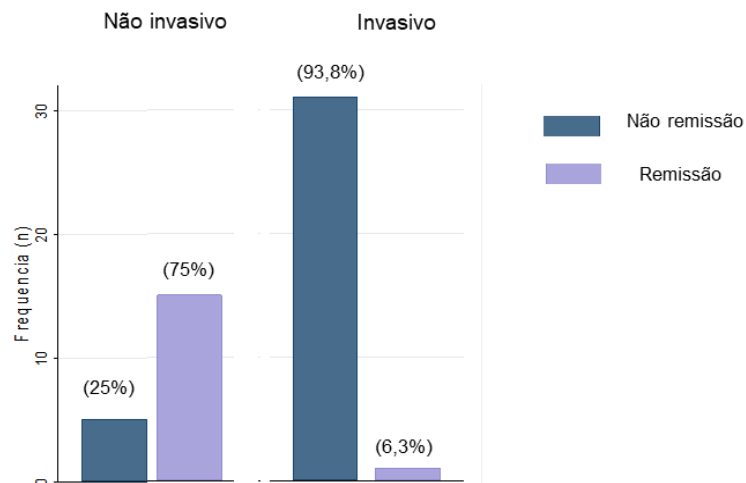
M: masculino; F: feminino; xULNR: quantidade de vezes acima do limite superior normal. Dados expressos como média ± DP ou como mediana (variação).

Gráfico 4 - Gráficos de dispersão mostrando a diferença nos níveis sérios basais de (a) GH e IGF-1 e (b) do diâmetro tumoral pré e pós-operatórios entre os tumores invasivos e não invasivos.



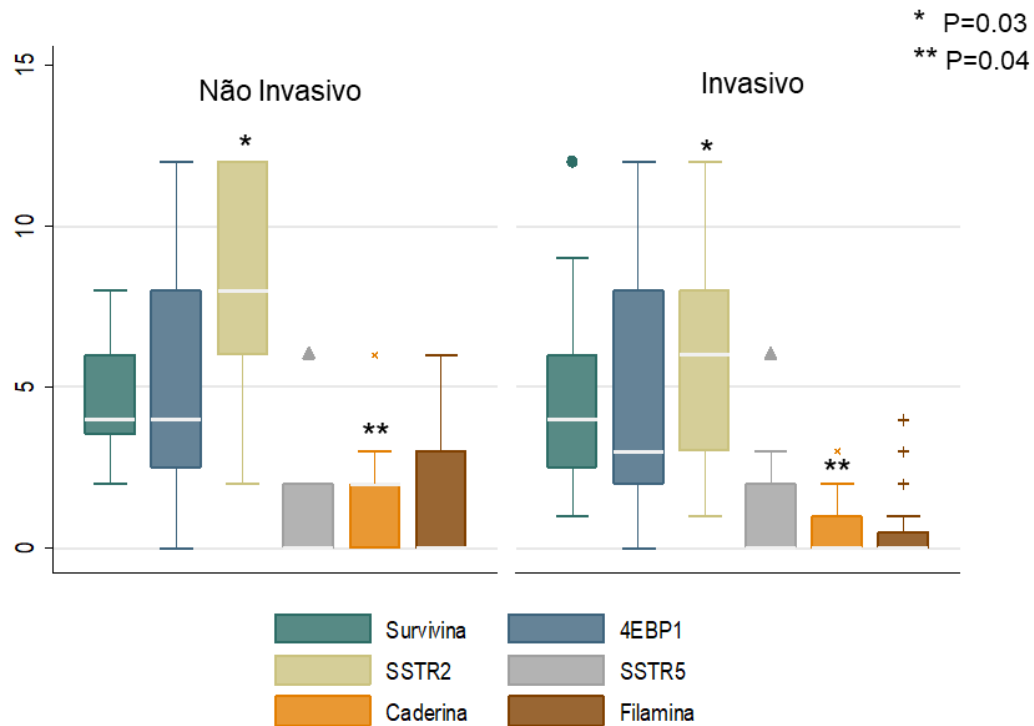
MDT: maior diâmetro tumoral.
 Fonte: próprio autor

Gráfico 5 - Gráfico de barras mostrando a diferença na taxa de remissão entre tumores invasivos e não invasivos, P<0,001.



Fonte: próprio autor

Gráfico 6 - Boxplots do nível de expressão proteica dos marcadores (survivina, 4EBP1, SSTR2, SSTR5, E-caderina e filamina) entre somatotropinomas invasivos e não invasivos.



Fonte: próprio autor

5.5 Outras associações

5.5.1 Padrão de granulação tumoral

Na avaliação da expressão da CK18, 4 dos 52 tumores apresentaram marcação fraca ou inexistente. Dos 48 restantes, 37 (77%) e 11 (23%) foram classificados em DGA e SGA, respectivamente.

A Tabela 5 apresenta a relação entre DGA e SGA, e as características clínicas/laboratoriais dos pacientes, o fenótipo tumoral e os marcadores proteicos avaliados.

Tabela 5 - Comparação entre as características clínicas, imuno-histopatológicas e de imagem entre tumores densamente e esparsamente granulados (DGA e SGA, respectivamente).

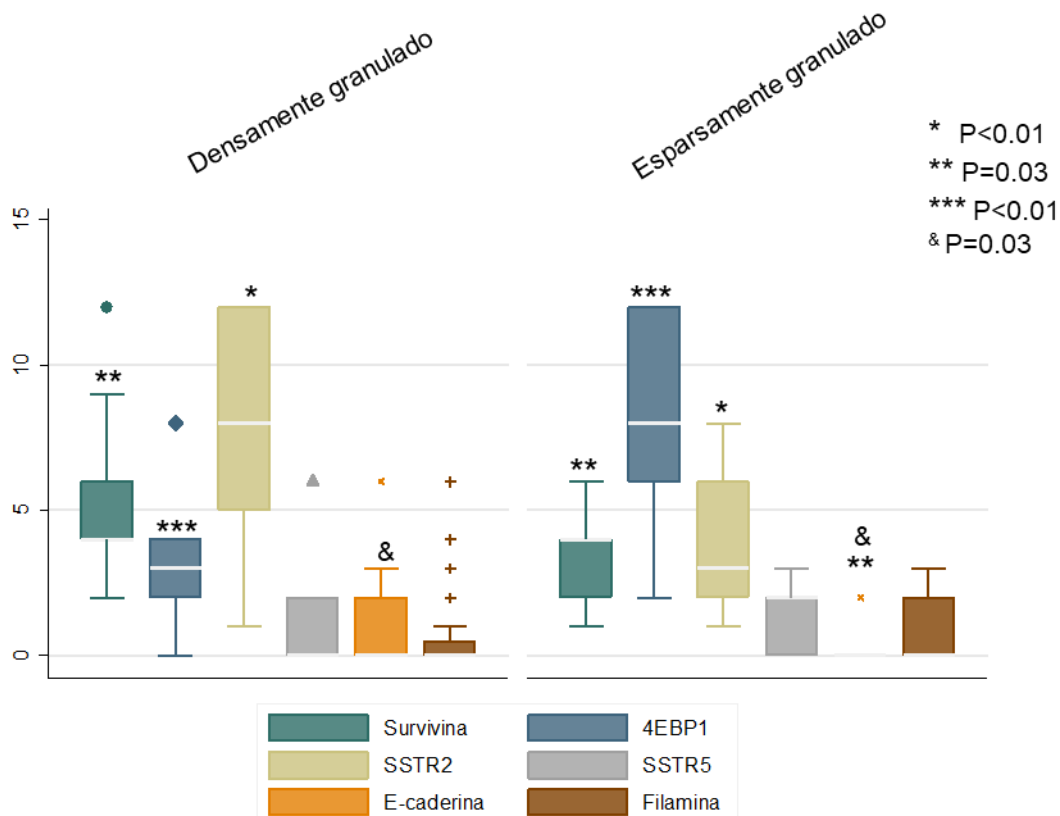
Variável	DGA (n=37)	SGA (n=11)	P
Sexo (F:M) (n/%)	22(59.5): 15(40.5)	9(81.8): 2(18.2)	0,172
Idade (anos)	42.7 ± 11.8	32.6 ± 7.0	0,01
<i>Nível hormonal -basal</i>			
GH (ng/mL)	23 (8-99)	46.0 (15.1-65)	0,923
IGF-1 (ng/mL)	1067 (936-1320)	1141 (1078-1254)	0,357
IGF-1 (xULN)	4.1 (3.4-4.6)	3.7 (3.4-4.9)	0,766
<i>Nível hormonal pós-cirúrgico</i>			
GH (ng/mL)	6.5 (2.5-23)	6.7 (3.6-7.2)	0,964
IGF-1 (ng/mL)	683 (563-1112)	871 (768-967)	0,254
IGF-1 (xULN)	2.7 (1.9-4.0)	2.9 (2.3-3)	0,975
<i>RM (tamanho do tumor) - basal</i>			
Maior diâmetro (mm)	20 (12-26)	23 (16-28)	0,313
Volume (cm ³)	3,2 (0,7-7,1)	4,3 (1,7-6)	0,382
Invasão (sim: não) (n/%)	20(54.1): 17(45.9)	9(81.8): 2(18.2)	0,097
<i>T2W (n/%)</i>			
Hipointenso	18 (85,7)	3 (14,3)	0,064
Isointenso	10 (91,0)	1 (9,0)	
Hiperintenso	9 (56)	7 (44)	
<i>RM (tamanho do tumor) – pós-cirúrgico</i>			
Maior diâmetro (mm)	11 (6-20)	10,5 (5-15)	0,622
<i>Patologia e imuno-histoquímica</i>			
Ki67 (<1%: ≥1%) (n/%)	24 (66.7): 12(33.3)	5(45.5): 6(54.5)	0,214
SSTR2	8 (5-12)	3(2-6)	<0,01
SSTR5	0 (0-2)	2 (0-2)	0,527
Survivin	4 (4-6)	4 (2-4)	0,032
4EBP1	3 (2-4)	8 (6-12)	<0,01
E-caderina	0 (0-2)	0 (0-0)	0,032
Filamina	0 (0-0,5)	0 (0-2)	0,928

M: masculino; F: feminino; xULNR: quantidade de vezes acima do limite superior normal. Dados expressos como média ± DP ou como mediana (variação).

Curiosamente, a expressão da survivina [4(4-6) DGA vs. 4(2-4) SGA; P=0,032], do SSTR2 [8(5-12) DGA vs. 3(2-6) SGA; P<0,01], e da E-caderina [0(0-2) DGA vs. 0(0-0) SGA; P=0,032], foi maior nos DGA em relação aos SGA (Tabela 5; Gráfico 7). O 4EBP1 apresentou um padrão de expressão inverso, sendo mais expressos SGA do que nos DGA [3(2-4) DGA vs. 8(6-12) SGA; P<0,01]. A idade ao diagnóstico também foi menor nos pacientes portadores de SGA (32.6±7 vs. 42.7±11,8 anos, P=0,01). Outras características, como o sexo, níveis hormonais,

tamanho tumoral, sinal em T2W, invasividade, Ki-67 e expressão de SSTR5 e filamina não foram associadas ao padrão de granulação tumoral (Tabela 5; Gráfico 7).

Gráfico 7 - Boxplots do nível de expressão proteica dos marcadores selecionados (survivina, 4EBP1, SSTR2, SSTR5, E-caderina e filamina) entre DGA e SGA.



Fonte: próprio autor

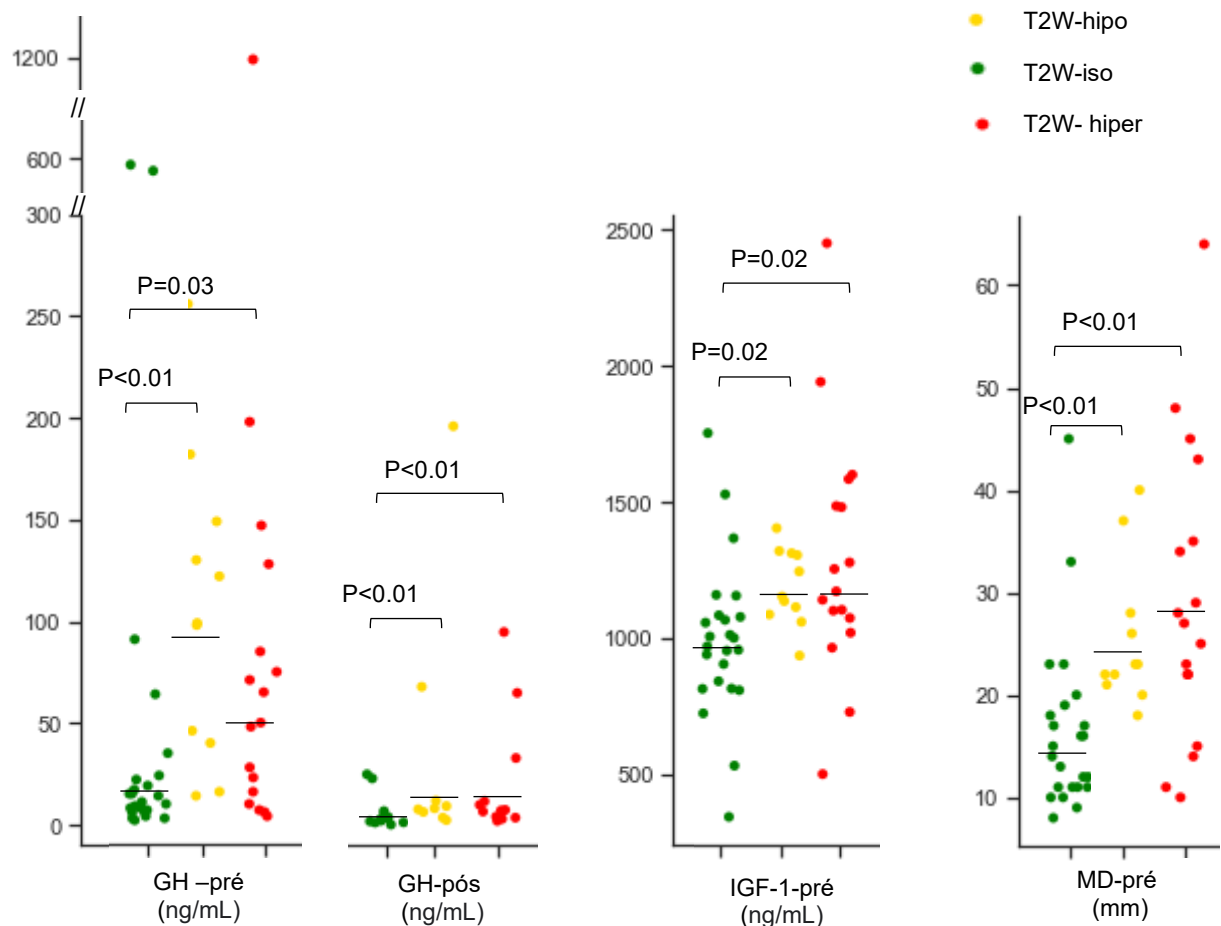
5.5.2 Ressonância magnética ponderada em T2

A Tabela 6 apresenta a relação entre a intensidade do sinal do tumor em T2W e as características clínicas/laboratoriais dos pacientes, o fenótipo tumoral e os marcadores proteicos avaliados.

Foi observado que os tumores T2W-hipo apresentavam menor tamanho [T2W-hipo 14,5 mm (11-18) vs T2W-iso 23 mm (21-28) vs T2W-hiper 27 mm (22-35); P<0,01] e volume [T2W-hipo 1,1 cm³ (0,6-2,9) vs T2W-iso 5,2 cm³ (3,1-9,4) vs T2W-hiper 5,8 cm³ (3,6-13,2); p<0,001] quando comparados aos tumores T2W-iso e T2W-hiper (Gráfico 8).

Os T2W-hipo também apresentaram os menores valores de GH [T2W-hipo: 12.3 ng/mL(6.8-22.9) vs T2W-hiper 50.0 ng/mL (12.9-106) vs T2W-iso 99.0 ng/mL (39.6-148); $P<0,01$] e IGF-1 [T2W-hipo 985.5 ng/mL (828.5-1081) vs T2W-hiper 1172 ng/mL (1047-1534) vs T2W-iso 1153 ng/mL (1087-1312); $P=0,01$] basais. Uma menor mediana de GH após tratamento cirúrgico também foi observada nesses tumores [T2W-hipo 3.0 ng/mL (1.5-9,5) vs T2W-hiper 7.2 ng/mL (3,7-11,7) vs T2W-iso 8,3 ng/mL (6,5-12) $P= 0,024$] (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Gráficos de dispersão mostrando a diferença nos níveis séricos de GH (pré e pós-cirúrgico), IGF-1 e diâmetro tumoral basais entre os somatotrofinomas com sinal T2W-hipo, T2W-hiper e T2W-iso.



MD: maior diâmetro; linha sólida: mediana.
Fonte: próprio autor

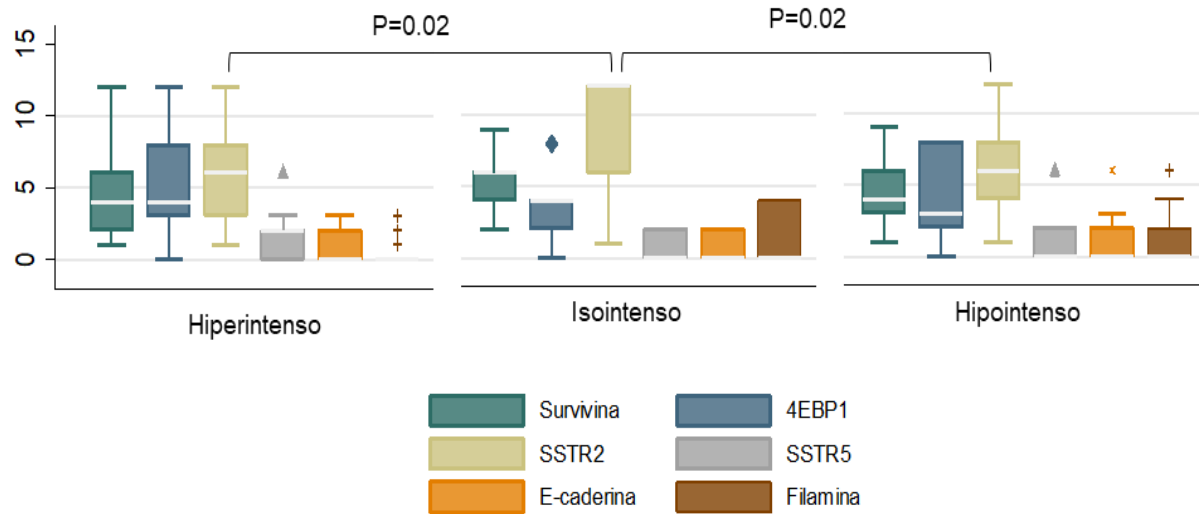
Quanto aos marcadores proteicos, apenas a maior expressão do SSTR2 foi associada a T2W-iso [T2W-iso 12 (6-12) vs T2W-hipo 6 (4-8) vs T2W-hiper (3-8), $P=0.043$] (Gráfico 9).

Tabela 6 - Comparação entre as características clínicas e imuno-histopatológicas em tumores com diferentes sinais na imagem de ressonância magnética ponderada em T2

Variável	T2W-hipo (n=24)	T2W-iso (n=11)	T2W-hiper (n=17)	P*
Sexo (F:M) (n/%)	14(58.3): 10(41.7)	5(45.5): 6(54.5)	13(76.5): 4(23.5)	0,243
Idade (anos)	43.7 ±12.2	41.8± 9.2	35.3± 11.4	0,075
<i>Nível hormonal -basal</i>				
GH (ng/mL)	12.3(6.8-22.9)	99.0 (39.6-148)	50.0 (12.9-106)	<0,01^a
IGF-1 (ng/mL)	985.5 (828.5-1081)	1153(1087-1312)	1172 (1047-1534)	0,01^b
IGF-1 (xULN)	3.5 (3.1-4.1)	4.2 (4.1-4.7)	3.9 (3.5-5.7)	0,054
<i>Nível hormonal - pos-cirúrgico</i>				
GH (ng/mL)	3.0 (1.9-5)	8.3 (6,5-12)	7.2 (3.7-11,7)	0,024^c
IGF-1 (ng/mL)	678 (563-768)	784 (630-1100)	892 (683-1137)	0,063
IGF-1 (xULN)	2.2 (1.8-2.7)	3.0 (2.4-4)	3.0 (2.3-4.9)	0,056
<i>RM (tamanho do tumor)</i>				
Maior diâmetro (mm)	14,5 (11-18)	23 (21-28)	27 (22-35)	<0,01^d
Volume (cm ³)	1,1 (0,6-2,9)	5,2 (3,1-9,4)	5,8 (3,6-13,2)	<0,001
Macro: micro (n/%)	22 (91.7): 2(8.3)	11 (100): 0	17 (100): 0	0,697
Remissão cirúrgica (sim:não) (n/%)	10 (41.7): 14(58.3)	2 (18.2): 9(81.8)	4 (29.4): 13(70.6)	0,376
<i>Patologia e imuno-histoquímica</i>				
Ki67 (>1%: <1%) (n/%)	15 (68.2): 7(31.8)	6(54.5): 5(45.5)	8(57.1): 6(42.9)	0,699
SSTR2	6 (4-8)	12 (6-12)	6 (3-8)	0,043^e
SSTR5	0 (0-2)	0 (0-2)	2 (0-2)	0,097
Survivin	4(3-6)	6 (4-6)	4 (2-6)	0,325
4EBP1	3(2-8)	4(2-4)	4 (3-8)	0,354
E-caderina	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)	0,918
Filamina	0 (0-2)	0 (0-4)	0 (0-0)	0,523

M: masculino; F: feminino; RM: ressonância magnética. *grupos que apresentaram P significativo: a) T2W-hiper x T2W-hipo: 0,032, T2W-hipo x T2W-iso: <0,01; b) T2W-hiper x T2W-hipo: <0,01, T2W-hipo x T2W-iso: <0,01; c) T2W-hiper x T2W-hipo: 0,024, T2W-hipo x T2W-iso: 0,026; d) T2W-hiper x T2W-hipo: <0,01, T2W-hipo x T2W-iso: <0,001; e) T2W-hipo x T2W-iso: 0,022, T2W-hiper x T2W-iso: 0,023. Dados expressos como média ± DP ou como mediana (variação).

Gráfico 9 - Boxplots do nível de expressão proteica dos marcadores selecionados (survivina, 4EBP1, SSTR2, SSTR5, E-caderina e filamina) entre somatotropinomas com T2W-hipo, T2W-hiper e T2W-iso.



Fonte: próprio autor

5.5.3 Remissão cirúrgica

Uma menor taxa de cura cirúrgica foi observada em pacientes mais jovens ($38,2 \pm 9,9$ vs $46 \pm 14,1$, $P=0,034$); tumores invasivos, com maior valor sérico basal de GH [$64,5$ ng/mL (15,5-129) vs 9 ng/mL (6-16,5); $P<0,001$] IGF-1 [1148 ng/mL (1058-1343) vs 967 ng/mL (772-1045); $P<0,01$]. Maior tamanho tumoral foi também associado a baixa remissão cirúrgica [$23,0$ mm (17,0-31,0) vs $14,0$ mm (11-19,5); $P<0,01$]; Tabela 7, Gráfico 10].

Em relação aos marcadores proteicos não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 7 - Comparação entre as características clínicas, imuno-histopatológicas e de imagem entre pacientes com remissão após o tratamento cirúrgico.

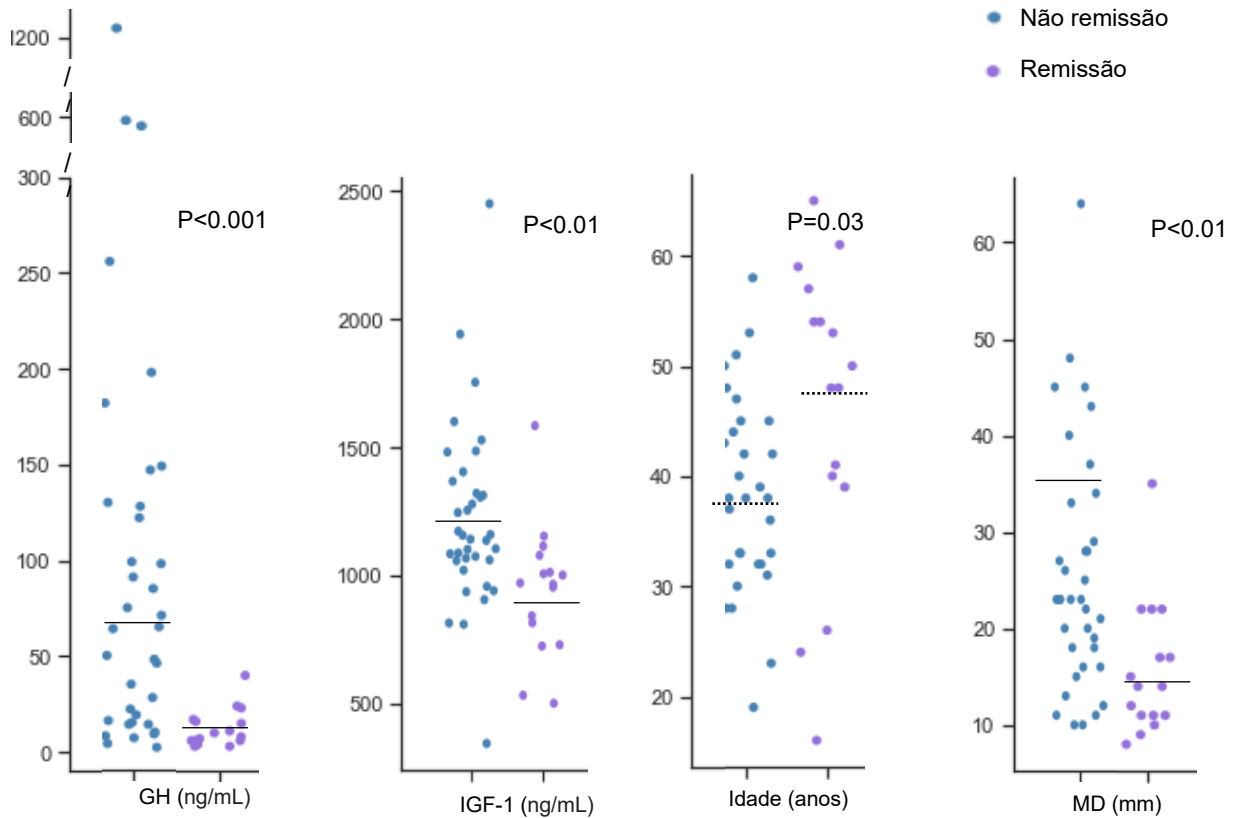
Variável	Remissão (n=16)	Não-remissão (n=36)	P
Sexo (F:M) (n/%)	8 (50): 8 (50)	24 (66,7): 12 (33,3)	0,251
Idade (anos)	46 ± 14,1	38,2 ± 9,9	0,034
<i>Níveis hormonais -basal</i>			
GH (ng/mL)	9 (6-16,5)	64,5 (15,5-129)	<0,001
IGF-1 (ng/mL)	967 (772-1045)	1148(1058-1343)	<0,01
IGF-1 (xULN)	3,6 (3,1-4,1)	4,9 (4-6,8)	0,053
<i>RM (tamanho tumoral)- basal</i>			
Maior diâmetro (mm)	14,0 (11-19,5)	23,0 (17,0-31,0)	<0,01
Macro: micro (n/%)	14 (87,5) :2 (12,5)	36 (100) :0	0,095
Volume (cm ³)	1,1 (0,5-2,4)	4,8 (1,8-9)	<0,01
<i>RM (tamanho tumoral) - pós-cirúrgico</i>			
Maior diâmetro (mm)	6 (4-11)	13 (7-21)	0,023
<i>Patologia e imuno-histoquímica</i>			
Ki67 (<1%: ≥1%) (n/%)	12(75):4(25)	17(55):14(45)	0,225
SSTR2	8 (6-10)	6 (3-8)	0,115
SSTR5	1 (0-2)	0 (0-2)	0,338
Survivin	4 (3,5-6)	4 (2,5-6)	0,988
4EBP1	4 (2-8)	3 (2-8)	0,784
E-caderina	2 (0-2)	0 (0-2)	0,055
Filamina	0 (0-2,5)	0 (0-1)	0,546

M: masculino; F: feminino; GH: Hormônio do crescimento; IGF-1: fator de crescimento semelhante a insulina 1; xULNR: quantidade de vezes acima do limite superior normal; RM: ressonância magnética. Dados expressos como média ± DP ou como mediana (variação).

5.6 Adenomas gigantes

Nossa amostra dispõe de 6 adenomas gigantes (tumores hipofisários com diâmetro maior que 4 cm). Destes, 5 (83%) são LRS resistentes, 4 (67%) expressam KI-67 >1% e 5 (83%) apresentam expressão positiva para survivina (IRS>2) e 4 para 4EBP-1 (IRS>0). Entretanto, não houve significância estatística com nenhum destes fatores.

Gráfico 10 - Gráficos de dispersão mostrando a diferença nos níveis séricos de GH, IGF-1 e diâmetro tumoral basais e idade de diagnóstico entre casos com e sem remissão cirúrgica.



MD: maior diâmetro; linha sólida: mediana; linha redondo pontilhada: média.
 Fonte: próprio autor

6 DISCUSSÃO

Os somatotropinomas, como todos os tumores neuroendócrinos, apresentam uma heterogeneidade biológica intrínseca que se reflete numa expressão clínica que varia desde um pequeno microadenoma localizado com atividade bioquímica discreta até macroadenomas associados com altos níveis hormonais, extensão supra/parasselar e/ou agressividade. Na maioria dos pacientes, principalmente aqueles com tumores intrasselares, a CTS continua sendo o tratamento primário de escolha^{5; 8}.

Verifica-se, contudo, que a maioria dos somatotropinomas apresentam-se como macroadenomas e assim, um percentual importante de pacientes não alcançam remissão cirúrgica e necessitam de tratamento adjuvante no pós-operatório^{5; 51}. Devido à diversidade de opções de tratamentos medicamentosos (cabergolina, LRS e pegvisomanto), observa-se um movimento crescente no sentido de personalizar o tratamento com medicamentos que melhor correspondam às características clínico-patológicas do paciente. No entanto, essa tendência ainda não se consolidou totalmente na prática clínica.

Os LRS são o tratamento farmacológico mais amplamente usado na acromegalia em atividade, seja no pré ou pós-operatório¹⁵⁵. A literatura atual relata que aproximadamente 25-50 % dos pacientes evoluem com resistência aos LRS^{80; 156}. Entretanto, no serviço de neuroendocrinologia do HCFMUSP, observamos que aproximadamente 60% dos pacientes com acromegalia evoluem com resistência parcial ou total a esta classe de medicamentos. Durante as últimas décadas, têm sido feitos esforços para a identificação de fatores associados à resposta aos LRS que permitam individualizar o tratamento medicamentoso, bem como explorar o potencial desenvolvimento de terapias direcionadas.

O papel das vias de apoptose e proliferação celular ainda é pouco estudado e compreendido no desenvolvimento e comportamento dos somatotropinomas. Nosso estudo avaliou a expressão dos marcadores destas vias, correlacionando-os com dados clínicos, laboratoriais e de imagem, bem como com a resposta ao tratamento medicamentoso com os LRS.

No presente estudo apresentamos evidências claras de que a survivina é expressa em células hipofisárias normais e em somatotropinomas, entretanto em maiores níveis neste último. Este achado corrobora com estudos prévios que demonstram que a survivina é expressa, porém em níveis mais baixos, em tecidos normais de adultos, rompendo com o paradigma de que a expressão desta proteína

ocorre apenas em células embrionárias e/ou malignas^{157; 158; 159; 160}. Este dado favorece a hipótese de que o aumento na expressão de survivina seja um evento chave na transformação neoplásica, podendo ocorrer precocemente durante a tumorigênese.

Em relação à localização, em nosso estudo, a marcação da survivina foi citoplasmática. Estudos prévios relatando a localização da marcação da survivina em adenomas hipofisários apresentam resultados não uniformes. Alguns estudos citam achados em ambas localizações, enquanto outros descrevem achados apenas citoplasmático ou nuclear^{147; 154; 161; 162}. Metanálise avaliando o papel da survivina como biomarcador e preditor nas neoplasias neuroendócrinas gastroenteropancreáticas, concluiu que a expressão nuclear da survivina se correlacionou com a classificação tumoral mais agressiva e com pior prognóstico¹⁶³. Por outro lado, em tumores do sistema nervoso central, a expressão da survivina citoplasmática está associada a progressão rápida e fenótipo agressivo¹⁶⁴. Em adenomas hipofisários, o impacto no prognóstico da localização da marcação de survivina (nuclear ou citoplasmática) ainda não está estabelecido¹⁶².

Em nossa casuística, pacientes LRS resistentes apresentaram menor expressão de survivina quando comparados a pacientes LRS responsivos. Adicionalmente, SGA também se associaram significativamente a menor expressão desta proteína. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo correlacionando a expressão de survivina com a resposta aos LRS em somatotropinomas.

Em neoplasias malignas, a hiperexpressão de survivina tem sido associada ao prognóstico e à resistência ao tratamento medicamentoso^{94; 144; 165; 166; 167; 168}. Adamska e colaboradores observaram que a hiperexpressão de survivina se correlacionou com aumento da expressão da P-glicoproteína (P-gp), considerada a principal causa de resistência a quimioterapia em malignidades¹⁶⁶. Corroborando com este estudo, Deng e colaboradores mostraram que o controle da expressão de survivina foi capaz de determinar diminuição na P-gp, revertendo a resistência a quimioterapia observada em alguns tumores malignos¹⁶⁹.

A maior atividade da via PI3K/Akt/(mTOR) desempenha um papel fundamental no crescimento, formação de metástase e resistência à quimioterapia em tecidos tumorais^{140; 170; 171}. Alguns estudos observaram que hiperexpressão de survivina pode favorecer maior atividade da via PI3K/Akt/ mTOR^{172; 173}, fornecendo uma base teórica para desenvolvimento de tratamentos com inibidores de survivina nas neoplasias com

resistência ao tratamento medicamentoso convencional^{174; 175}. Em tumores hipofisários, particularmente do tipo invasivo, observa-se uma hiperativação da via PI3K/AKT/mTOR, que também tem sido envolvida na tumorigênese^{134; 176; 177; 178}. No entanto, não temos estudos avaliando a expressão da survivina e via PI3K/AKT/mTOR em somatotropinomas LRS resistentes.

Curiosamente, a expressão de survivina apresentou correlação positiva moderada com a expressão de SSTR2, sugerindo interligação entre estes fatores. Este achado está em conformidade com Fotouhi e colaboradores que ao examinarem o efeito de um LRS de primeira geração em linhagem de células tumorais neuroendócrinas sugeriram a existência de um *crosstalk* entre SSTR e controle na expressão de survivina¹⁷⁹.

A expressão da survivina em nosso estudo não associou-se a invasividade tumoral, em concordância com alguns estudos prévios^{149; 162}. Contudo, metanálise recente envolvendo 489 pacientes¹⁴⁷, demonstrou que em 7 dos 9 estudos avaliados, a hiperexpressão de survivina correlacionou-se com invasividade em adenomas hipofisários. O autor discute que os resultados desta metanálise são consistentes com os resultados do próprio grupo, que mostra menor expressão de survivina em adenomas não invasivos do que nos invasivos. Portanto, o impacto da survivina na invasão tumoral ainda é controverso, limitando a sua indicação como potencial biomarcador de invasão tumoral hipofisária.

Outro dado interessante do nosso estudo foi que os somatotropinomas apresentaram uma maior expressão da proteína 4EBP-1. Este achado está em concordância com estudo anterior que avaliou as vias de proliferação em uma linhagem celular mamosomatotrófica isogênica (GH4C1), que abriga diferentes tipos de genótipos de receptor de fator de crescimento de fibroblastos (FGFR-4)¹⁸⁰. Os tumores GH4C1 demonstraram abundante sinalização da via mTOR, confirmado por elevada expressão de duas proteínas resultantes da ativação desta via, a (p)-S6 e 4EBP1. Este estudo também observou que o inibidor de mTOR RAD001 diminuiu a taxa de crescimento tumoral e a ativação da proteína S6, mas não teve ação sobre a 4EBP1. Após a inibição da mTOR, houve também redução significativa da atividade do GH, bem como nos valores séricos do IGF-1¹⁸⁰.

Em nosso estudo, os SGA apresentaram maior expressão de 4EBP1 em relação aos DGA, sugerindo elevada atividade proliferativa neste tipo de tumor. Em concordância, Zhang e colaboradores relataram hiperexpressão de (p)Akt, p-4EBP-

1e p-S6 em prolactinoma resistente a cabergolina. Neste mesmo estudo, observaram que o uso de everolimus (inibidor de mTOR) acarretou redução dos níveis de PRL e redução tumoral após 5 meses de uso deste medicamento¹⁸¹. Gorshtien e colaboradores observaram que, em cultura de células de somatotropinomas, o uso de RAD001 (inibidor de mTOR) reduziu a proliferação celular¹⁸². Corroborando com estes dados, Pivonello e colaboradores observaram que o uso de inibidores da PI3K associados ao everolimus foram efetivos em inibir a proliferação celular em linhagem celular GH3 e em cultura de células de somatotropinomas¹⁸³. Portanto, nossos dados mostram-se interessantes pois fornecem base racional para pesquisa e aplicação de novas opções de tratamento que envolvam esta via em somatotropinomas LRS resistentes.

Assim como descrito na literatura, outros dados encontrados em nossa casuística e associados aos LRS resistentes foram idade mais jovem, tumores com T2W-hiper e SGA^{33; 81; 156}. A expressão de SSTR2 apresentou significância muito próxima para associação a LRS resistentes ($P=0,065$). A expressão dos SSTRs no tumor é um pré-requisito para uma resposta adequada ao tratamento com LRS. A ausência destes receptores explica por si só a resistência completa aos LRS¹⁵². Contudo, em nossa casuística observamos que 43% (9:21) dos tumores estudados apresentaram elevado IRS de SSTR2 ($IRS \geq 6$ ¹⁵³) e ainda assim evoluíram como LRS resistentes. Além disto, em alguns casos, apenas uma resposta parcial aos LRS pode ser detectada, provavelmente devido à presença de mecanismos moleculares subjacentes comprometidos, envolvidos na expressão do SSTR, regulação negativa destes, tráfego intracelular ou transdução do sinal^{184; 185; 186; 187}. Estes dados corroboram com a hipótese de que vias intracelulares ainda não esclarecidas podem estar relacionadas a este desfecho^{81; 86; 187}.

A literatura já descreve que níveis elevados de GH basal estão associados à resistência aos LRS, contudo em nosso estudo não encontramos associação dos valores basais de GH e IGF-1 com este dado. Todavia, observamos que como sugerido por Colao e colaboradores¹⁸⁸, valores elevados destes hormônios no pós-operatório e maior diâmetro do resto tumoral foram diretamente associados aos LRS resistentes. Este fato reafirma que tumores de maior tamanho, invasivos e consequentemente com baixas taxas de remissão cirúrgica se comportam com difícil manejo clínico posterior.

Nosso estudo não observou associação entre gênero, níveis hormonais e diâmetro tumoral basais, invasividade, Ki-67, expressão de SSTR5 e expressão de 4EBP1 com resistência ao tratamento com os LRS.

Curiosamente a menor expressão da E-caderina também não se correlacionou aos LRS resistentes em nosso estudo, contrapondo estudos prévios^{118; 123; 189}. Entretanto, associou-se aos SGA e apresentou correlação positiva moderada com a expressão de SSTR2. Estes últimos dados estão em concordância com a literatura, que demonstra que a expressão de E-caderina associa-se aos subtipos histológicos dos somatotropinomas e com a expressão de SSTR2^{122; 123; 189}. A baixa expressão da E-caderina associou-se também à tumores invasivos. Este achado é comumente observado nas fases mais avançadas de uma variedade de tumores, pois esta proteína parece estar associada ao processo biológico da EMT^{114; 116; 190}. Em tumores hipofisários, incluindo os somatotropinomas, menor expressão de E-caderina já foi associada a invasão tumoral^{118; 119; 191}.

A expressão de FLNA não se associou aos LRS resistentes e/ou invasão tumoral. Este achado está consoante com estudo recente de Akdemir e colaboradores que não encontraram associação entre polimorfismos genéticos de FLNA e resposta ao tratamento com LRS em somatotropinomas¹¹². Entretanto, Peverelli e colaboradores apesar de não associarem a FLNA ao SSTR2, sugeriram que esta proteína parece ter um papel importante na estabilização e vias de sinalização deste receptor¹⁰⁹. Assim, os estudos avaliando FLNA em adenomas hipofisários demonstram resultados não conclusivos.

Os somatotropinomas invasivos não demonstraram maior expressão de Ki-67 e de 4-EBP1, achado que se contrapôs à hipótese de desregulação da via apoptótica e proliferativa nos tumores invasivos. Utilizamos em nossa pesquisa a definição do Ki-67 como positivo ou negativo devido ao valor de corte deste marcador ser heterogêneo na literatura^{35; 192; 193} e pelo fato dos nossos tumores não apresentarem índices elevados de marcador. Apenas sete pacientes apresentaram Ki-67 > 3%, mas nenhum destes apresentou comportamento agressivo.

Pacientes mais jovens, com níveis basais elevados de GH e IGF-1 e maior diâmetro tumoral anterior e após a cirurgia foram fatores associados a invasão tumoral. A correlação entre os níveis hormonais e o remanescente tumoral após a cirurgia provavelmente ocorreu devido a maior dificuldade de ressecção do tumor, visto que o diâmetro dos adenomas já era maior no pré-operatório. Um achado curioso

foi a associação de invasão tumoral com baixa expressão de SSTR2. Não há na literatura relato de que a presença ou não de SSTR2 por si só esteja associado a fatores intracelulares relacionados a invasividade. Contudo, analisando em conjunto nossos resultados, observamos que menor expressão de SSTR2 associou-se à baixa expressão de E-caderina e survivina, aos SGA, a T2W-hiper comparada a T2W-iso e significância próxima aos LRS resistentes. Assim, em nossa amostra a baixa expressão de SSTR2 demonstrou-se um marcador de pior prognóstico.

Na avaliação detalhada das imagens de RM no momento do diagnóstico, observamos que os tumores T2W-hipo associaram-se a menores níveis de GH e IGF-1 pré e pós-operatórios. Imagens T2W-hiper associaram-se a maior diâmetro tumoral e T2W-iso apresentaram maior expressão de SSTR2 que T2W-hiper e T2W-iso. Portanto, em concordância com os achados da literatura^{22; 33; 194; 195; 196; 197}, o sinal do adenoma hipofisário na RM basal ponderada em T2 demonstrou-se um fator preditivo de resposta aos LRS de primeira geração.

Outros achados do nosso estudo foram uma correlação positiva moderada entre a expressão de SSTR2 e SSTR5, assim como entre os níveis de GH com IGF-1 e diâmetro tumoral pré e pós-operatórios.

Em análise dos adenomas gigantes observamos, que apesar de não ter apresentado significância por provável amostragem em pequeno número, 83% foram LRS resistentes. Além disso, a expressão de survivina ocorreu em maiores medianas (≥ 6) em 83% destes pacientes enquanto as medianas de 4 EBP-1 foram menores (≤ 4) em 67% destes.

7 CONCLUSÕES

Aos estudarmos as vias de proliferação e apoptose em somatotropinomas invasivos e/ou resistentes aos LRS, observamos que a baixa expressão de survivina e SGA foram fatores associados aos LRS resistentes.

Adicionalmente, características clínicas e radiológicas como idade mais jovem, T2W-hiper, manutenção de níveis hormonais elevados e resto tumoral no pós-operatório também foram associadas a este desfecho.

Tumores invasivos associaram-se a baixa expressão de E-caderina e SSTR2.

A descrição e correlação das vias de apoptose e proliferação celular com invasão tumoral e resistência aos principais medicamentos para o tratamento da acromegalia abrem um novo campo para futuras pesquisas e desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 DE HERDER, W. W. The History of Acromegaly. *Neuroendocrinology*, v. 103, n. 1, p. 7-17, 2016. ISSN 1423-0194. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25572320> >.
- 2 MELMED, S. Pituitary-Tumor Endocrinopathies. *N Engl J Med*, v. 382, n. 10, p. 937-950, 03 2020. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32130815> >.
- 3 DAL, J. et al. Acromegaly incidence, prevalence, complications and long-term prognosis: a nationwide cohort study. *Eur J Endocrinol*, v. 175, n. 3, p. 181-90, Sep 2016. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27280374> >.
- 4 LAVRENTAKI, A. et al. Epidemiology of acromegaly: review of population studies. *Pituitary*, v. 20, n. 1, p. 4-9, Feb 2017. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27743174> >.
- 5 GIUSTINA, A. et al. A Consensus on the Diagnosis and Treatment of Acromegaly Comorbidities: An Update. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 105, n. 4, Apr 2020. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31606735> >.
- 6 VIEIRA NETO, L. et al. [Recommendations of Neuroendocrinology Department from Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism for diagnosis and treatment of acromegaly in Brazil]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 55, n. 9, p. 725-6, Dec 2011. ISSN 1677-9487. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231978> >.
- 7 GIUSTINA, A. et al. A Consensus on the Diagnosis and Treatment of Acromegaly Comorbidities: An Update. *J Clin Endocrinol Metab*, Oct 2019. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31606735> >.
- 8 KATZNELSON, L. et al. Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 99, n. 11, p. 3933-51, Nov 2014. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356808> >.
- 9 HARTMAN, M. L. et al. Somatotropin pulse frequency and basal concentrations are increased in acromegaly and are reduced by successful therapy. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 70, n. 5, p. 1375-84, May 1990. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2335577> >.

- 10 BARKAN, A. L.; BEITINS, I. Z.; KELCH, R. P. Plasma insulin-like growth factor-I/somatomedin-C in acromegaly: correlation with the degree of growth hormone hypersecretion. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 67, n. 1, p. 69-73, Jul 1988. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2897974> >.
- 11 YANG, M. J. et al. Changes in maternal serum insulin-like growth factor-I during pregnancy and its relationship to maternal anthropometry. *J Chin Med Assoc*, v. 76, n. 11, p. 635-9, Nov 2013. ISSN 1728-7731. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23948255> >.
- 12 TSENG, F. Y. et al. Serum levels of insulin-like growth factor 1 are negatively associated with log transformation of thyroid-stimulating hormone in Graves' disease patients with hyperthyroidism or subjects with euthyroidism: A prospective observational study. *Medicine (Baltimore)*, v. 98, n. 11, p. e14862, Mar 2019. ISSN 1536-5964. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30882687> >.
- 13 ISOTTON, A. L. et al. Effects of oral and transdermal estrogen on IGF1, IGFBP3, IGFBP1, serum lipids, and glucose in patients with hypopituitarism during GH treatment: a randomized study. *Eur J Endocrinol*, v. 166, n. 2, p. 207-13, Feb 2012. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22108915> >.
- 14 PARKINSON, C. et al. The relationship between serum GH and serum IGF-I in acromegaly is gender-specific. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, n. 11, p. 5240-4, Nov 2001. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701684> >.
- 15 POKRAJAC, A. et al. Variation in GH and IGF-I assays limits the applicability of international consensus criteria to local practice. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 67, n. 1, p. 65-70, Jul 2007. ISSN 0300-0664. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17437512> >.
- 16 BONNEVILLE, J. F.; BONNEVILLE, F.; CATTIN, F. Magnetic resonance imaging of pituitary adenomas. *Eur Radiol*, v. 15, n. 3, p. 543-8, Mar 2005. ISSN 0938-7994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15627195> >.
- 17 HARDY, J.; VEZINA, J. L. Transsphenoidal neurosurgery of intracranial neoplasm. *Adv Neurol*, v. 15, p. 261-73, 1976. ISSN 0091-3952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/945663> >.
- 18 WILSON, C. B. A decade of pituitary microsurgery. The Herbert Olivecrona lecture. *J Neurosurg*, v. 61, n. 5, p. 814-33, Nov 1984. ISSN 0022-3085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6092567> >.

- 19 KNOSP, E. et al. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery*, v. 33, n. 4, p. 610-7; discussion 617-8, Oct 1993. ISSN 0148-396X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8232800> >.
- 20 MICKO, A. S. et al. Invasion of the cavernous sinus space in pituitary adenomas: endoscopic verification and its correlation with an MRI-based classification. *J Neurosurg*, v. 122, n. 4, p. 803-11, Apr 2015. ISSN 1933-0693. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25658782> >.
- 21 MICKO, A. et al. Challenging Knosp high-grade pituitary adenomas. *J Neurosurg*, v. 132, n. 6, p. 1739-1746, May 2019. ISSN 1933-0693. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31151112> >.
- 22 ALHAMBRA-EXPÓSITO, M. R. et al. Association between radiological parameters and clinical and molecular characteristics in human somatotropinomas. *Sci Rep*, v. 8, n. 1, p. 6173, 04 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29670116> >.
- 23 TORTORA, F. et al. Pituitary magnetic resonance imaging predictive role in the therapeutic response of growth hormone-secreting pituitary adenomas. *Gland Surg*, v. 8, n. Suppl 3, p. S150-S158, Sep 2019. ISSN 2227-684X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31559182> >.
- 24 SHEN, M. et al. Predictive value of T2 relative signal intensity for response to somatostatin analogs in newly diagnosed acromegaly. *Neuroradiology*, v. 58, n. 11, p. 1057-1065, Nov 2016. ISSN 1432-1920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27516099> >.
- 25 PUIG-DOMINGO, M. et al. Magnetic resonance imaging as a predictor of response to somatostatin analogs in acromegaly after surgical failure. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 95, n. 11, p. 4973-8, Nov 2010. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739382> >.
- 26 HECK, A. et al. Intensity of pituitary adenoma on T2-weighted magnetic resonance imaging predicts the response to octreotide treatment in newly diagnosed acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 77, n. 1, p. 72-8, Jul 2012. ISSN 1365-2265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22066905> >.
- 27 POTORAC, I. et al. Pituitary MRI characteristics in 297 acromegaly patients based on T2-weighted sequences. *Endocr Relat Cancer*, v. 22, n. 2, p. 169-77, Apr 2015. ISSN 1479-6821. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25556181> >.

- 28 BURLACU, M. C. et al. T2-weighted magnetic resonance imaging characterization of prolactinomas and association with their response to dopamine agonists. *Endocrine*, v. 63, n. 2, p. 323-331, 02 2019. ISSN 1559-0100. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30267354> >.
- 29 YAMAMOTO, R. et al. Impact of preoperative pasireotide therapy on invasive octreotide-resistant acromegaly. *Endocr J*, v. 65, n. 10, p. 1061-1067, Oct 2018. ISSN 1348-4540. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30078825> >.
- 30 HAGIWARA, A. et al. Comparison of growth hormone-producing and non-growth hormone-producing pituitary adenomas: imaging characteristics and pathologic correlation. *Radiology*, v. 228, n. 2, p. 533-8, Aug 2003. ISSN 0033-8419. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12819334> >.
- 31 BAKHTIAR, Y. et al. Geometric survey on magnetic resonance imaging of growth hormone producing pituitary adenoma. *Pituitary*, v. 17, n. 2, p. 142-9, Apr 2014. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23504370> >.
- 32 POTORAC, I. et al. T2-weighted MRI signal predicts hormone and tumor responses to somatostatin analogs in acromegaly. *Endocr Relat Cancer*, v. 23, n. 11, p. 871-881, 11 2016. ISSN 1479-6821. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27649724> >.
- 33 DOGANSEN, S. C. et al. Clinicopathological significance of baseline T2-weighted signal intensity in functional pituitary adenomas. *Pituitary*, v. 21, n. 4, p. 347-354, Aug 2018. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29460202> >.
- 34 BATES, P. R. et al. Wide variation in surgical outcomes for acromegaly in the UK. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 68, n. 1, p. 136-42, Jan 2008. ISSN 1365-2265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17803712> >.
- 35 METE, O.; LOPES, M. B. Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol*, v. 28, n. 3, p. 228-243, Sep 2017. ISSN 1559-0097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28766057> >.
- 36 NEUMANN, P. E. et al. Fibrous bodies in growth hormone-secreting adenomas contain cytokeratin filaments. *Arch Pathol Lab Med*, v. 109, n. 6, p. 505-8, Jun 1985. ISSN 0003-9985. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2581522> >.

- 37 SWANSON, A. A. et al. Clinical, biological, radiological, and pathological comparison of sparsely and densely granulated somatotroph adenomas: a single center experience from a cohort of 131 patients with acromegaly. *Pituitary*, v. 24, n. 2, p. 192-206, Apr 2021. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33074402> >.
- 38 BRZANA, J. et al. Growth hormone granulation pattern and somatostatin receptor subtype 2A correlate with postoperative somatostatin receptor ligand response in acromegaly: a large single center experience. *Pituitary*, v. 16, n. 4, p. 490-8, Dec 2013. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23184260> >.
- 39 FOUIGNER, S. L. et al. Adenoma granulation pattern correlates with clinical variables and effect of somatostatin analogue treatment in a large series of patients with acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 76, n. 1, p. 96-102, Jan 2012. ISSN 1365-2265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722151> >.
- 40 SYRO, L. V. et al. Pathology of GH-producing pituitary adenomas and GH cell hyperplasia of the pituitary. *Pituitary*, v. 20, n. 1, p. 84-92, Feb 2017. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27586499> >.
- 41 YONEDA, A. et al. Pituitary adenomas that show a faint GH-immunoreactivity but lack fibrous body: Pit-1 adenoma with endocrinologically low activity. *Endocr Pathol*, v. 21, n. 1, p. 40-7, Mar 2010. ISSN 1559-0097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111911> >.
- 42 OBARI, A. et al. Clinicopathological features of growth hormone-producing pituitary adenomas: difference among various types defined by cytokeratin distribution pattern including a transitional form. *Endocr Pathol*, v. 19, n. 2, p. 82-91, 2008. ISSN 1046-3976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18629656> >.
- 43 KISELJAK-VASSILIADES, K. et al. Growth hormone tumor histological subtypes predict response to surgical and medical therapy. *Endocrine*, v. 49, n. 1, p. 231-41, May 2015. ISSN 1559-0100. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129651> >.
- 44 CHU, P. G.; LAU, S. K.; WEISS, L. M. Keratin expression in endocrine organs and their neoplasms. *Endocr Pathol*, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2009. ISSN 1046-3976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19214802> >.
- 45 CHEN, J. T. et al. Anti-cytokeratin CAM 5.2 does not act as a surrogate of the cytokeratin 8/18 monoclonal antibody. Comment on: "Utility of p63 in the differential diagnosis of atypical fibroxanthoma and spindle cell squamous cell

- carcinoma", in J Cutan Pathol 2009; 36: 543. J Cutan Pathol, v. 37, n. 10, p. 1123-4, Oct 2010. ISSN 1600-0560. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20175827> >.
- 46 HAN, C. P. et al. Antibody to cytokeratin (CK8/CK18) is not derived from CAM5.2 clone, and anticytokeratin CAM5.2 (Becton Dickinson) is not synonymous with the antibody (CK8/CK18). Hum Pathol, v. 41, n. 4, p. 616-7; author reply 617, Apr 2010. ISSN 1532-8392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226963> >.
- 47 HSU, J. D. et al. Anti-cytokeratin CAM5.2 is not a monoclonal antibody against cytokeratin 8/18. Clin Exp Dermatol, v. 35, n. 6, p. 672-3, Aug 2010. ISSN 1365-2230. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20337654> >.
- 48 CHAO, W. R. et al. Anticytokeratin CAM 5.2 does not correspond to antibodies CK 8/18. Head Neck Pathol, v. 7, n. 4, p. 398-9, Dec 2013. ISSN 1936-0568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23832710> >.
- 49 LEEI, C. K.; LIN, W. L.; HAN, C. P. Monoclonal antibody Cam 5.2 targeted mainly CK8, but not CK18--Comment on: "Chromophobe renal cell carcinoma with liposarcomatous dedifferentiation--report of a unique case. Int J Clin Exp Pathol. 2010 May 5; 3 (5):534-40.". Int J Clin Exp Pathol, v. 3, n. 7, p. 742, Aug 2010. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20830247> >.
- 50 ASA, S. L.; METE, O. Cytokeratin profiles in pituitary neuroendocrine tumors. Hum Pathol, v. 107, p. 87-95, Jan 2021. ISSN 1532-8392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33098891> >.
- 51 FLESERIU, M. et al. A Pituitary Society update to acromegaly management guidelines. Pituitary, v. 24, n. 1, p. 1-13, Feb 2021. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33079318> >.
- 52 DE HERDER, W. W. Acromegaly and gigantism in the medical literature. Case descriptions in the era before and the early years after the initial publication of Pierre Marie (1886). Pituitary, v. 12, n. 3, p. 236-44, 2009. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18683056> >.
- 53 SANDRET, L.; MAISON, P.; CHANSON, P. Place of cabergoline in acromegaly: a meta-analysis. J Clin Endocrinol Metab, v. 96, n. 5, p. 1327-35, May 2011. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21325455> >.

- 54 BOGUSZEWSKI, C. L. et al. Brazilian multicenter study on pegvisomant treatment in acromegaly. *Arch Endocrinol Metab*, v. 63, n. 4, p. 328-336, Jul 2019. ISSN 2359-4292. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31365632> >.
- 55 VAN DER LELY, A. J.; KOPCHICK, J. J. Growth hormone receptor antagonists. *Neuroendocrinology*, v. 83, n. 3-4, p. 264-8, 2006. ISSN 0028-3835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17047392> >.
- 56 COLAO, A. et al. Acromegaly. *Nat Rev Dis Primers*, v. 5, n. 1, p. 20, 03 2019. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30899019> >.
- 57 PATEL, Y. C. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*, v. 20, n. 3, p. 157-98, Jul 1999. ISSN 0091-3022. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433861> >.
- 58 VALE, W. et al. [Preliminary observations on the mechanism of action of somatostatin, a hypothalamic factor inhibiting the secretion of growth hormone]. *C R Acad Hebd Seances Acad Sci D*, v. 275, n. 25, p. 2913-6, Dec 1972. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4347575> >.
- 59 BRAZEAU, P. et al. Isolation of somatostatin (a somatotropin release inhibiting factor) of ovine hypothalamic origin. *Can J Biochem*, v. 52, n. 11, p. 1067-72, Nov 1974. ISSN 0008-4018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4609582> >.
- 60 GÜNTHER, T. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature. *Pharmacol Rev*, v. 70, n. 4, p. 763-835, 10 2018. ISSN 1521-0081. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30232095> >.
- 61 ROOSTERMAN, D. et al. Endothelin-converting enzyme-1 degrades internalized somatostatin-14. *Endocrinology*, v. 149, n. 5, p. 2200-7, May 2008. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276747> >.
- 62 JUTHANI, R. G. et al. Radiographic and clinical outcomes using intraoperative magnetic resonance imaging for transsphenoidal resection of pituitary adenomas. *J Neurosurg*, p. 1-12, Jul 2020. ISSN 1933-0693. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32619972> >.
- 63 BRUNO, J. F.; BERELOWITZ, M. Somatostatin receptors: orphan that found family and function. *Mol Cell Neurosci*, v. 4, n. 4, p. 307-9, Aug 1993. ISSN

- 1044-7431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19912937> >.
- 64 XU, Y. et al. Molecular cloning and sequencing of a human somatostatin receptor, hSSTR4. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 193, n. 2, p. 648-52, Jun 1993. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8512564> >.
- 65 DURÁN-PRADO, M. et al. A potential inhibitory role for the new truncated variant of somatostatin receptor 5, sst5TMD4, in pituitary adenomas poorly responsive to somatostatin analogs. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 95, n. 5, p. 2497-502, May 2010. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233783> >.
- 66 DURAN-PRADO, M et al. Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 94, n. 7, p. 2634-43, Jul 2009. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401364> >.
- 67 ENJALBERT, A. et al. Somatostatin receptors on rat anterior pituitary membranes. *Endocrinology*, v. 110, n. 5, p. 1634-40, May 1982. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6122557> >.
- 68 THORNER, M. O. et al. Physiological role of somatostatin on growth hormone regulation in humans. *Metabolism*, v. 39, n. 9 Suppl 2, p. 40-2, Sep 1990. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1976218> >.
- 69 AYIOMAMITIS, G. D. et al. Effects of octreotide and insulin on colon cancer cellular proliferation and correlation with hTERT activity. *Oncoscience*, v. 1, n. 6, p. 457-67, 2014. ISSN 2331-4737. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25594044> >.
- 70 SHIMON, I. et al. Somatostatin receptor (SSTR) subtype-selective analogues differentially suppress in vitro growth hormone and prolactin in human pituitary adenomas. Novel potential therapy for functional pituitary tumors. *J Clin Invest*, v. 100, n. 9, p. 2386-92, Nov 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9410919> >.
- 71 THEODOROPOULOU, M. et al. Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 3-kinase signaling and inducing Zac1 expression. *Cancer Res*, v. 66, n. 3, p. 1576-82, Feb 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452215> >.

- 72 BERELOWITZ, M. et al. Regulation of somatostatin receptor mRNA expression. *Ciba Found Symp*, v. 190, p. 111-22; discussion 122-6, 1995. ISSN 0300-5208. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7587642> >.
- 73 SHIMON, I. et al. Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. *J Clin Invest*, v. 99, n. 4, p. 789-98, Feb 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9045884> >.
- 74 SOMVANSHI, R. K.; KUMAR, U. Pathophysiology of GPCR Homo- and Heterodimerization: Special Emphasis on Somatostatin Receptors. *Pharmaceuticals (Basel)*, v. 5, n. 5, p. 417-46, Apr 2012. ISSN 1424-8247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24281555> >.
- 75 DURÁN-PRADO, M. et al. Dimerization of G protein-coupled receptors: new avenues for somatostatin receptor signalling, control and functioning. *Mol Cell Endocrinol*, v. 286, n. 1-2, p. 63-8, May 2008. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242821> >.
- 76 ROCHEVILLE, M. et al. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*, v. 288, n. 5463, p. 154-7, Apr 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753124> >.
- 77 ROCHEVILLE, M et al Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem*, v. 275, n. 11, p. 7862-9, Mar 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713101> >.
- 78 HOFLAND, L. J. et al. Pituitary tumours: the sst/D2 receptors as molecular targets. *Mol Cell Endocrinol*, v. 326, n. 1-2, p. 89-98, Sep 2010. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20438803> >.
- 79 FLORIO, T. et al. Efficacy of a dopamine-somatostatin chimeric molecule, BIM-23A760, in the control of cell growth from primary cultures of human non-functioning pituitary adenomas: a multi-center study. *Endocr Relat Cancer*, v. 15, n. 2, p. 583-96, Jun 2008. ISSN 1351-0088. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18509006> >.
- 80 COLAO, A. et al. Resistance to somatostatin analogs in acromegaly. *Endocr Rev*, v. 32, n. 2, p. 247-71, Apr 2011. ISSN 1945-7189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123741> >.

- 81 GADELHA, M. R.; KASUKI, L.; KORBONITS, M. Novel pathway for somatostatin analogs in patients with acromegaly. *Trends Endocrinol Metab*, v. 24, n. 5, p. 238-46, May 2013. ISSN 1879-3061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23270713> >.
- 82 KASUKI, L. et al. AIP expression in sporadic somatotropinomas is a predictor of the response to octreotide LAR therapy independent of SSTR2 expression. *Endocr Relat Cancer*, v. 19, n. 3, p. L25-9, Jun 2012. ISSN 1479-6821. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22420004> >.
- 83 KATO, M. et al. Differential expression of genes related to drug responsiveness between sparsely and densely granulated somatotroph adenomas. *Endocr J*, v. 59, n. 3, p. 221-8, 2012. ISSN 1348-4540. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22200580> >.
- 84 CLEMMONS, D. R. et al. Optimizing control of acromegaly: integrating a growth hormone receptor antagonist into the treatment algorithm. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 88, n. 10, p. 4759-67, Oct 2003. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557452> >.
- 85 COELHO, M. C. A. et al. Molecular evidence and clinical importance of β -arrestins expression in patients with acromegaly. *J Cell Mol Med*, v. 22, n. 4, p. 2110-2116, 04 2018. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29377493> >.
- 86 LUQUE, R. M. et al. Truncated somatostatin receptor variant sst5TMD4 confers aggressive features (proliferation, invasion and reduced octreotide response) to somatotropinomas. *Cancer Lett*, v. 359, n. 2, p. 299-306, Apr 2015. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25637790> >.
- 87 KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027> >.
- 88 GOTTLIEB, R. A. Programmed cell death. *Drug News Perspect*, v. 13, n. 8, p. 471-6, Oct 2000. ISSN 0214-0934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12937619> >.
- 89 ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*, v. 19, p. 124-8, Jun 2004. ISSN 0886-1714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15143207> >.

- 90 LUO, X. et al. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, v. 94, n. 4, p. 481-90, Aug 1998. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727491> >.
- 91 BUDIHARDJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 15, p. 269-90, 1999. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611963> >.
- 92 GOTTLIEB, R. A. Mitochondria: execution central. *FEBS Lett*, v. 482, n. 1-2, p. 6-12, Sep 2000. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018514> >.
- 93 ADIDA, C. et al. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet*, v. 351, n. 9106, p. 882-3, Mar 21 1998. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9525374> >.
- 94 ADIDA, C et al Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, v. 111, n. 1, p. 196-203, Oct 2000. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11091201> >.
- 95 JAISWAL, P. K.; GOEL, A.; MITTAL, R. D. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res*, v. 141, n. 4, p. 389-97, Apr 2015. ISSN 0971-5916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26112839> >.
- 96 OBIOL-PARDO, C.; GRANADINO-ROLDÁN, J. M.; RUBIO-MARTINEZ, J. Protein-protein recognition as a first step towards the inhibition of XIAP and Survivin anti-apoptotic proteins. *J Mol Recognit*, v. 21, n. 3, p. 190-204, 2008 May-Jun 2008. ISSN 0952-3499. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18438971> >.
- 97 TAMM, I. et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, v. 58, n. 23, p. 5315-20, Dec 1998. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9850056> >.
- 98 REED, J. C.; BISCHOFF, J. R. BIRinging chromosomes through cell division--and survivin' the experience. *Cell*, v. 102, n. 5, p. 545-8, Sep 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007472> >.
- 99 REED, J. C. The Survivin saga goes in vivo. *J Clin Invest*, v. 108, n. 7, p. 965-9, Oct 2001. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11581297> >.

- 100 KRIEG, A. et al. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br J Cancer*, v. 86, n. 5, p. 737-43, Mar 04 2002. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11875736> >.
- 101 WALIGÓRSKA-STACHURA, J. et al. Survivin--prognostic tumor biomarker in human neoplasms--review. *Ginekol Pol*, v. 83, n. 7, p. 537-40, Jul 2012. ISSN 0017-0011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22880480> >.
- 102 CHEN, J. et al. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia*, v. 2, n. 3, p. 235-41, 2000 May-Jun 2000. ISSN 1522-8002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10935509> >.
- 103 DOHI, T. et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem*, v. 279, n. 33, p. 34087-90, Aug 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218035> >.
- 104 VAN DER FLIER, A.; SONNENBERG, A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta*, v. 1538, n. 2-3, p. 99-117, Apr 23 2001. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11336782> >.
- 105 NAKAMURA, F.; STOSSEL, T. P.; HARTWIG, J. H. The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adh Migr*, v. 5, n. 2, p. 160-9, 2011 Mar-Apr 2011. ISSN 1933-6926. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21169733> >.
- 106 SAVOY, R. M.; GHOSH, P. M. The dual role of filamin A in cancer: can't live with (too much of) it, can't live without it. *Endocr Relat Cancer*, v. 20, n. 6, p. R341-56, Dec 2013. ISSN 1479-6821. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24108109> >.
- 107 SHAO, Q. Q. et al. Filamin A: Insights into its Exact Role in Cancers. *Pathol Oncol Res*, v. 22, n. 2, p. 245-52, Apr 2016. ISSN 1532-2807. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26341089> >.
- 108 PEVERELLI, E. et al. Filamin-A is essential for dopamine d2 receptor expression and signaling in tumorous lactotrophs. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 97, n. 3, p. 967-77, Mar 2012. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22259062> >.

- 109 PEVERELLI, E et al. Filamin A (FLNA) plays an essential role in somatostatin receptor 2 (SST2) signaling and stabilization after agonist stimulation in human and rat somatotroph tumor cells. *Endocrinology*, v. 155, n. 8, p. 2932-41, Aug 2014. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24828612> >.
- 110 SCOTT, M. G. et al. Cooperative regulation of extracellular signal-regulated kinase activation and cell shape change by filamin A and beta-arrestins. *Mol Cell Biol*, v. 26, n. 9, p. 3432-45, May 2006. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611986> >.
- 111 KIM, K. M. et al. Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J Biol Chem*, v. 276, n. 40, p. 37409-14, Oct 05 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11473130> >.
- 112 AKDEMIR, A. S. et al. Association between β arrestin 2 and filamin A gene variations with medical treatment response in acromegaly patients. *Minerva Endocrinol (Torino)*, Oct 20 2021. ISSN 2724-6116. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34669321> >.
- 113 TSUCHIYA, B. et al. Differential expression of N-cadherin and E-cadherin in normal human tissues. *Arch Histol Cytol*, v. 69, n. 2, p. 135-45, Jun 2006. ISSN 0914-9465. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16819153> >.
- 114 RAKHA, E. A. et al. E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathology*, v. 46, n. 6, p. 685-93, Jun 2005. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15910600> >.
- 115 WU, H. C. et al. E-cadherin gene 3'-UTR C/T polymorphism is associated with prostate cancer. *Urol Int*, v. 75, n. 4, p. 350-3, 2005. ISSN 0042-1138. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16327305> >.
- 116 KALLURI, R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*, v. 119, n. 6, p. 1417-9, Jun 2009. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487817> >.
- 117 KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, v. 119, n. 6, p. 1420-8, Jun 2009. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487818> >.
- 118 GIL, J. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in the Resistance to Somatostatin Receptor Ligands in Acromegaly. *Front Endocrinol (Lausanne)*,

- v. 12, p. 646210, 2021. ISSN 1664-2392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33790868> >.
- 119 MENDES, G. A. et al. Expression of E-cadherin, Slug and NCAM and its relationship to tumor invasiveness in patients with acromegaly. *Braz J Med Biol Res*, v. 51, n. 2, p. e6808, Dec 11 2017. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29267504> >.
- 120 GIL, J. et al. Implications of Heterogeneity of Epithelial-Mesenchymal States in Acromegaly Therapeutic Pharmacologic Response. *Biomedicines*, v. 10, n. 2, Feb 16 2022. ISSN 2227-9059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35203668> >.
- 121 SOUKUP, J. et al. Predictive and prognostic significance of tumour subtype, SSTR1-5 and e-cadherin expression in a well-defined cohort of patients with acromegaly. *J Cell Mol Med*, v. 25, n. 5, p. 2484-2492, 03 2021. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33491286> >.
- 122 ZHOU, K.; JIN, H.; LUO, Y. Expression and significance of E-cadherin and β -catenins in pituitary adenoma. *Int J Surg Pathol*, v. 21, n. 4, p. 363-7, Aug 2013. ISSN 1940-2465. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349466> >.
- 123 VENEGAS-MORENO, E. et al. E-cadherin expression is associated with somatostatin analogue response in acromegaly. *J Cell Mol Med*, v. 23, n. 5, p. 3088-3096, 05 2019. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30843342> >.
- 124 KUSUMOTO, K. et al. Effect of E-cadherin expression on hormone production in rat anterior pituitary lactotrophs in vitro. *Acta Histochem Cytochem*, v. 43, n. 2, p. 83-8, May 01 2010. ISSN 1347-5800. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20514296> >.
- 125 IURLARO, M. et al. VE-cadherin expression and clustering maintain low levels of survivin in endothelial cells. *Am J Pathol*, v. 165, n. 1, p. 181-9, Jul 2004. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215174> >.
- 126 PEROUKIDES, S. et al. Survivin overexpression in HCC and liver cirrhosis differentially correlates with p-STAT3 and E-cadherin. *Histol Histopathol*, v. 25, n. 3, p. 299-307, 03 2010. ISSN 1699-5848. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20054802> >.
- 127 YANG, F. et al. Epithelial-mesenchymal transition of circulating tumor cells in prostate cancer is promoted by survivin. *J Int Med Res*, v. 48, n. 1, p.

- 300060519892395, Jan 2020. ISSN 1473-2300. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31948306> >.
- 128 QIAN, Z. R. et al. Tumor-specific downregulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas. *Mod Pathol*, v. 20, n. 12, p. 1269-77, Dec 2007. ISSN 0893-3952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17873891> >.
- 129 SANO, T. et al. Down-regulation of E-cadherin and catenins in human pituitary growth hormone-producing adenomas. *Front Horm Res*, v. 32, p. 127-32, 2004. ISSN 0301-3073. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15281343> >.
- 130 XU, B. et al. Downregulation of E-cadherin and its undercoat proteins in pituitary growth hormone cell adenomas with prominent fibrous bodies. *Endocr Pathol*, v. 13, n. 4, p. 341-51, 2002. ISSN 1046-3976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12665652> >.
- 131 DU, Z.; LOVLY, C. M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer*, v. 17, n. 1, p. 58, 02 2018. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29455648> >.
- 132 SANTINO, P. et al. Mechanisms of modulation of the Egr gene family in mammary epithelial cells of different species. *Gen Comp Endocrinol*, v. 247, p. 87-96, 06 2017. ISSN 1095-6840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28118985> >.
- 133 ANNUNZIATA, M. et al. Somatostatin and somatostatin analogues reduce PDGF-induced endometrial cell proliferation and motility. *Hum Reprod*, v. 27, n. 7, p. 2117-29, Jul 2012. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22588000> >.
- 134 DWORAKOWSKA, D. et al. Activation of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in pituitary adenomas and their effects on downstream effectors. *Endocr Relat Cancer*, v. 16, n. 4, p. 1329-38, Dec 2009. ISSN 1479-6821. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620247> >.
- 135 SUOJUN, Z. et al. Targeting Raf/MEK/ERK pathway in pituitary adenomas. *Eur J Cancer*, v. 48, n. 3, p. 389-95, Feb 2012. ISSN 1879-0852. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22119203> >.
- 136 WU, Z. R. et al. Inhibition of mTORC1 by lncRNA H19 via disrupting 4E-BP1/Raptor interaction in pituitary tumours. *Nat Commun*, v. 9, n. 1, p. 4624,

- 11 2018. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30397197> >.
- 137 JIA, W. et al. Expression of the mTOR pathway regulators in human pituitary adenomas indicates the clinical course. *Anticancer Res*, v. 33, n. 8, p. 3123-31, Aug 2013. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23898069> >.
- 138 EHRSTEDT, C. et al. Somatostatin receptor expression and mTOR pathway activation in glioneuronal tumours of childhood. *Seizure*, v. 76, p. 123-130, Jan 21 2020. ISSN 1532-2688. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32062323> >.
- 139 ARTEMENKO, M. et al. p70 S6 kinase as a therapeutic target in cancers: More than just an mTOR effector. *Cancer Lett*, v. 535, p. 215593, 06 01 2022. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35176419> >.
- 140 MIN, Z. et al. Associations of Genetic Polymorphisms of mTOR rs2295080 T/G and rs1883965 G/A with Susceptibility of Urinary System Cancers. *Dis Markers*, v. 2022, p. 1720851, 2022. ISSN 1875-8630. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35082928> >.
- 141 WILSON, T. G. et al. Prognostic significance of MTOR expression in HPV positive and negative head and neck cancers treated by chemoradiation. *Head Neck*, v. 42, n. 2, p. 153-162, 02 2020. ISSN 1097-0347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31657099> >.
- 142 DELLAL, F. D. et al. Serum survivin increases in prolactinoma. *J Clin Med Res*, v. 7, n. 4, p. 248-52, Apr 2015. ISSN 1918-3003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25699121> >.
- 143 KHAN, S. A. et al. Survivin expression and impact on head and neck cancer outcomes. *Oral Oncol*, v. 112, p. 105049, 01 2021. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33221541> >.
- 144 KRAFFT, U. et al. Validation of survivin and HMGA2 as biomarkers for cisplatin resistance in bladder cancer. *Urol Oncol*, v. 37, n. 11, p. 810.e7-810.e15, 11 2019. ISSN 1873-2496. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31053526> >.
- 145 RUTKOVSKY, A. C. et al. Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein as an oncogene in breast cancer. *BMC Cancer*, v. 19, n. 1, p. 491, May 23 2019. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31122207> >.

- 146 LEE, H. W. et al. Overexpression of phosphorylated 4E-binding protein 1 and its clinicopathological significances in gastric cancer. *Pathol Res Pract*, v. 211, n. 4, p. 298-302, Apr 2015. ISSN 1618-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25661069> >.
- 147 KONG, X. et al. Survivin overexpression is potentially associated with pituitary adenoma invasiveness. *Oncotarget*, v. 8, n. 62, p. 105637-105647, Dec 01 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29285279> >.
- 148 ZHENG, X. et al. Current biomarkers of invasive sporadic pituitary adenomas. *Ann Endocrinol (Paris)*, v. 77, n. 6, p. 658-667, Dec 2016. ISSN 2213-3941. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27659267> >.
- 149 WALIGÓRSKA-STACHURA, J. et al. Evaluation of survivin splice variants in pituitary tumors. *Pituitary*, v. 18, n. 3, p. 410-6, Jun 2015. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25107550> >.
- 150 MAVROMATI, M. et al. Classification of Patients With GH Disorders May Vary According to the IGF-I Assay. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 102, n. 8, p. 2844-2852, 08 2017. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28505364> >.
- 151 BATISTA, R. L. et al. Cabergoline in the Management of Residual Nonfunctioning Pituitary Adenoma: A Single-Center, Open-Label, 2-Year Randomized Clinical Trial. *Am J Clin Oncol*, v. 42, n. 2, p. 221-227, 02 2019. ISSN 1537-453X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30540568> >.
- 152 CASARINI, A. P. et al. Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. *Pituitary*, v. 12, n. 4, p. 297-303, 2009. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19330452> >.
- 153 GATTO, F. et al. Immunoreactivity score using an anti-sst2A receptor monoclonal antibody strongly predicts the biochemical response to adjuvant treatment with somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 98, n. 1, p. E66-71, Jan 2013. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23118420> >.
- 154 WALIGORSKA-STACHURA, J. et al. Decreased expression of survivin 2B in human pituitary adenomas. A preliminary study. *Folia Histochem Cytobiol*, v. 55, n. 1, p. 21-25, 2017. ISSN 1897-5631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28509313> >.

- 155 COLAO, A. et al. Interpreting biochemical control response rates with first-generation somatostatin analogues in acromegaly. *Pituitary*, v. 19, n. 3, p. 235-47, Jun 2016. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26519143> >.
- 156 KASUKI, L.; WILDEMBERG, L. E.; GADELHA, M. R. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Personalized medicine in the treatment of acromegaly. *Eur J Endocrinol*, v. 178, n. 3, p. R89-R100, Mar 2018. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29339530> >.
- 157 JOBST-SCHWAN, T. et al. Renal uptake of the antiapoptotic protein survivin is mediated by megalin at the apical membrane of the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, v. 305, n. 5, p. F734-44, Sep 01 2013. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23825075> >.
- 158 LECHLER, P. et al. The tumor gene survivin is highly expressed in adult renal tubular cells: implications for a pathophysiological role in the kidney. *Am J Pathol*, v. 171, n. 5, p. 1483-98, Nov 2007. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982126> >.
- 159 LECHLER, P et al. The oncofetal gene survivin promotes cell proliferation and survival in primary human osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int*, v. 89, n. 3, p. 211-20, Sep 2011. ISSN 1432-0827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674243> >.
- 160 VELCULESCU, V. E. et al. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet*, v. 23, n. 4, p. 387-8, Dec 1999. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10581018> >.
- 161 FORMOSA, R. et al. Expression and clinical significance of Wnt players and survivin in pituitary tumours. *Endocr Pathol*, v. 23, n. 2, p. 123-31, Jun 2012. ISSN 1559-0097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22327960> >.
- 162 JANKOWSKA, A. et al. Survivin products in pituitary tumors. *Neuro Endocrinol Lett*, v. 29, n. 6, p. 1033-7, Dec 2008. ISSN 0172-780X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19112393> >.
- 163 KRIEG, S. et al. Nuclear survivin is a prognosticator in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*, Apr 15 2022. ISSN 1432-1335. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35428913> >.

- 164 KOBAYASHI, Y. et al. Developmentally regulated expression of survivin in the human thymus. *Hum Immunol*, v. 63, n. 2, p. 101-7, Feb 2002. ISSN 0198-8859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821157> >.
- 165 XU, Y. et al. Genetic protein TmSm(T34A) enhances sensitivity of chemotherapy to breast cancer cell lines as a synergistic drug to doxorubicin. *Biomed Pharmacother*, v. 66, n. 5, p. 368-72, Jul 2012. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22560635> >.
- 166 ADAMSKA, A. et al. Molecular and cellular mechanisms of chemoresistance in pancreatic cancer. *Adv Biol Regul*, v. 68, p. 77-87, 05 2018. ISSN 2212-4934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29221990> >.
- 167 CAPALBO, G. et al. The role of survivin for radiation therapy. Prognostic and predictive factor and therapeutic target. *Strahlenther Onkol*, v. 183, n. 11, p. 593-9, Nov 2007. ISSN 0179-7158. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17960333> >.
- 168 KNAUER, S. K. et al. Functional characterization of novel mutations affecting survivin (BIRC5)-mediated therapy resistance in head and neck cancer patients. *Hum Mutat*, v. 34, n. 2, p. 395-404, Feb 2013. ISSN 1098-1004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23161837> >.
- 169 DENG, K. X. et al. [RNA interference silencing expression of survivin gene and reversing drug resistance of ovarian cancer cell line SKOV3/ADM]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, v. 40, n. 12, p. 836-9, Dec 2005. ISSN 0529-567X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16412331> >.
- 170 SHAW, R. J.; CANTLEY, L. C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*, v. 441, n. 7092, p. 424-30, May 25 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16724053> >.
- 171 LIANG, J.; SLINGERLAND, J. M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*, v. 2, n. 4, p. 339-45, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 1538-4101. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12851486> >.
- 172 ZHAO, P. et al. Regulation of survivin by PI3K/Akt/p70S6K1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 395, n. 2, p. 219-24, Apr 30 2010. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20361940> >.
- 173 FERNÁNDEZ, J. G. et al. Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced β -catenin/Tcf-Lef dependent

- transcription. *Mol Cancer*, v. 13, p. 209, Sep 09 2014. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25204429> >.
- 174 DENG, C. et al. The Establishment of Quantitatively Regulating Expression Cassette with sgRNA Targeting. *Front Cell Dev Biol*, v. 9, p. 797005, 2021. ISSN 2296-634X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35047507> >.
- 175 MICHAELIS, M. et al. Testing of the Survivin Suppressant YM155 in a Large Panel of Drug-Resistant Neuroblastoma Cell Lines. *Cancers (Basel)*, v. 12, n. 3, Mar 02 2020. ISSN 2072-6694. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32131402> >.
- 176 MONSALVES, E. et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway in the pathophysiology and treatment of pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer*, v. 21, n. 4, p. R331-44, Aug 2014. ISSN 1479-6821. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25052915> >.
- 177 CAKIR, M.; GROSSMAN, A. B. Targeting MAPK (Ras/ERK) and PI3K/Akt pathways in pituitary tumorigenesis. *Expert Opin Ther Targets*, v. 13, n. 9, p. 1121-34, Sep 2009. ISSN 1744-7631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19637976> >.
- 178 LIN, Y. et al. Frequent mutations and amplifications of the PIK3CA gene in pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*, v. 16, n. 1, p. 301-10, Mar 2009. ISSN 1351-0088. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852163> >.
- 179 FOTOUHI, O. et al. Proteomics Suggests a Role for APC-Survivin in Response to Somatostatin Analog Treatment of Neuroendocrine Tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 101, n. 10, p. 3616-3627, 10 2016. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27459532> >.
- 180 JALALI, S. et al. Role of mTOR Inhibitors in Growth Hormone-Producing Pituitary Adenomas Harboring Different FGFR4 Genotypes. *Endocrinology*, v. 157, n. 9, p. 3577-87, 09 2016. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27267848> >.
- 181 ZHANG, D. et al. Effect of Everolimus in Treatment of Aggressive Prolactin-Secreting Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 104, n. 6, p. 1929-1936, 06 01 2019. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30624667> >.
- 182 GORSHTEIN, A. et al. Mammalian target of rapamycin inhibitors rapamycin and RAD001 (everolimus) induce anti-proliferative effects in GH-secreting

- pituitary tumor cells in vitro. *Endocr Relat Cancer*, v. 16, n. 3, p. 1017-27, Sep 2009. ISSN 1479-6821. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19509067> >.
- 183 PIVONELLO, C. et al. Effect of combined treatment with a pan-PI3K inhibitor or an isoform-specific PI3K inhibitor and everolimus on cell proliferation in GH-secreting pituitary tumour in an experimental setting. *Endocrine*, v. 62, n. 3, p. 663-680, 12 2018. ISSN 1559-0100. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30066286> >.
- 184 PEVERELLI, E. et al. Dopamine and Somatostatin Analogues Resistance of Pituitary Tumors: Focus on Cytoskeleton Involvement. *Front Endocrinol (Lausanne)*, v. 6, p. 187, 2015. ISSN 1664-2392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26733942> >.
- 185 GADELHA, M. R. et al. Somatostatin receptor ligands in the treatment of acromegaly. *Pituitary*, v. 20, n. 1, p. 100-108, Feb 2017. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28176162> >.
- 186 PARAGLIOLA, R. M.; CORSELLO, S. M.; SALVATORI, R. Somatostatin receptor ligands in acromegaly: clinical response and factors predicting resistance. *Pituitary*, v. 20, n. 1, p. 109-115, Feb 2017. ISSN 1573-7403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27778296> >.
- 187 MARAZUELA, M. et al. Is receptor profiling useful for predicting pituitary therapy? *Eur J Endocrinol*, v. 179, n. 5, p. D15-D25, 10 12 2018. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30139823> >.
- 188 COLAO, A. et al. Predictors of tumor shrinkage after primary therapy with somatostatin analogs in acromegaly: a prospective study in 99 patients. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 6, p. 2112-8, Jun 2006. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16537687> >.
- 189 FOUIGNER, S. L. et al. The expression of E-cadherin in somatotroph pituitary adenomas is related to tumor size, invasiveness, and somatostatin analog response. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 95, n. 5, p. 2334-42, May 2010. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20335450> >.
- 190 KASE, S. et al. Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin Cancer Res*, v. 6, n. 12, p. 4789-96, Dec 2000. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11156236> >.

- 191 CHAUVET, N. et al. Combining Cadherin Expression with Molecular Markers Discriminates Invasiveness in Growth Hormone and Prolactin Pituitary Adenomas. *J Neuroendocrinol*, v. 28, n. 2, p. 12352, Feb 2016. ISSN 1365-2826. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26686489> >.
- 192 SAEGER, W. et al. Clinical Impact of the Current WHO Classification of Pituitary Adenomas. *Endocr Pathol*, v. 27, n. 2, p. 104-14, Jun 2016. ISSN 1559-0097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26860936> >.
- 193 GRIMM, F. et al. Ki-67 labeling index and expression of p53 are non-predictive for invasiveness and tumor size in functional and nonfunctional pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien)*, v. 161, n. 6, p. 1149-1156, 06 2019. ISSN 0942-0940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31037500> >.
- 194 BAHULEYAN, B. et al. To assess the ability of MRI to predict consistency of pituitary macroadenomas. *Br J Neurosurg*, v. 20, n. 5, p. 324-6, Oct 2006. ISSN 1360-046X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129884> >.
- 195 BONNEVILLE, F. et al. MRI T2 signal intensity and tumor response in patients with GH-secreting pituitary macroadenoma: PRIMARYS post-hoc analysis. *Eur J Endocrinol*, 12 2018. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30540560> >.
- 196 COOPMANS, E. C. et al. T2-signal intensity, SSTR expression, and somatostatin analogs efficacy predict response to pasireotide in acromegaly. *Eur J Endocrinol*, v. 182, n. 6, p. 595-605, Jun 2020. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32375119> >.
- 197 DURMAZ, E. S. et al. Added Value of Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Predicting Response to Somatostatin Analogs in Acromegaly Patients. *Turk Neurosurg*, v. 29, n. 6, p. 835-842, 2019. ISSN 1019-5149. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30900736> >.

APÊNDICE A – Procedimento de imuno-histoquímica

Para o procedimento imuno-histoquímico foi realizada a desparafinização dos cortes de 3 μ de espessura do material incluído em parafina, incubação com xilol a 60^o C por 20 minutos seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 20 minutos. Hidratação dos cortes em concentrações de etanol a 100% com 3 banhos de 30 segundos cada e etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos com posterior lavagem em água corrente e água destilada.

A recuperação antigênica ocorreu mediante incubação das lâminas em solução de tampão citrato pH 6.0 (PMB1-125) Spring Bioscience ou solução tampão Tris-EDTA pH 9.0 (PMB4-125) Spring Bioscience ou solução tampão EDTA 10mM Invitrogen pH 8.0, em panela a vapor (após a fervura da água da panela com a cuba de solução de recuperação) foi colocado o suporte de lâminas por 35 minutos. Deixou-se esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente.

Posterior lavagens em água corrente e água destilada. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada. Nova lavagem em água corrente e água destilada. Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos. Bloqueio de proteínas com Cas Block™ (Invitrogen by Life Technologies) cat. n^o 00-8120 por 10 minutos a 37^o C.

Escorrer e incubar com o Ac primário. Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (SIGMA, E.U.A.) a 1,0% e azida sódica NaN₃ (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 min. a 37^o C e, em seguida, 18 horas (overnight) a 4^o C. Lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada. Incubação com o bloqueador pós-primário (Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Ltd), Ref. RE7 159, por 30 minutos a 37^o C. Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada. Incubação com NovoLink (Polimer) Leica Biosystems, Newcastle Ltd), Ref. RE7 161, por 30 minutos a 37^o C. Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.

Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, E.U.A.) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (Labsynth) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37 °C. Lavagens em água corrente e água destilada. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavagens em

água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada.

Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol (3 trocas de 1 minuto cada) e montagem em meio permanente (Entellan, Merck, cod. 1.07961.0100) com lamínula.

Os controles utilizados na reação imuno-histoquímica compreendem: um controle positivo sabidamente positivo para o anticorpo em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imuno-histoquímicos.

APÊNDICE B - Escolha e validação do anticorpo anti-survivina

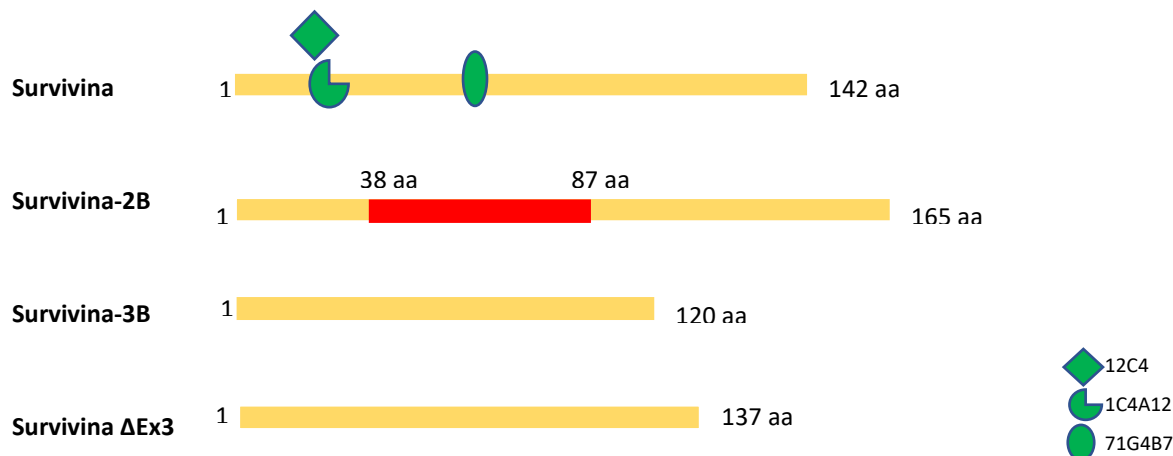
O anticorpo escolhido para a survivina (ID AB1502081, clone1C4A12) reconhece um epítipo na região N-terminal desta proteína. A Tabela 1 abaixo apresenta uma comparação dos anticorpos anti-survivina utilizados neste e em outros seis estudos. Entre os anticorpos descritos, somente três possuem epítipos conhecidos (12C4, 1C4A12 e 71G4B7). Os demais representam anticorpos policlonais ou estão protegidos por patentes.

Tabela 1 - Comparação entre sete anticorpos anti-survivina utilizados em diferentes estudos

Antibody anti survivin ID/clone	Hallmark	Mono/Poli	Epitope	Reference
AB 2063948 (71G4B7)	Cell Signaling	rabbit mAb	residues surrounding cysteine 60	Németh <i>et al.</i> , 2018
AB 1524459 (EP2880Y)	Abcam	rabbit mAb	Does not reveal epitope due to patent	Waligorska-Stachura J <i>et al.</i> , 2017
AB 350607	Novus Biological	Polyclonal	not applicable	De Maria S <i>et al.</i> , 2009
AB 1502081 (1C4A12)	Zymed	mouse mAb	N-terminal region	Stefano <i>et al.</i> , 2010
AB 2243439 (12C4)	Dako	mouse mAb	N-terminal region	Stefano <i>et al.</i> , 2010; Adamkov M <i>et al.</i> , 2010; Adamkov <i>et al.</i> , 2009
AB 59697	Neomarkers	Polyclonal	not applicable	Stefano <i>et al.</i> , 2010
AB 628302	Santa Cruz	mouse mAb	Does not reveal epitope due to patent	Stefano <i>et al.</i> , 2010

A Figura 1 apresenta uma representação gráfica das quatro principais isoformas da survivina e as posições dos três epítipos reconhecidos pelos anticorpos, dois deles localizados na região N-terminal (12C4 e 1C4A12) e um próximo ao resíduo de cisteína 60 (71G4B7). Como pode ser observado, essas regiões são comuns a todas essas isoformas, permitindo seu reconhecimento pelos anticorpos citados, incluindo o utilizado no presente estudo.

Figura 1 - As quatro principais isoformas da survivina e localização dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos 12C4, 1C4A12 e 71G4B7

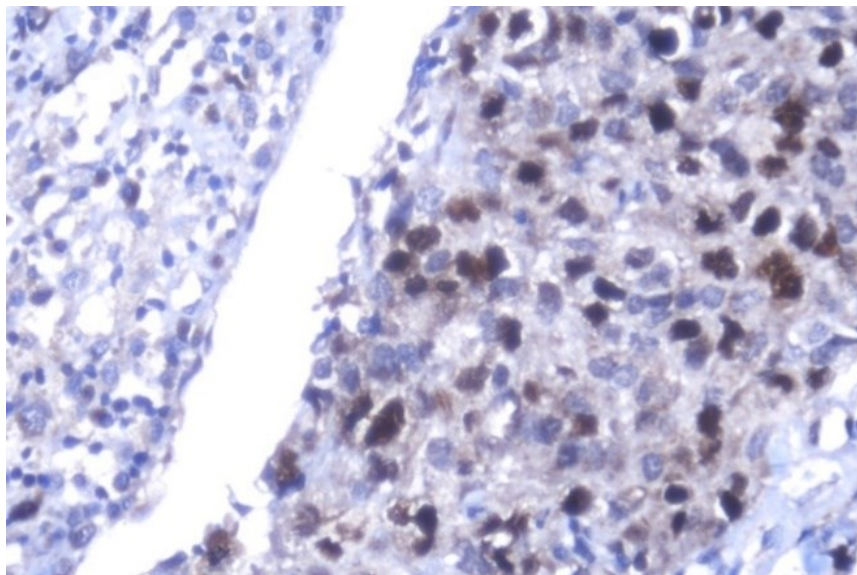


Fonte: próprio autor.

Em relato prévio, Németh e colaboradores (2018) utilizaram o anticorpo AB_2063948 (71G4B7) e descreveram marcação nuclear da survivina em somatotrofinomas. Em nosso estudo, observamos apenas marcação citoplasmática utilizando o AB_1502081(clone1C4A12) nesse tipo de tumor. Para afastar a possibilidade de que esses resultados conflitantes fossem devido à problemas técnicos, testamos o clone1C4A12 também em câncer de mama invasivo e conseguimos demonstrar seu potencial de reconhecimento de expressão nuclear da survivina (Figura 2).

Além disso, o anticorpo AB_1502081(clone1C4A12) foi validado em um estudo prévio de nosso grupo (Stefano *et al*, 2010) em que a comparação com três outros anticorpos [AB_2243439 (clone12C4), AB_59697 (Ab-6) e AB_628302 (D-8)], demonstrou que este anticorpo obteve desempenho similar, reconhecendo tanto a localização nuclear quanto a citoplasmática.

Figura 2 - Marcação nuclear da survivina obtida com o anticorpo AB1502081(clone1C4A12) em câncer de mama invasivo.



Fonte: próprio autor.

APÊNDICE C –Características clínicas, laboratoriais e tumorais no tempo basal e pós-operatório de cada paciente

ID	Sexo	Idade	Basal					Pós cirurgia			Pós uso LRS			Marcadores tumorais						
			GH µg/L	IGF1 µg/L	MD mm	T2W	Kno sp	GH µg/L	IGF1 µg/L	MD mm	Resistê ncia	GH µg/L	IGF1 µg/L	Sur vivi na	4EB P1	SSTR 2/5	E- cader ina	Fila min a	CK18	Ki67
1	F	50	580	809	45	hipo	3B*	25	565	32	parcial	1,4	280	4	0	8/0	0	0	DGA	<1%
2	M	53	19	905	19	hipo	2	1,3	333	6	não	0,6	180	6	8	4/0	0	0	DGA	<1%
3	M	63	182	1320	26	iso	3A*	6,5	989	15	não	0,1	54	9	3	12/0	0	0	DGA	<1%
4	F	26	2	344	23	hipo	4	1,4	606	23	não	0,9	177	4	2	12/0	0	3	DGA	<1%
5	F	48	35	957	16	hipo	3A*	ND	ND	9	NA	NA	NA	4	2	8/2	2	0	SGA	<1%
6	M	26	10	1584	14	hiper	1*	ND	ND	8	RC	NA	NA	4	2	12/2	2	0	DGA	<1%
7	M	42	15	1057	10	hipo	3B*	2,2	978	7	parcial	0,4	220	4	2	3/0	0	0	neg	ND
8	F	43	22	814	12	hipo	3A	23	1204	5	não	1,1	140	9	3	8/0	0	0	DGA	<1%
9	F	33	48	1141	29	hiper	4	3,1	892	17	total	3,1	606	4	6	8/2	0	2	SGA	<1%
10	F	51	1261	1074	48	hiper	3A*	11,7	1137	40	parcial	1	450	2	8	4/0	0	0	DGA	3-5%
11	M	38	91	1528	18	hipo	3B	0,3	563	11	não	0,2	260	3	2	4/0	0	0	DGA	<1%
12	M	40	130	1060	37	iso	3A	3,7	784	2	não	0,6	149	4	0	12/2	0	0	DGA	<1%
13	F	42	99	1136	40	iso	4	12	464	21	não	1	226	4	4	1/0	0	3	DGA	3-5%
14	M	32	122	1245	23	iso	1**	68	1437	22	parcial	8,9	750	6	4	12/0	0	4	DGA	<1%
15	F	32	8	1084	33	hipo	4	4	807	11	parcial	0,8	200	8	0	4/0	0	4	neg	1%
16	F	41	7	501	35	hiper	2*	ND	ND	NA	RC	NA	NA	6	3	8/6	2	0	DGA	<1%
17	M	40	10	1367	20	hipo	4	3	678	13	não	9	187	6	8	8/0	2	0	DGA	<1%
18	M	16	17	954	17	hipo	1	ND	ND	17	RC	NA	NA	2	8	3/0	0	0	DGA	<1%
19	F	28	4	1172	28	hiper	2	3,7	852	14	total	4,2	687	2	12	2/2	0	0	SGA	3-5%
20	M	37	28	2450	10	hiper	4*	2,1	683	4	parcial	0,1	365	4	3	8/0	0	0	DGA	ND
21	M	33	46	1305	23	iso	3A	8,3	1143	15	parcial	5,8	664	2	8	2/0	0	0	SGA	<1%
22	M	50	6	970	11	hipo	0	ND	ND	6	RC	NA	NA	3	4	12/2	3	0	DGA	<1%
23	M	65	11	532	14	hipo	0**	ND	ND	0	RC	NA	NA	4	2	8/0	2	3	neg	<1%
24	M	45	85	1600	64	hiper	4*	10	1577	24	parcial	2,7	956	6	3	12/6	2	0	DGA	1-3%
25	F	31	16	1101	23	hiper	3A	4,2	871	12	parcial	1,5	482	2	12	1/0	0	0	SGA	<1%
26	M	24	15	1078	15	hipo	2*	ND	ND	4	RC	NA	NA	3	6	6/0	0	0	SGA	3-5%
27	F	38	71	1254	22	hiper	3A	3,5	654	4	total	2,5	804	4	12	6/3	0	2	SGA	1-3%

APÊNDICE C - Características clínicas, laboratoriais e tumorais no tempo basal e pós-operatório de cada paciente (conclusão)

ID	Sexo	Idade	Basal					Pós cirurgia			Pós uso LRS			Marcadores tumorais						
			GH µg/L	IGF1 µg/L	MD mm	RM T2W	Kno sp	GH µg/L	IGF1 µg/L	MD mm	Resistê ncia	GH µg/L	IGF1 µg/L	Sur vivi na	4EB P1	SSTR 2/5	E- cader ina	Fila min a	CK18	Ki67
28	M	36	14	1404	18	iso	3A*	2,5	557	8	não	1,9	345	6	2	12/2	2	0	DGA	<1%
29	F	39	98	936	21	iso	3A*	7,8	678	19	NA	NA	NA	6	8	12/2	2	4	DGA	1-3%
30	M	39	3	1001	8	hipo	3B*	ND	ND	ND	RC	NA	NA	6	2	1/0	0	0	DGA	<1%
31	F	47	7	940	11	hipo	3B	2,6	736	ND	parcial	1	198	4	4	4/0	0	0	DGA	1-3%
32	F	61	3	724	10	hipo	1	ND	ND	6	RC	NA	NA	4	8	8/0	0	0	DGA	1-3%
33	F	33	50	1020	15	hiper	3B*	7,2	588	5	não	1,4	177	6	3	3/0	0	0	SGA	<1%
34	F	58	593	1753	23	hipo	2*	1,9	434	7	não	0,5	151	6	2	PR	2	PF	DGA	ND
35	F	45	64	1067	13	hipo	3A	5,1	336	ND	não	0,3	169	2	3	6/2	3	0	DGA	3-5%
36	F	48	24	1006	11	hipo	2	ND	ND	ND	RC	NA	NA	4	8	8/0	6	0	DGA	3-5%
37	F	21	75	1481	34	hiper	3B	94,9	1400	25	parcial	19,6	1251	2	2	3/2	3	1	DGA	<1%
38	F	28	9	1159	11	hipo	3B*	3,4	710	ND	parcial	1,2	419	2	2	6/2	0	0	DGA	<1%
39	F	37	256	1312	28	iso	3B**	196	1100	20	total	209	1098	6	4	6/0	2	0	DGA	1-3%
40	F	23	128	1278	25	hiper	3B	33	1443	18	total	35	1536	6	12	3/2	0	0	SGA	1-3%
41	M	48	8	1012	9	hipo	1	ND	ND	ND	RC	NA	NA	6	3	8/6	2	4	DGA	<1%
42	M	54	40	1153	22	iso	2	ND	ND	14	RC	NA	NA	3	2	12/2	0	4	DGA	<1%
43	F	38	14	1156	16	hipo	3B	6,9	768	9	parcial	2,3	466	1	8	3/0	0	0	SGA	1-3%
44	F	40	16	1114	22	iso	0	ND	ND	15	RC	NA	NA	6	4	12/2	2	0	DGA	1-3%
45	F	54	4	815	12	hipo	0	ND	ND	6	RC	NA	NA	6	0	6/0	0	2	DGA	<1%
46	F	59	6	965	11	hiper	0	ND	ND	4	RC	NA	NA	8	4	8/0	2	0	DGA	<1%
47	F	19	198	1941	43	hiper	4	65	1112	ND	total	48	917	12	0	4/0	0	0	DGA	ND
48	F	30	65	1104	45	hiper	4*	6,7	967	ND	total	4,5	685	4	8	6/2	0	3	SGA	1-3%
49	F	53	23	729	22	hiper	2	ND	ND	8	RC	NA	NA	4	8	8/2	2	0	DGA	<1%
50	F	57	6	842	17	hipo	1	ND	ND	4	RC	NA	NA	4	8	6/2	0	6	DGA	<1%
51	F	44	149	1087	20	iso	1	9,4	630	3	não	0,8	174	8	4	12/0	2	0	DGA	3-5%
52	M	32	147	1485	27	hiper	4	7,5	603	31	total	7,7	749	1	1	1/1	0	0	neg	ND

M: masculino; F: feminino; ND: não disponível; MD: maior diâmetro tumoral; RC: remissão cirúrgica; NA: não se aplica; * GH+PRL; ** GH+FSH (demais casos foram positivos apenas para GH na IHQ hormonal); PF: perda de representatividade; SGA: esparsamente granuloso; DGA: densamente granuloso; T2W: sinal de ressonância magnética ponderada em T2.

ANEXO A – Aprovação junto a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos marcadores de apoptose e vias de proliferação celular em somatotrofinomas invasivos e/ou resistentes ao tratamento medicamentoso da acromegalia

Pesquisador: Raquel Soares Jallad

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13392918.1.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.339.439

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo Transversal para avaliar a presença e o comportamento da expressão dos marcadores de apoptose celular Bcl-2, Bax, caspases 3 e survivina, e marcador de via de sinalização mTOR nos somatotrofinomas localmente invasivos e/ou resistentes ao tratamento com ligantes dos receptores de somatostatina (LRS). Será realizada a avaliação clínica, laboratorial e de imagem de pacientes portadores de acromegalia acompanhados no ambulatório de Neuroendocrinologia da unidade de Endocrinologia do Hospital das Clínicas de São Paulo, divididos dois grupos: 1-pacientes com resistência parcial ou total ao tratamento medicamentoso (n=20); e 2-pacientes com resposta satisfatória ao tratamento (n=20).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: Avaliar a presença dos marcadores de apoptose e via de proliferação celular em somatotrofinomas, correlacionando com seu comportamento clínico-biológico e com o tratamento medicamentoso com análogos da somatostatina e/ou cabergolina. **Objetivo Secundário:** - avaliar a expressão gênica e proteica dos marcadores de apoptose Bcl2, BAX, caspase 3 e survivina nos somatotrofinomas invasivos e/ou resistentes ao tratamento medicamentoso. - avaliar a expressão gênica e proteica do marcador da via m-TOR P70-S6K nos somatotrofinomas invasivos e/ou resistentes ao tratamento medicamentoso. - correlacionar a expressão desses marcadores com o comportamento clínico e biológico dos somatotrofinomas e com sua resposta



Continuação do Parecer: 3.339.439

ao tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos estão relacionados com a coleta de sangue. Não há benefício direto para o participante, porém a análise dos dados poderá permitir uma melhor indicação do tipo de tratamento para o adenoma hipofisário em acromegálicos, bem como um potencial auxílio no desenvolvimento de novas opções de tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE está escrito em linguagem clara e compreensível.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_951935.pdf	09/05/2019 10:07:43		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto042019.pdf	18/04/2019 10:08:11	Raquel Soares Jallad	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termocla.pdf	01/11/2018 12:08:52	Raquel Soares Jallad	Aceito
Orçamento	orcamentofapesprojetoCla2.pdf	01/11/2018 11:57:02	Raquel Soares Jallad	Aceito
Projeto Detalhado	ProjetodePesquisaClarissaCla.pdf	17/09/2018	Raquel Soares	Aceito

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa: Avaliação dos marcadores de apoptose e das vias proliferação celular em somatotrofinomas invasivos e/ou somatotrofinomas resistentes ao tratamento medicamentoso da acromegalia

Patrocinador do estudo: Disciplina de Endocrinologia e Metabologia HCFMUSP

Pesquisador responsável: Dra. Raquel Soares Jallad

Instituição: Serviço de Clínica Geral da Divisão de Clínica Médica I do Instituto Central – ICHC

Convidamos o (a) Sr(a) para participar da pesquisa: “Avaliação dos marcadores de apoptose e das vias proliferação celular em somatotrofinomas invasivos e/ou somatotrofinomas resistentes ao tratamento medicamentoso da acromegalia.” **Você é livre para decidir se quer participar ou não do estudo.**

Acromegalia é uma doença causada por um tumor de hipófise benigno que produz o hormônio do crescimento (GH) e, conseqüentemente IGF-1. O excesso de GH/IGF-1 no nosso organismo favorece o aparecimento de doenças como hipertensão arterial (pressão alta), cardiopatias (doenças do coração), doenças das articulações, diabetes mellitus, entre outras. A presença destas doenças pode aumentar o risco de morte. O principal tratamento da acromegalia é a cirurgia, porém, em alguns casos podemos inicialmente indicar tratamento medicamentoso com análogos de somatostatina e/ou cabergolina. Estes dois tipos de tratamento (cirurgia e medicamento) determinam controle da doença em torno de 30 a 40% dos casos, ficando uma grande quantidade de pacientes sem controle da doença e expostos ao risco de desenvolvimento de complicações. Assim necessitamos de novos estudos para melhor entendimento dos mecanismos que causam a não resposta aos tratamentos existentes, para posterior desenvolvimento de novas opções de tratamento que controlem a acromegalia. Para tanto, decidimos fazer este estudo clínico-laboratorial, onde iremos avaliar os dados dos pacientes que responderam ao tratamento, comparando com os que não responderam, a fim de identificar possíveis causas que levam a esta diferença de resposta.

Sua participação consiste em realizar a coleta de sangue nos períodos definidos em consulta médica, no laboratório da instituição, através de punção simples (com agulha) de uma veia de seu antebraço. Durante a coleta de sangue, você poderá sentir um pequeno desconforto (como uma picada). Após a coleta, poderá aparecer no local da picada uma mancha roxa, inchaço ou, em casos raros, infecção. Estas alterações devem desaparecer em um dia. Os resultados da análise do seu material estarão disponíveis para você a qualquer momento. Para este estudo, além dos exames de sangue, será coletado amostra do seu tumor durante o ato cirúrgico, indicado para o tratamento da doença. O sangue e a amostra de tumor coletados serão armazenados em um biorrepositório ao longo da execução do projeto de pesquisa, sem fins comerciais.

Não haverá desconfortos da pesquisa, pois os dados serão coletados em consultas de rotina e obtidos dos registros de prontuários.

Durante a realização da pesquisa, não haverá nenhum benefício direto para o participante, pois se trata de estudo que avalia características laboratoriais decorrentes do tratamento proposto (cirurgia e /ou medicamento) e das características anatomopatológicas do adenoma hipofisário em acromegálicos. No entanto, a análise destes dados poderá permitir no futuro uma melhor indicação do tipo de tratamento, bem como um potencial auxílio no desenvolvimento de novas opções de tratamento.

Os participantes da pesquisa serão acompanhados clinicamente no ambulatório de referência em acromegalia do ICHC a cada 3 a 4 meses, ou a critério da pesquisadora responsável Dra Raquel Jallad. Após término da pesquisa os mesmos continuarão seguindo no referido serviço.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. É compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. No futuro, caso surjam novas pesquisas, o material colhido somente será analisado após o seu consentimento e a assinatura de um novo consentimento. Toda nova pesquisa só será realizada com aprovação do sistema CEP – CONEP, que são os órgãos que fiscalizam a ética em pesquisa

Em qualquer momento você poderá ser atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Você não terá despesas pessoais para participar do estudo incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é

Dra Raquel Soares Jallad, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155 - Cerqueira César, São Paulo, 8 andar, bloco 4 e/ou pelo Telefone(s) (11) 2661-7845 (horário comercial) .

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Avaliação dos marcadores de apoptose e das vias proliferação celular em somatotrofinomas invasivos e/ou somatotrofinomas resistentes ao tratamento medicamentoso da acromegalia.”. Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Dra Raquel Soares Jallad ou pessoa (s) por ele delegada (s) Dra Clarissa Grobério Borba Herkenhoff sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante /representante legal

Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /