



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DO
ADULTO E DA CRIANÇA
MESTRADO ACADÊMICO



**RELEVÂNCIA PROGNÓSTICA DA EXPRESSÃO IMUNO-
HISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES KI-67 EM ADENOMAS
HIPOFISÁRIOS**

ANA GISÉLIA PORTELA DE ARAÚJO CORTÊS NASCIMENTO

São Luís
2016

ANA GISÉLIA PORTELA DE ARAÚJO CORTÊS NASCIMENTO

**RELEVÂNCIA PROGNÓSTICA DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS
RECEPTORES KI-67 EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Saúde do Adulto e da Criança da Universidade Federal do Maranhão para a obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

Área de Concentração: Medicina II

Orientador: Prof. Dr. Manuel dos Santos Faria.

Coordenadora do Programa: Prof^a. Dr. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

São Luís
2016

NASCIMENTO, Ana Gisélia Portela de A. Cortês.

Relevância Prognóstica da Expressão dos Receptores Ki-67 em Adenomas Hipofisários / Ana Gisélia Portela de A. Cortês NASCIMENTO. - 2016.

65 p.

Orientador(a): Manuel dos Santos FARIA.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto e da Criança/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

1. Adenomas Hipofisários. 2. Antígeno Ki-67. 3. Proliferação Celular. I. FARIA, Manuel dos Santos. II. Título.

ANA GISÉLIA PORTELA DE ARAÚJO CORTÊS NASCIMENTO

**RELEVÂNCIA PROGNÓSTICA DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS
RECEPTORES KI-67 EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

A Banca Examinadora da Dissertação de mestrado apresentada em sessão pública considerou a candidata aprovada em: ____/____/____.

Prof. Dr. Manuel dos Santos Faria (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros da Silva (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Marcelo Silva Magalhães. (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. João Francisco Ribeiro Furtado Neto (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

Aos meus pais, irmãs e irmãos.

A Gilvan e Ana Elísia, razão de tudo, amores
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por me ensinarem o valor e a importância do estudo e da instrução para a minha vida. À minha mãe pelo símbolo deixado de amor, solidariedade e humildade. Ao meu pai pela sabedoria nata e valores que me norteiam.

Ao meu esposo Gilvan, “*co-orientador oficioso*”, pela dedicação, amor e incentivos diários e inestimável auxílio durante toda a realização dessa dissertação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manuel dos Santos Faria, pela oportunidade de realizar este trabalho e aprendizado, nova experiência que dará mais qualidade aos nossos laudos.

Agradeço à minha enorme família que sempre unida me apoiou incondicionalmente para finalizar essa etapa, em especial às cinco maravilhosas irmãs que tenho a sorte de ter convívio constante e aos meus três amados irmãos.

Agradeço aos Neurocirurgiões, Dr. Emílio Carneiro e Dr. Gelson Soeira, pela indispensável coleta das amostras deste estudo e a toda equipe do serviço de Endocrinologia/Neuroendocrinologia.

Ao Serviço de Patologia, em especial a Ana Cléa Pestana, pela ajuda técnica prestativa durante a realização.

À Professora Dra. Christina MaedaTakiya, pelo apoio no embasamento teórico-prático da execução da técnica de imuno-histoquímica.

Agradeço às amigas de mestrado Sabrina e Nadja. Em especial a Nadja pela dedicação incansável no desenvolvimento e implementação da técnica de imuno-histoquímica, pelo companheirismo, amizade e colaboração indispensáveis.

Ao Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica, que nos acolheu para realização da técnica, em especial ao Dr. Gyl Eanes e ao Victor Maulen, pela orientação e apoio.

Ao Radiologista Alysson Milhomen Rocha e ao meu sobrinho Eduardo Medeiros (residente da Radiologia), pela avaliação das imagens radiológicas.

À minha amiga, Mônica Gama, pelas orientações práticas e pertinentes que deram qualidade a esta escrita.

Agradeço a esta Universidade e ao Programa de Pós-graduação, por me oportunizar essa experiência. E, finalmente, agradeço a Deus, força superior que me fez superar obstáculos e todas as dificuldades.

RESUMO

Adenomas hipofisários representam de 10-15% de todas as neoplasias intracranianas com prevalência de um caso para 1000 habitantes. Apresentam grande variação de comportamento clínico, sendo a maioria de crescimento indolente, enquanto cerca de 35% podem ser invasivos e um pequeno grupo francamente agressivo. Até o presente momento, não há um biomarcador que possa prever seu comportamento de forma confiável, o que possibilitaria uma terapia adjuvante mais agressiva ou um seguimento clínico mais rigoroso. O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão e o índice do marcador imuno-histoquímico de proliferação celular, antígeno Ki-67 em adenomas hipofisários e correlacioná-lo a parâmetros demográficos e clínico-patológicos, visando definir sua relevância prognóstica. Trata-se de um estudo transversal realizado no período de novembro de 2015 a agosto de 2016. Foram utilizados tecidos de adenomas hipofisários de 62 pacientes oriundos do Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão. Para avaliação dos adenomas foram analisados dados dos prontuários, a saber: avaliação clínica e dosagens séricas de hormônios relacionados, assim como ressonância nuclear magnética de hipófise. Para analisar a expressão do Ki-67, foi realizada a técnica de imuno-histoquímica utilizando-se o anticorpo primário monoclonal anti-humano expressado pela percentagem de núcleos imunopositivos sob forma de índice de marcação de Ki-67. Na amostra de 62 pacientes, 31 pacientes foram do sexo feminino (50%) com a média de idade à época da cirurgia de 46,2 ($\pm 13,3$) anos, variando de 16 a 73 anos. O antígeno Ki-67 apresentou expressão em 37 (59,7%) pacientes, variando o seu índice de 0,1% a 2,4%. O índice Ki-67, assim como a sua mediana apresentaram-se mais elevados no sexo feminino com $p=0,04$ e $p=0,02$, respectivamente. Não houve predominância da expressão e do índice de Ki-67 com relação a idade e diagnóstico. Adenomas gigantes apresentaram mediana de Ki-67 mais elevada com relação aos não gigantes com valor de $p=0,04$, mas não houve qualquer correlação de Ki-67 com a invasão tumoral. Os adenomas hipofisários previamente submetidos à farmacoterapia específica apresentaram expressão de Ki-67 mais baixos, no entanto, somente quando os somatotropinomas foram analisados de forma isolada, houve significância estatística com $p=0,03$. O antígeno Ki-67, marcador de atividade proliferativa tumoral, tem papel relevante em adenomas hipofisários. Em conjunto com outros biomarcadores, como invasão tumoral, grande volume do adenoma à apresentação inicial dos pacientes e/ou documentação de rápida velocidade de crescimento do tumor, pode levar a identificação de pacientes que demonstrem um comportamento clínico agressivo, de forma a conduzir a uma abordagem terapêutica multimodal mais efetiva ou a um seguimento pós-operatório mais estrito.

Palavras-Chave: Adenomas hipofisários. Antígeno Ki-67. Proliferação celular.

ABSTRACT

Pituitary adenomas represent 10-15% of all intracranial tumors with an incidence of 1/1000 of the population. They are considered benign and mostly slow growth. Despite this, about 35% may present with invasion of parasellar compartments and a significant number have a clinically aggressive behavior with early recurrence during follow-up, despite surgery and other therapeutic approaches. Such aggressive tumors should be identified early in order to provide a more incisive treatment and / or a strict clinical and radiological follow-up, with prompt adjunctive therapy institution in persistence or recurrence of these tumors. Despite these considerations, to date, no clinical, radiological and histological marker predicting such behavior has been established. This study aims to reassess the role of Ki-67 through an improved immunohistochemical technique for the expression of these antigens and correlate it to demographic and clinicopathological parameters of pituitary adenomas. This is a cross-sectional study conducted from November 2015 to August 2016 were used pituitary adenoma tissue from 62 patients from the Endocrinology Service of the University of the Federal University of Maranhão Hospital. For evaluation of adenomas of medical records data were analyzed, namely: clinical and serum levels of related hormones as well as magnetic resonance imaging of the pituitary gland. To analyze the expression of Ki-67 was performed immunohistochemical technique using the anti-human monoclonal primary antibody, expressed by the percentage of labeled nuclei in the form of labeling index Ki-67. In our sample of 62 patients, 31 patients were female (50%) with a mean age at surgery of 46.2 (\pm 13.3) years, ranging from 16 to 73 years. Ki-67 index, as well as their median had to be higher in females, with $p = 0.04$ and $p = 0.02$, respectively. There was no predominance of expression and Ki-67 index with respect to age and diagnosis. Adenomas giant had higher median Ki-67 with respect to non giants with $p = 0.04$, but there was no correlation of Ki-67 with tumor invasion. The pituitary adenomas previously submitted to specific pharmacotherapy showed expression of Ki-67 lower, however, only when the somatotropinomas were analyzed separately, there was statistically significant with $p = .0,03$. The Ki-67 antigen, a marker of tumor proliferative activity, play an important role in pituitary adenomas. In conjunction with other biomarkers such as tumor invasion, large volume adenoma the initial presentation of patients and / or rapid tumor growth rate documentation can lead to identification of patients which show an aggressive clinical behavior, in order to conduct a multimodal therapeutic approach more effective or more strict postoperative follow-up.

Key-Words: Pituitary adenomas. Ki-67. Cell proliferation.

LISTA DE SIGLAS

ACI	Artéria Carótida Interna
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ACNF	Adenoma Clinicamente Não Funcionante
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GH	Hormônio do Crescimento
G0	Gap 0
G1	Gap 1
G2	Gap 2
HE	Hematoxilina e Eosina
HU	Hospital Universitário
IHQ	Imuno-histoquímica
KI-67	Antígeno Ki-67
LH	Hormônio Luteinizante
LIME	Laboratório de Imunoflorescência e Microscopia Eletrônica
ME	Microscopia Eletrônica
MIB-1	Molecular Immunology Borstel
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PRL	Prolactina
TSH	Hormônio Tireoestimulante

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fotomicrografia da glândula hipófise normal (acervo pessoal).....	16
Figura 2	Classificação de Knosp.....	19
Figura 3	O ciclo celular.....	23
Figura 4	Fluxograma de exclusões.....	30
Figura 5	Feminino, 42 anos com Adenoma Gigante clinicamente não funcionante.....	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação dos tumores hipofisários pela OMS, 2004.....	21
Quadro 2	Vantagens e desvantagens do antígeno Ki-67.....	27
Quadro 3	Descrição da série de 38 pacientes com adenomas hipofisários com positividade para proteína Ki-67.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas e clínicas de pacientes com adenomas hipofisários, São Luís, Maranhão, 2016.....	36
Tabela 2	Relação entre o Índice Ki-67 e as características demográficas de pacientes com adenoma hipofisário. São Luís, Maranhão, 2016.....	38
Tabela 3	Relação do Índice Ki-67 e sua mediana com características demográficas de pacientes com adenoma hipofisário. São Luís, Maranhão, 2016.....	39
Tabela 4	Relação entre o Índice Ki-67 e as características clínicas de pacientes com adenoma hipofisário. São Luís, Maranhão, 2016.....	41
Tabela 5	Relação do Índice Ki-67 e sua mediana com características clínicas de pacientes com adenoma hipofisário. São Luís, Maranhão, 2016....	42
Tabela 6	Caracterização demográfica e do tumor de pacientes com adenoma hipofisário tipo somatotropinoma. São Luís, Maranhão, 2016.....	43
Tabela 7	Relação entre o Índice Ki-67 e características demográficas de pacientes com adenoma hipofisário tipo somatotropinoma. São Luís, Maranhão, 2016.....	44
Tabela 8	Relação entre o Índice Ki-67 e características demográficas e clínicas de pacientes com adenoma hipofisário tipo somatotropinoma SãoLuís, Maranhão, 2016.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Hipófise	16
2.2 Adenomas Hipofisários	17
2.3 Ciclo celular e marcador de proliferação celular: proteína Ki-67	21
2.4 Proteína Ki-67 e Adenomas Hipofisários	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 Geral	28
3.2 Específicos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Tipo de Estudo	29
4.2 Período e Local de Estudo	29
4.3 População e amostra: critérios de inclusão e exclusão	29
4.4 Coleta das Amostras Biológicas / Amostragem	30
4.5 Perfil Bioquímico	31
4.6 Técnica de Imuno-histoquímica (IHQ)	32
4.6.1 Análise da Imuno-histoquímica	33
4.7 Análise estatística	34
4.8 Aspectos Éticos	34
5 RESULTADOS	35
5.1 População de pacientes portadores de adenomas hipofisários	35
5.2 Índice Ki-67 e Características Demográficas	38
5.3 Índice Ki-67 e Características Clínicas dos Adenomas Hipofisários	39
5.4 População de Pacientes Portadores de Adenomas Hipofisários Somatotróficos	42
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	57
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	61

1 INTRODUÇÃO

A glândula hipófise, também chamada pituitária, situa-se na base do cérebro, no interior de uma estrutura óssea chamada sela túrcica, depressão localizada na face superior do osso esfenoíde. É composta por duas partes anatômicas e funcionalmente distintas, a adenohipófise e a neurohipófise (ASA, 2011). Exerce uma ação essencialmente endócrina e, a partir da secreção de seus hormônios, regula funções nobres como a termogênese, o desenvolvimento e crescimento, a reprodução humana, entre outras (FINK et al., 2012).

Vários distúrbios podem acometer a hipófise, dentre os quais, processos inflamatórios, infecciosos e neoplásicos. Esses últimos, muito raramente, podem ser malignos e primários da glândula, que esporadicamente pode ser alvo de implantes secundários (HE et al., 2015). Mais comumente se assestam na hipófise os adenomas, tumores monoclonais originados de células da adenohipófise, que estão entre os mais frequentes tumores intracranianos, representando 10-15% desses e ocorrendo em quase 20% da população em geral (ALEXANDER et al., 1990; HERMAN et al., 2000; SCHEITHAUER et al., 2006; AFLOREI, KORBONITS, 2014).

Adicionalmente, os adenomas hipofisários podem ser classificados, a partir da sua atividade hormonal *in vivo*, como clinicamente funcionantes - que, por definição, secretam quantidades hormonais suficientes para promover síndromes clínicas correspondentes aos tipos hormonais em excesso - e não funcionantes.

Dentre os adenomas funcionantes podemos observar os prolactinomas e os somatotropinomas que secretam hormônio do crescimento (GH) e prolactina, respectivamente; corticotropinomas e tirotropinomas, que são produtores de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e do hormônio tiroestimulante (TSH). Os gonadotropinomas produzem hormônio folículo-estimulante (FSH) e/ou luteinizante (LH) e, excepcionalmente, determinam um quadro clínico associado. O restante compreende um grande grupo de adenomas clinicamente não-funcionantes (ACNF) que pode expressar ou não, hormônios diversos e subunidades de gonadotropinas (SCHEITHAUER et al., 2000).

Os adenomas da hipófise são classicamente considerados benignos e, em sua maioria, apresentam crescimento lento. Apesar disso, cerca de 30 a 45% podem apresentar-se com invasão de compartimentos parasselares e/ou do seio esfenoidal e um número significativo tem um comportamento clinicamente agressivo, essencialmente fundamentado em um padrão de recorrência precoce e/ou múltipla durante o seguimento clínico, apesar de cirurgias e outras abordagens terapêuticas (MEIJ et al., 2002; ZADA et al., 2011; HEANEY, 2014; TROUILLAS, 2014).

Os tumores hipofisários agressivos são difíceis de manejar e, conseqüentemente, várias modalidades terapêuticas podem ser utilizadas como cirurgias transesfenoidal e transcraniana, agonistas de dopamina e análogos de somatostatina para tipos específicos de adenomas, radioterapia e, mesmo, quimioterapia em alguns raros casos. Dessa forma, uma terapia multimodal pode ser necessária para controlar o crescimento rápido e as múltiplas recorrências desses tumores (DI LEVA et al., 2014; CHATZELLIS et al., 2015).

Assim, o subgrupo de adenomas de hipófise com um comportamento clinicamente agressivo deveria, pelo exposto, ser precocemente identificado, de forma a propiciar um tratamento inicial mais incisivo e/ou um acompanhamento clínico e radiológico mais estrito, com pronta instituição de terapia adjuvante na sua persistência ou recorrência. Apesar dessas considerações, até o presente momento, nenhum marcador clínico, radiológico e histológico é capaz de prever tal comportamento (DI LEVA et al., 2014).

Os tumores hipofisários que se mostram, em exames de imagem, muito volumosos à apresentação inicial ou ainda, com invasão de estruturas adjacentes durante o ato cirúrgico e mesmo com comprometimento da duramáter ao exame histológico, podem, de fato, responder favoravelmente às terapias instituídas com ausência de recidivas em observação em longo prazo (CHATZELLIS et al., 2015).

As características histológicas de adenomas hipofisários com virtual ausência de figuras de mitose, as atipias citológicas observadas, além de um discreto pleomorfismo nuclear não são capazes de fornecer dados relevantes para o seu manejo clínico, tais como o potencial de evoluir de forma invasiva ou de recidivar após cirurgia (KONTOGEOGOS, 2006; GEJMAN, SWEARINGEN, HEDLEY-WHYTE, 2008).

Assim, uma proteína (antígeno) expressa no ciclo celular, em células com potencial proliferativo, denominada Ki-67 é considerada um marcador biológico dos mais relevantes a prever o comportamento tumoral, com um papel essencial no prognóstico e direcionamento terapêutico utilizado em diversas neoplasias, tais como o carcinoma de mama, tumores do sistema nervoso central, da cérvix uterina, carcinoma da glândula adrenal e tumores neuroendócrinos (LI et al., 2015).

No tocante aos adenomas hipofisários, o antígeno Ki-67 apresenta um papel controverso na literatura, com diversos estudos demonstrando uma correlação entre a sua expressão e o comportamento tumoral, sobretudo, no que diz respeito à recorrência desses tumores (LANDOLT, SHIBATA E KLEIHUES, 1987; THAPAR et al., 1996; SALEHI et al., 2009; MATSUYAMA, 2012; RAMIREZ et al., 2012; RIGHI et al., 2012). Por outro lado,

alguns autores não conseguiram demonstrar qualquer correlação nesse sentido (HENTSCHEL et al., 2003; DUBOIS et al., 2007; CHACKO et al., 2010).

Parte das inconsistências descritas sobre o papel prognóstico do Ki-67 nos tumores de hipófise pode ser creditada a critérios não uniformes nos diferentes estudos. A invasão foi estabelecidos por meio de achados radiológicos pré-operatórios, achados intra-operatórios ou ainda pela histologia, enquanto recorrência tumoral presente em estudos com seguimento de 12 meses tem impacto diferente frente a sua ocorrência em seguimento de 5 anos. Ademais, estudos retrospectivos podem obter valores mais baixos dos índices de ki-67, em virtude da perda da antigenicidade no material emblocado em parafina por tempo prolongado (SALEHI et al., 2009).

As restrições pertinentes ao Ki-67, frente aos achados divergentes, envolvem desde fatores pré-analíticos com diferenças em técnicas laboratoriais, em protocolos de imunohistoquímica, até as características biológicas como uma heterogeneidade intratumoral de proliferação celular levando a diferentes valores, a depender da amostra obtida de um mesmo tumor (SALEHI et al., 2009; BLANK et al., 2015).

A despeito de todas as limitações apontadas, é inquestionável que a expressão do Ki-67 e a proliferação celular estejam estritamente relacionadas, sendo esse antígeno amplamente utilizado na rotina da patologia como marcador prognóstico no câncer. Ademais, é utilizado na classificação dos tumores endócrinos da Organização Mundial de Saúde (OMS) como um, dentre poucos, dos critérios para definição de adenomas hipofisários como típicos e atípicos (SCHOLZEN, GERDES, 2000; LLOYD et al., 2004; LI et al., 2015).

Reveste-se, portanto, de extrema relevância a implantação da técnica de imunohistoquímica para o Ki-67 de forma rotineira em nosso meio, o que contribuirá para uma abordagem mais racional no manejo dos pacientes com adenoma hipofisários.

Este estudo objetiva reavaliar o papel do Ki-67 nos adenomas hipofisários, aprimorando a técnica de imunohistoquímica para expressão desse antígeno, atentando aos protocolos estabelecidos na literatura para o melhor desenvolvimento do método, de forma a superar as limitações inerentes as suas características biológicas. Adicionalmente, busca estabelecer uma correlação entre o índice de marcação nuclear dessa proteína e os parâmetros demográfico e clínico patológicos dos tumores analisados, de forma a prever o seu curso e auxiliar no manejo terapêutico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Hipófise

A glândula hipófise situa-se na linha média, em base do cérebro, na superfície do osso esfenoide em uma estrutura óssea chamada sela túrcica que a circunda em seus aspectos anteriores e posteriores, assim como inferiormente. É envolta pela reflexão da dura-máter chamada diafragma selar. Lateralmente à sela túrcica estão os seios cavernosos, constituídos por segmento da carótida interna e alguns pares de nervos cranianos. Ântero-inferiormente, limita-se com o seio esfenoide e ântero-superiormente com o quiasma óptico. Mais superiormente relaciona-se com o hipotálamo, ao qual se conecta por meio da haste hipofisária (ASA, 2011a).

A hipófise de um adulto pesa cerca de 0,6 grama e apresenta dimensões aproximadas de 13 x 9 x 6mm nos diâmetros transversal, anteroposterior e vertical, respectivamente. É circundada por cápsula de tecido conjuntivo fibroso, sendo composta por duas partes distintas anatômica, embriológica e funcionalmente, que são a adenohipófise e a neurohipófise (ASA, 2011a).

A adenohipófise ou lobo anterior constitui 80% do volume total da hipófise, sendo a porção epitelial da glândula, de origem endodérmica e embriologicamente derivada da bolsa de Rathke (ASA, KOVACS, 1984; ASA, 2011a). Histologicamente, a hipófise é composta por pequenos ácinos que contêm tipos celulares especializados em secreção hormonal, circundados por uma rede intacta de fibras de reticulina (FIGURA 1) (ASA, 2008).

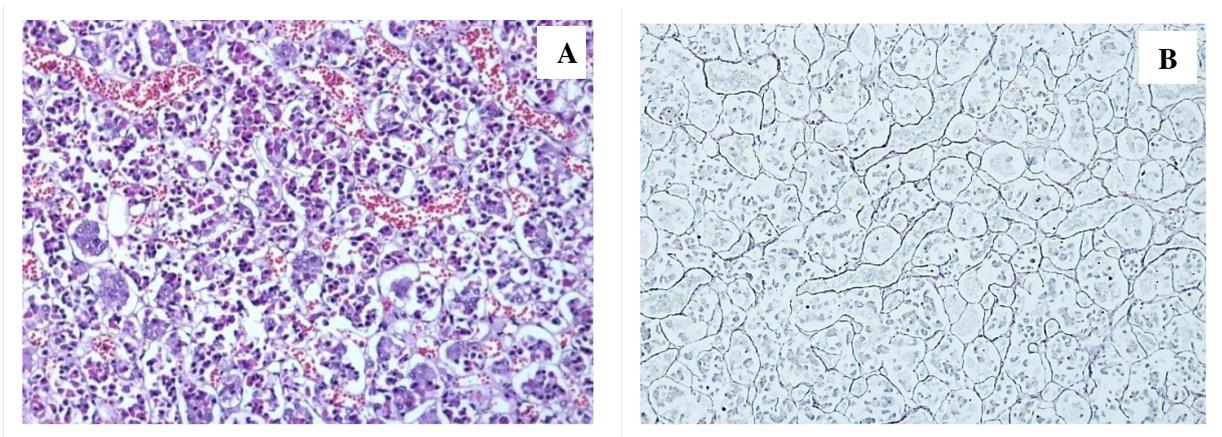


Figura 1. Fotomicrografia da glândula hipófise normal. A: células epiteliais em arranjo acinar, representadas pelos tipos celulares especializados: acidófilas, basófilas e cromófbas, coloração HE (400X). B: coloração reticulina demonstrando a rede reticulínica delimitando ácinos. Um padrão característico da adenohipófise (magnificação 400X). Fonte: ACERVO DOS AUTORES (2016).

A identificação da reticulina nesse padrão acinar, próprio do tecido hipofisário normal, permite diferenciar esse tecido de processos patológicos hiperplásicos e tumorais, nos quais os ácinos se tornam expandidos ou há completa distorção e perda do padrão de distribuição da reticulina com confluência dos ácinos, respectivamente (ASA, 2008).

As células da adenohipófise são as responsáveis pela produção e secreção dos hormônios GH, prolactina, ACTH, das gonadotrofinas (FSH e LH) e TSH (ASA, 2011a).

A neurohipófise ou lobo posterior compreende o infundíbulo, a haste hipofisária e a parte nervosa. Apresenta origem neuroectodérmica e constitui-se de células gliais modificadas denominadas pituícitos e processos axonais de neurônios cujos corpos estão localizados no hipotálamo. Tem por função precípua armazenar e liberar os hormônios hipotalâmicos ocitocina e vasopressina (ASA, 2011a).

2.2 Adenomas Hipofisários

Adenomas hipofisários são proliferações neoplásicas monoclonais de células da adenohipófise (ALEXANDER et al., 1990; HERMAN et al., 1990) e respondem por cerca de 10-15% dos tumores intracranianos, sendo o terceiro tipo mais comum após os meningiomas e os gliomas (SCHEITHAUER et al., 2006).

O diagnóstico dessa neoplasia pode ocorrer em até 20% dos indivíduos de forma incidental, ou seja, quando não suspeitados a partir de uma investigação inicial, e, menos frequentemente, quando de um quadro clínico correspondente, com uma prevalência de cerca de 1 caso por cada 1.000 habitantes (EZZAT et al., 2004; DALY et al., 2006; FERNANDEZ, KARAVITAKI, WASS, 2010). Tais dados explicitam uma ocorrência muito superior ao que era previamente considerado e torna essa neoplasia uma condição comum (GOLD, 1981; ASA, EZZAT, 2016).

A categorização (status funcional) dos adenomas hipofisários é comum a todos os tumores de origem neuroendócrina, ou seja, é determinada pelos aspectos clínicos dos pacientes acometidos e não por achados histopatológicos e imuno-histoquímicos pertinentes ao tumor. Dessa forma, tais adenomas são classificados, a partir da sua atividade hormonal *in vivo*, como clinicamente funcionantes e não funcionantes (SCHEITHAUER et al., 2000).

Dentre os adenomas clinicamente funcionantes podemos observar tumores que secretam GH e geram acromegalia/gigantismo; prolactina, com a síndrome clássica de amenorréia/galactorréia; secretores de ACTH, que levam a doença de Cushing e de TSH, que

promove um hipertiroidismo de origem central; ainda podemos identificar os tumores produtores de FSH e LH que raramente determinam um quadro clínico associado (SCHEITHAUER et al., 2000).

O restante dos adenomas hipofisários compreende um grande grupo clinicamente não funcionantes que pode sintetizar e expressar ou não, hormônios diversos e subunidades de gonadotropinas. Pode mesmo secretar alguns desses hormônios, porém em quantidades insuficientes para gerar sinais e sintomas, quando ditos adenomas silenciosos, sendo identificados por meio de estudo imuno-histoquímico adicional (AL-BRAHIM e ASA, 2006; SAEGER et al., 2007; YAMADA et al., 2007; MAISON et al., 2015).

Um aspecto importante a ser observado em adenomas hipofisários diz respeito à avaliação anátomo-radiológica, que enseja um método classificatório desses tumores baseado em suas dimensões e no grau de invasão local. Esses dados são essenciais para o planejamento cirúrgico de tais lesões, mas também apresentam impacto marcante no prognóstico quanto às taxas de persistência e recorrência tumoral (METE, ASA, 2012).

O exame de imagem por ressonância nuclear magnética (RNM), para avaliar o tamanho dos adenomas, originou uma classificação morfométrica dos tumores como macroadenomas para aqueles ≥ 1 cm e como microadenomas, quando < 1 cm no seu maior diâmetro. Quando esses tumores apresentam grandes dimensões, sendo superiores a 3 ou 4 cm, são ditos adenomas gigantes (LLOYD et al., 2004; CUSIMANO et al., 2012).

Adicionalmente, a RNM aplicada à rotina diagnóstica na avaliação da invasão dos seios cavernosos possibilita, a partir de tais parâmetros, o uso de uma classificação neuro-radiológica de prognóstico, que é amplamente utilizada, conhecida como classificação de Knosp (KNOSP et al., 1993).

Na classificação de Knosp, em um corte coronal da região selar, utiliza-se a artéria carótida interna (ACI) como um marco radiológico da qual é traçada uma linha hipotética intercarotídea que se estende dos centros dos segmentos intra e supracavernosos dessa artéria e linhas tangentes às paredes medial e lateral desses segmentos. São considerados cinco graus de invasão (FIGURA 2) e somente os graus 3 e 4 definem verdadeira invasão dos seios cavernosos (KNOSP et al., 1993; DI LEVA et al., 2014; TROUILLAS, 2014):

- Grau 0 - A condição anatômica é normal no espaço dos seios cavernosos;
- Grau 1 - O tumor empurra a parede medial do seio cavernoso, mas não ultrapassa o limite da linha intercarotídea;
- Grau 2 - O tumor ultrapassa o limite da linha intercarotídea, mas não excede as margens laterais da artéria carótida interna;

- Grau 3 - Observa-se extensão tumoral lateralmente à artéria carótida interna, no interior dos seios cavernosos;
- Grau 4 - A artéria carótida é totalmente envolvida pelo adenoma hipofisário.

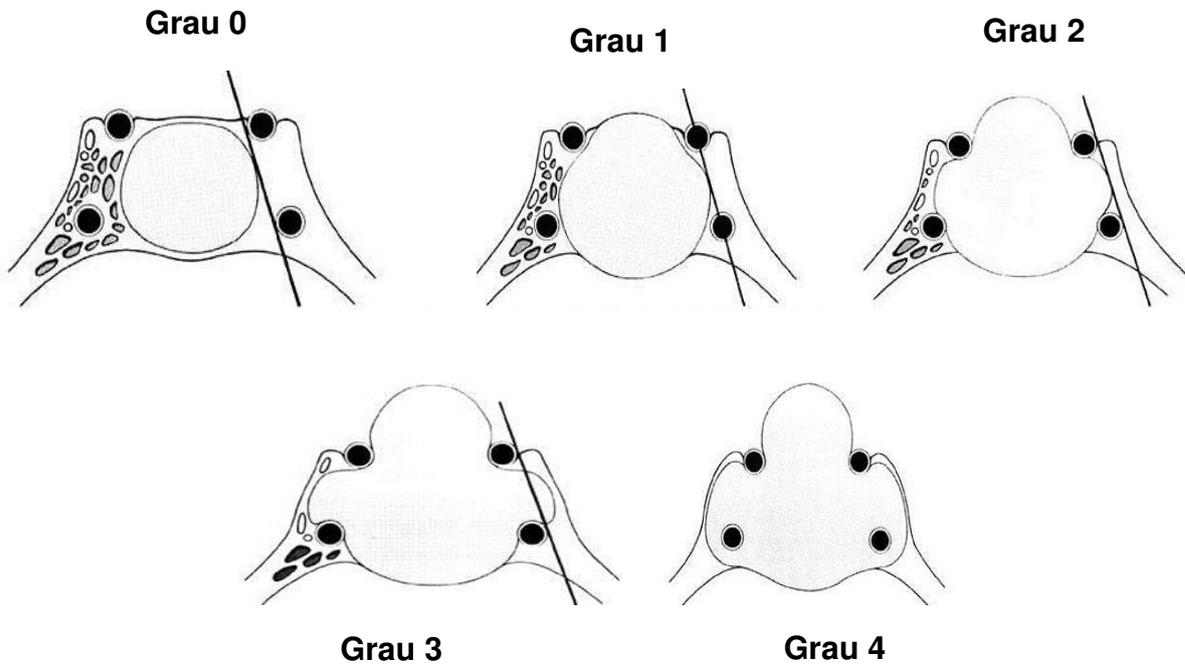


Figura 2. Classificação de Knosp: Grau 0 representa anatomia normal do seio cavernoso. No grau 1 o tumor comprime a parede medial do seio cavernoso, mas não ultrapassa o limite da linha intercarotídea. Grau 2: o tumor ultrapassa o limite da linha intercarotídea, mas não excede a margem lateral da artéria carótida interna. Grau 3 o tumor se estende lateralmente à artéria carótida interna, no interior dos seios cavernosos. Grau 4 o tumor envolve totalmente a artéria carótida intracavernosa.
Fonte: KNOSP et al. (1993).

Os tumores verdadeiramente invasivos, graus 3 e 4 da classificação de Knosp, assim como os adenomas gigantes, obviamente são mais difíceis de ressecar completamente e a persistência ou recidiva tumoral constituem-se em regra, enquanto a cura é excepcional (CHACKO et al., 2010).

Em um momento posterior à abordagem inicial dos adenomas de hipófise, que é baseada em uma classificação funcional e neuro-radiológica, no caso de terapia cirúrgica empregada, os aspectos histopatológicos das lesões passam a desempenhar um papel preponderante no direcionamento terapêutico.

Inicialmente, é imprescindível atentar para o diagnóstico diferencial das lesões selares e confirmar o diagnóstico de um adenoma, o que é feito por meio da avaliação histopatológica, utilizando a coloração de rotina hematoxilina-eosina (HE) e a partir da identificação da

alteração da morfologia glandular por uma distorção da rede de reticulina já descrita(ASA, 2011b).

Ao longo dos anos, com a evolução do conhecimento e da tecnologia, principalmente no que diz respeito às técnicas de imuno-histoquímica, também evoluiu a classificação histopatológica dos tumores de hipófise, na qual se utilizava a afinidade tintorial da neoplasia, por meio de coloração com HE, classificando-os de acordo com essa propriedade nos tipos acidófilos ou eosinofílicos, basófilos e cromóforos (TROUILLAS, 2014).

Os adenomas acidófilos eram considerados como associados à Acromegalia, basófilos ocasionavam a Doença de Cushing e os cromóforos respondiam pelos adenomas clinicamente não funcionantes. Posteriormente, tornou-se óbvio que alguns adenomas cromóforos eram associados com quadro clínico clássico de excesso hormonal e que outros acidófilos e basófilos eram clinicamente inativos, com questionamentos importantes à utilidade de tal classificação, de forma que, nos dias atuais, ela é claramente obsoleta (ASA, 2011b).

O advento da investigação imuno-histoquímica constituiu-se em um grande progresso na patologia hipofisária e, por meio de anticorpos altamente específicos, permitiu identificar a expressão hormonal por células de espécimes tumorais e daí os adenomas produtores de GH, prolactina, ACTH, TSH e gonadotropinas, ainda que silenciosos.

Por outro lado, os dados da microscopia eletrônica (ME) propiciaram, para além do tipo celular do tumor, as características ultra-estruturais celulares e expandiram sobremaneira a classificação histopatológica. A propósito, a disposição em pontos da citoqueratina como aglomerados conhecidos por corpos fibrosos, nos adenomas produtores de GH do tipo esparsamente granuloso, parece relacionar-se a uma baixa expressão de E-caderina, que seria responsável pela coesão celular por ancorar filamentos de citoqueratina à membrana celular e confere um prognóstico desfavorável para esse subtipo tumoral (NISHIOKA, HARAOKA, AKADA, 2003).

Dessa forma, as informações provenientes da imuno-histoquímica e da microscopia eletrônica fundamentaram a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2004 (ASA, 2011b) (QUADRO1).

Quadro 1. Classificação dos tumores hipofisários pela OMS, 2004.

<p>Adenomas produtores de GH (somatotropinomas)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Densamente granulados ▪ Esparsamente granulados ▪ Células mistas ▪ Mamossomatotropinomas ▪ Somatotropinomas silenciosos <p>Adenomas produtores de prolactina (prolactinomas)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Densamente granulados ▪ Esparsamente granulados <p>Adenomas produtores de TSH (tireotropinomas) Adenomas produtores de ACTH (corticotropinomas)</p> <p>Adenomas produtores de gonadotropinas (gonadotropinomas)</p> <p>Adenomas de células nulas (“nullcell”)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Adenoma hormônio imunonegativo ▪ Oncocitomas <p>Outros</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Adenomas Atípicos (Ki-67 \geq3%, p53 com extensa positividade, invasivo) ▪ Carcinoma
--

Fonte: Adaptado de Lloyd et al. (2004).

Os trabalhos de Kovacs et al. (1986) foram cruciais para o desenvolvimento da ME e a avaliação ultra-estrutural decorrente permitiu um maior conhecimento da citologia hipofisária e das correlações entre estrutura e função.

A despeito dos dados fornecidos por ME, mais recentemente, com a identificação de glóbulos positivos para citoqueratina ou de grandes vacúolos citoplasmáticos, ambos visualizados à microscopia de luz por meio da imuno-histoquímica, grande parte da informação sobre organelas e o padrão de granulação dos adenomas hipofisários obtida por ME, técnica laboriosa e pouco disponível por ser onerosa, tornou-se desnecessária e permitiu um maior emprego de uma classificação mais atual (SAEGER et al., 2016).

2.3 Ciclo celular e marcador de proliferação celular: proteína Ki-67

O ciclo celular é definido como uma cadeia contínua e complexa de eventos cujo objetivo final é a duplicação da célula, sendo a mitose a manifestação visível da divisão celular. Didaticamente, a mitose possui quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. No

entanto, do ponto de vista operacional, o ciclo celular se divide em duas fases: a intérfase e a mitose, em alternância (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

A intérfase, que acontece imediatamente após a mitose, é a fase onde ocorre a duplicação do DNA e corresponde a maior partedo tempo de vida de uma célula (cerca de 90%). Subdivide-se em três fases: *gap* 1 (G1), síntese (S) e *gap* 2 (G2). A fase G1 é o intervalo entre a mitose e a fase S, onde ocorre a síntese protéica com recuperação do volume da célula, que foi reduzido à metade durante a mitose. Na fase S ocorre a síntese de DNA e duplicação de centríolos e centrossomos. Já na fase G2 as células acumulam energia para ser usada durante a mitose. As células que não se renovam, saem do ciclo celular na fase G1 e entram na fase de repouso ou quiescência, chamada *gap* zero (G0) (FIGURA 3) (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

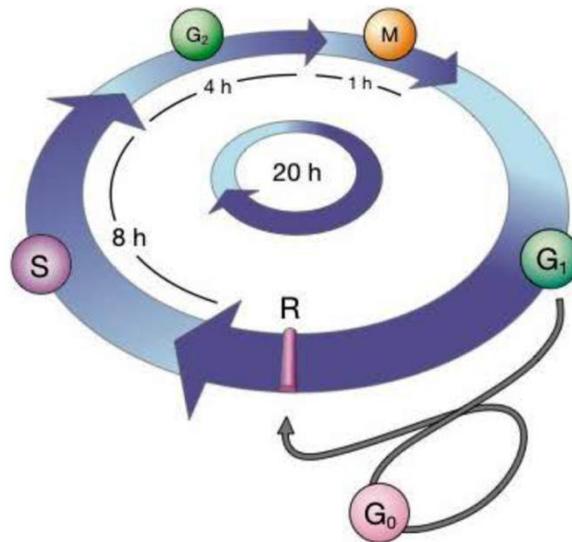


Figura 3. O ciclo celular. Fases de divisão celular: na fase G1 há o ponto de restrição (R), que impede a passagem da célula com o DNA danificado para a fase seguinte. Em resposta a sinais externos, a célula pode prosseguir no ciclo ou entrar entra fase quiescente (G0). Mediante a um estímulo, pode retornar à fase G1, onde ocorre a síntese de RNA. Seguindo para a fase S ocorre a síntese do DNA. Na fase G2, há formação de microtúbulos do fuso mitótico. Na fase M ou mitose ocorre formação das células-filhas.

Fonte: Adaptado de Junqueira e Carneiro (2013).

A atividade proliferativa de um tecido pode ser determinada pela contagem do número de figuras de mitose, citometria de fluxo para determinação da fração da fase S e por imunohistoquímica, que utiliza anticorpos contra vários antígenos de proliferação celular (LI et al., 2015).

O termo marcador de proliferação celular se refere à expressão de uma proteína que está presente em fração de células em crescimento, em uma dada população de células, neoplásicas ou não (SCHOLZEN, GERDES, 2000).

O grau em que uma célula prolifera tem forte correlação, nas neoplasias, com a intensidade da progressão tumoral, agressividade e invasão sendo utilizada como valor prognóstico. Dessa maneira, o estudo de marcadores de proliferação celular torna-se um importante coadjuvante na pesquisa do câncer por refletir a capacidade proliferativa do tumor (SCHOLZEN, GERDES, 2000).

O Ki-67 é uma proteína (antígeno) nuclear que foi originalmente identificada na década de 1980 como um marcador associado à proliferação celular. Esse antígeno é definido por um protótipo anticorpo monoclonal chamado MIB-1 (*Molecular Immunology Borstel*) que identifica um antígeno nuclear associado com o ciclo celular por meio da técnica de imunohistoquímica (SCHLUTER et al., 1993).

O nome do antígeno Ki-67 é derivado da cidade de origem, Kiel, na Alemanha e o seu número é oriundo do clone original da placa de 96 poços de cultura de células. Devido ao fato do antígeno não ter sido caracterizado inicialmente, foi mantida a denominação como antígeno Ki-67. Sua estrutura primária completa só foi publicada dois anos após a clonagem e o sequenciamento inteiro do DNA (SCHLUTER et al., 1993).

O antígeno Ki-67 é uma proteína não-histônica componente da matriz nuclear e nucleolar, constituída por cadeias de polipeptídios (GERDES et al., 1991). Possui duas isoformas com peso molecular calculados em 345 e 395 kilodaltons (kDa) e contém uma grande região central com 16 elementos repetitivos, codificados por um único exon de 6845 pares de bases, localizado no cromossomo 10. Trata-se de uma imunoglobulina G (Ig G1) de camundongo produzida contra uma fração nuclear da linhagem celular L428 da Doença de Hodgkin (GERDES et al., 1984).

A expressão do Ki-67 é vista nas fases G1, S, G2 e em mitose do ciclo celular. Todavia, na fase de repouso (G0) ou em células quiescentes não há expressão desse antígeno (GERDES et al., 1984). Durante o ciclo celular, o Ki-67 alcança maior expressão nas fases G2 e de mitose, razão pela qual o anticorpo contra a proteína Ki-67 tem sido cada vez mais utilizado como ferramenta diagnóstica, de prognóstico, terapêutico e até mesmo graduação nos mais diversos tipos de neoplasia (SCHOLZEN, GERDES, 2000; LI et al, 2015).

Tem sido também descrito que há uma expressão maior da proteína Ki-67 em tecido neoplásico maligno quando comparado com tecido normal, bem como apresenta maior expressão nas neoplasias malignas menos diferenciadas (LI et al., 2015).

A quantidade de Ki-67 presente na célula durante o ciclo celular é regulada pelo balanço preciso entre síntese e degradação da proteína, como indicado pela sua meia vida

curta que é de aproximadamente 60 a 90 minutos (HEIDEBRECHT et al., 1996; LI et al., 2015).

No passado, em relação à detecção do Ki-67, o maior empecilho para os estudos referentes a essa proteína era a incapacidade do anticorpo original detectar materiais emblocados em parafina. Este fato foi superado com o surgimento do anticorpo monoclonal MIB-1, que tem maior sensibilidade e facilidade metodológica (LI et al., 2015).

Em suma, Ki-67 é considerado o marcador de proliferação celular de maior acurácia, sendo utilizado muitas vezes como fator prognóstico em neoplasias cuja evolução é de difícil previsão quando baseada somente em critérios histológicos (SCHOLZEN, GERDES, 2000). Notavelmente, sua expressão, além de refletir a razão de proliferação, se correlaciona com iniciação e progressão de neoplasias, assim como, com suas metástases (LI et al., 2015).

O índice de proliferação do Ki-67 é baseado no sistema de escore da porcentagem de células tumorais coradas pelo anticorpo MIB-1. Existem sistemas que utilizam um software automatizado com microscópio de luz que contabiliza e classifica essa positividade após seleção, pelo patologista, de pelo menos oito campos representativos de maior positividade. A porcentagem de núcleos de células tumorais positivas é quantificada utilizando software de análise de imagens. Para obtenção desse índice, dividem-se o número de núcleos de células tumorais imunorreativos para Ki-67 pelo total de mil células e obtém-se um percentual que é a expressão do índice de Ki-67 (SCHOLZEN, GERDES, 2000; LI et al., 2015).

Teoricamente, o Ki-67 é um parâmetro do estado fisiológico da célula, porém não revela sua capacidade de mitose, pois não fornece informações relativas ao tempo necessário entre as divisões. Isso se explica pela complexidade dos fatores que atuam no ciclo de uma célula, tanto internos, a saber, produtos de genes supressores de tumor, entre outros, quanto externos, como à quimioterapia.

Alguns aspectos do Ki-67 na proliferação celular devem ser precedidos de uma conceituação teórica a respeito do que seja, realmente, um marcador de proliferação. Dois critérios são necessários para essa definição (VAN DIERENDONCK et al., 1989):

- a) presença contínua do antígeno durante o ciclo celular em todos os tipos de células;
- b) desaparecimento do antígeno quando a célula passa para um estado não proliferativo.

O segundo critério é mais difícil de ser preenchido, pois um dos problemas reside na dificuldade em definir o que seja uma célula em estado não proliferativo, visto que o tempo entre as mitoses pode variar consideravelmente, dependendo das condições do meio extracelular, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Dessa forma, o marcador poderá ser detectado sem a célula de fato encontrar-se em proliferação. O termomarcador de proliferação refere-se somente ao potencial da célula de se dividir, e não ao evento final da divisão celular, pois em um tumor que expresse células imunopositivas para Ki-67, essas podem não se duplicarem quando submetidas, por exemplo, à quimioterapia, permanecendo a imunomarcagem (VAN OIJEN et al., 1998).

Apesar das limitações inerentes às características biológicas descritas, é inquestionável que a expressão da proteína Ki-67 e a proliferação celular estão estritamente relacionadas. O Ki-67 é, então, amplamente utilizado na rotina de patologia cirúrgica como marcador prognóstico no câncer, assim como um candidato promissor na biologia molecular como alvo terapêutico e para diagnóstico de uma grande variedade de doenças malignas (SCHOLZEN, GERDES, 2000; LI et al., 2015).

2.4 Proteína Ki-67 e Adenomas Hipofisários

Os adenomas de hipófise são classicamente considerados tumores de comportamento benigno e, em sua maioria, apresentam um padrão de crescimento indolente. Entretanto, uma fração significativa pode demonstrar um crescimento rápido com invasão dos seios cavernosos e esfenoidais, enquanto um subgrupo tem um comportamento agressivo, com múltiplas recorrências, a despeito das abordagens terapêuticas empregadas (ZADA et al., 2011; TROUILLAS, 2014).

Dentre as neoplasias de hipófise, em torno de 0,2% pode apresentar-se com metástases cérebro-espinhal e/ou sistêmicas, sendo, portanto, diagnosticados como carcinoma de hipófise. Adicionalmente, alguns dos adenomas hipofisários com potencial maligno incerto são definidos como atípicos pela OMS na sua classificação do ano de 2004 (SCHEITHAUER et al., 2004).

Estritamente falando, adenomas atípicos são invasivos, com um índice de Ki-67 $\geq 3\%$, forte expressão nuclear de P53 e alta atividade mitótica (LLOYD et al., 2004; SCHEITHAUER et al., 2004). Apresentam uma prevalência, nas diferentes séries de tumores hipofisários, que varia de 2,5% a 15%. Em grande parte, essa variação decorre dos diferentes critérios utilizados para definir invasão nos diversos estudos (SAEGER et al., 2007; ZADA et al., 2011).

A classificação da OMS que define os adenomas como atípicos, é alvo de muitas controvérsias. O índice de Ki-67 $\geq 3\%$, é considerado por alguns autores, um “*cutoff*”

arbitrário originado de achados de um único laboratório e para o qual faltam dados de reprodutibilidade (ASA, EZZAT, 2016).

Pelo exposto em inúmeros estudos, é possível constatar a ampla variação do potencial evolutivo dos tumores de hipófise, demonstrando desde um comportamento essencialmente benigno até um padrão neoplásico metastático (SAV et al., 2015).

Identificar os fatores patológicos que levam a progressão ou recorrência dos adenomas de hipófise poderia propiciar a utilização de tratamentos adjuvantes mais apropriados ou de um acompanhamento mais ou menos estrito. Muitos esforços foram feitos para encontrar um marcador biológico para a natureza agressiva de alguns dos adenomas, mas nenhum é amplamente aceito como indicador de recorrência e/ou progressão desses tumores (GEJMAN, SWEARINGEN, HEDLEY-WHYTE, 2008; SALEHI et al., 2010).

O tamanho do tumor e o seu grau de invasão são considerados importantes fatores prognósticos para recidiva ou progressão tumoral, visto que é tecnicamente mais difícil ressecar tumores grandes ou invasivos. Obviamente, o aspecto maior a condicionar a evolução do tumor operado será a efetividade da ressecção cirúrgica (HSU, 1993). No entanto, tumores com tais características podem responder favoravelmente à abordagem cirúrgica com ausência de recidivas em observação em longo prazo (CHATZELLIS et al., 2015).

As características histopatológicas do tumor hipofisário como as atipias celulares, a contagem de mitoses e o pleomorfismo não são capazes de predizer seu curso clínico e, portanto, subsidiarem a decisão terapêutica (THAPAR et al., 1996).

O Ki-67 tem sido largamente estudado em neoplasias hipofisárias, sendo relacionado a vários aspectos clínicos no manejo de tais lesões, notadamente, sua capacidade de invasão e potencial de recorrência. Assim, é um parâmetro relevante para a classificação dos adenomas hipofisários. De uma forma geral, os tumores da hipófise com comportamento agressivo têm a expressão de Ki-67 aumentada. Não obstante, existe uma considerável justaposição da marcação de Ki-67 entre os adenomas não invasivos e invasivos, bem como entre adenomas e carcinomas da hipófise (SALEHI et al, 2009; SAV et al, 2015; ASA, EZZAT,2016).

Na literatura científica disponível, para além de evidências sobre a relação de Ki-67 com a invasão, também tem sido demonstrada sua associação com o tamanho do tumor da hipófise, a velocidade de crescimento e recidiva tumoral (SALEHI et al, 2009; MATSUYAMA, 2012; RAMIREZ et al., 2012; RIGHI et al., 2012).

Vale ressaltar que, apesar de numerosos estudos relatarem associações conclusivas de índice Ki-67 com comportamento agressivo, tamanho e/ou subtipo de adenoma, outros

autores não obtiveram tais resultados (HENTSCHEL et al., 2003; DUBOIS et al., 2007; CHACKO et al., 2010).

É evidente que os dados discrepantes em relação ao comportamento tumoral, em parte, têm sua base nos critérios não uniformes dos vários estudos e em problemas técnicos relacionados ao Ki-67. Sendo assim, faz-se necessário definir métodos uniformes, atentando para fatores desde fase pré-analítica da coleta com a utilização de fixador adequado, respeitando o tempo de fixação e processamento técnico, bem como uma boa realização da técnica de imuno-histoquímica e técnica de contagem dos núcleos imunomarcados do Ki-67 observando-se os protocolos existentes (SALEHI et al., 2009). No quadro 2, são demonstrado as vantagens e desvantagens do antígeno Ki-67.

Quadro 2. Vantagens e desvantagens do antígeno Ki-67.

Ki-67

Vantagens:

- . Discrimina entre células em proliferação e em fase quiescente;
- . Indicador de prognóstico;
- . Ki-67 \geq 3% associado com comportamento clínico agressivo, *cut-off* usado para definir adenoma hipofisário atípico (OMS, 2004).

Desvantagens:

- . Achados inconsistentes relacionados aos protocolos nos diferentes laboratórios;
- . Achados de valores diferentes em diferentes amostras de um mesmo tumor (heterogeneidade intratumoral);
- . Técnica não padronizada para mensuração (*hot spots*, campos aleatórios, automatizada).

Fonte. Adaptado de Di Leva et al. (2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a expressão imuno-histoquímica e o índice do marcador de proliferação celular antígeno Ki-67 e sua relevância prognóstica em adenomas hipofisários entre pacientes atendidos em Hospital de Referência no Maranhão.

3.2 Específicos

Avaliar a expressão imuno-histoquímica e o índice do antígeno Ki-67 em adenomas hipofisários não-funcionantes e funcionantes em seus distintos diagnósticos;

Correlacionar a expressão e o índice do Ki-67 em adenomas hipofisários com as características demográficas, a saber, o sexo e a idade;

Correlacionar à expressão imuno-histoquímica e o índice do Ki-67 em adenomas hipofisários com as características clínicas desses tumores, tais como tamanho, invasão e terapia farmacológica prévia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Foi realizado um estudo analítico com delineamento do tipo corte transversal.

4.2 Período e Local de Estudo

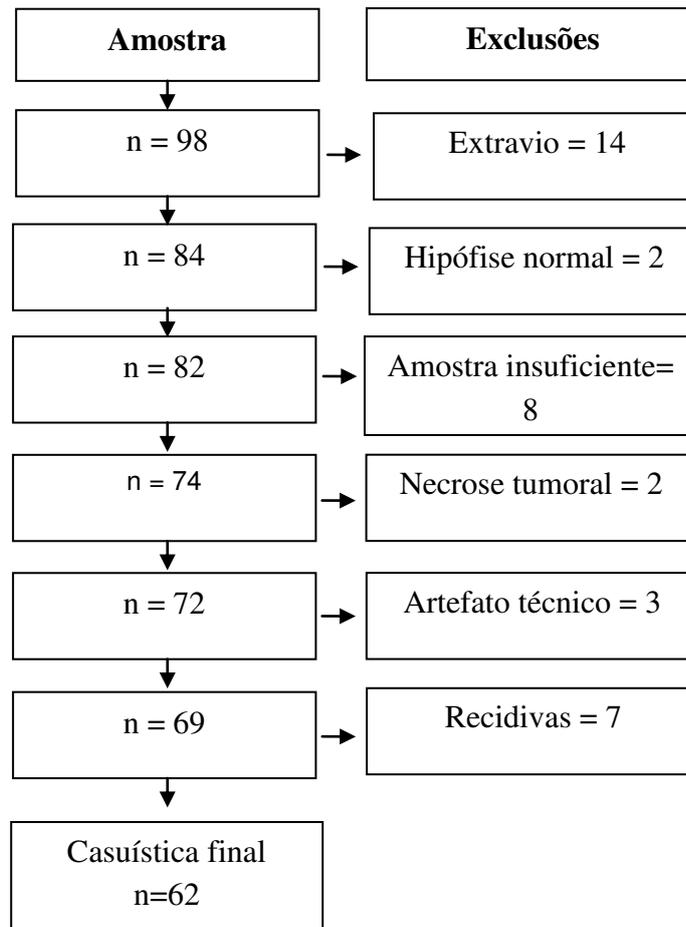
Este estudo foi realizado no período de novembro de 2015 a agosto de 2016, no ambulatório de neuroendocrinologia do Serviço de Endocrinologia e Unidades de Anatomia Patológica e Microscopia Eletrônica e Imunofluorescência do Hospital Universitário Unidade Presidente Dutra Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA).

4.3 População e amostra: critérios de inclusão e exclusão

Participaram desse estudo pacientes em acompanhamento no ambulatório de neuroendocrinologia do Serviço de Endocrinologia, com idade superior a 16 anos, de ambos os sexos, que apresentaram o diagnóstico de adenoma hipofisário e que foram submetidos à ressecção cirúrgica desse tumor.

Foram excluídos os pacientes cujas amostras de tumor apresentaram autólise, extensa necrose tumoral, pouca representatividade tecidual; tecido hipofisário normal; casos de extravio de amostra; recidiva tumoral e artefatos que impossibilitassem a boa realização da técnica de imuno-histoquímica.

A casuística desse estudo constituiu-se, inicialmente, de 98 amostras de adenomas hipofisários operados. Houve, entretanto, exclusão de 36 casos, dos quais, 14 deles por extravio de amostra, em 2 casos tratava-se de tecido hipofisário normal e a amostra tumoral foi insuficiente em 8; necrose tumoral foi vista em 2 casos e artefatos técnicos em 3. Por fim, 7 amostras eram recidiva tumoral. Dessa forma, somente em 62 pacientes foi possível a análise para obtenção de resultado para o estudo (FIGURA 4).

Figura 4. Fluxograma de exclusões.

4.4 Coleta das Amostras Biológicas / Amostragem

Esta pesquisa teve início em Novembro de 2015, com a inclusão de 98 pacientes oriundos do Serviço de Referência Estadual em Neuroendocrinologia do Hospital Universitário Unidade Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão – HUUFMA, que foram atendidos nesse ambulatório no período de janeiro de 2008 a maio de 2016 e que foram submetidos à adenomectomia hipofisária no Serviço de Neurocirurgia do referido hospital.

A obtenção das amostras em blocos de parafina, para os casos operados previamente ao início do estudo, foi feita a partir do arquivo da Unidade de Anatomia Patológica desse hospital. Para as amostras dos dois últimos anos, nos quais iniciamos a coleta da pesquisa, a etapa pré-analítica de fixação foi aprimorada com a utilização de formol-zinco a 10% ou formol tamponado a 10%, que têm a característica de preservar melhor sítios de ligação antigênica. O processamento técnico dessas amostras tumorais também foi padronizado para

ser realizado em até 48h. Seguiu-se técnica de rotina em histopatologia. Para confirmação diagnóstica do adenoma foram confeccionadas lâminas com cortes corados em Hematoxilina-Eosina, reticulina e ácido periódico de Schiff (PAS) e, então, selecionados os casos para realização da técnica de imuno-histoquímica.

Foram estudados os adenomas hipofisários divididos em quatro grupos: somatotropinomas, corticotropinomas, adenomas clinicamente não-funcionantes - ACNF e prolactinomas.

O diagnóstico dos somatotropinomas, corticotropinomas, prolactinomas e dos adenomas não funcionantes foi realizado de acordo com a rotina do ambulatório do Serviço de endocrinologia do HUUFMA, por meio de dados de prontuários, baseado em dados clínicos dos pacientes e análise de exames laboratoriais quanto à possível presença de hipersecreção hormonal.

A presença de todos os adenomas hipofisários foi confirmada através de exames de imagem obtidos por RNM.

Na presente análise foi utilizada a classificação de Knosp para determinar invasão parasselar dos seios cavernosos. Foram considerados como adenomas não invasivos, aqueles com Knosp graus 0 a 2 e como invasivos, os com Knosp graus 3 e 4. O Grau de Knosp foi avaliado por um único radiologista utilizando RNM prévia à cirurgia.

Ou só de terapia medicamentosa específica prévia à cirurgia também foi analisado. Agonistas dopaminérgicos e análogos de somatostatina foram considerados como drogas específicas. O uso prévio foi definido por uso atual e mínimo de três meses da droga específica e pacientes sem uso foram definidos como aqueles que nunca fizeram ou que se encontravam há pelo menos seis meses sem uso de medicação.

4.5 Perfil Bioquímico

Para avaliação funcional dos adenomas foram utilizados dados coletados a partir do prontuário destes pacientes, com a utilização das seguintes análises: prolactina, TSH, T4 livre, ACTH, cortisol, LH, FSH, estradiol (mulheres) e testosterona (homens), GH basal e Somatomedina C (IGF-1).

4.6 Técnica de Imuno-histoquímica (IHQ)

A imunoexpressão do Ki-67 foi obtida através do método imunoenzimático da streptoavidina-biotina-peroxidase. Utilizando anticorpo monoclonal de coelho anti-Ki 67, clone SP6, Abcam, cod. Ab16667 - específico para o antígeno, diluição de 1:100). A realização da técnica de Imuno-histoquímica seguiu as etapas:

Inicialmente foram obtidos cortes histológicos de 3µm do material emblocado em parafina, sendo utilizadas lâminas previamente limpas e silanizadas.

1. Desparafinização dos cortes histológicos foi realizada com xilol a 60 °C por 20 minutos seguidos de outra incubação em xilol à temperatura ambiente por 20 minutos;
2. Hidratação dos cortes foi realizada com Etanol a 100% em 3 banhos de 30 segundos cada, etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada;
3. Recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de ácido cítrico 10 mM, pH 6,0 (Merck, EUA) ou Tampão de recuperação de antígeno (Tampão Citrato, pH 6,0, 100x concentrado) marca Spring Bioscience cod PMB1 ®, em panela a vapor (após a fervura da água da panela, colocar a cuba com as lâminas em solução de recuperação) por 35 minutos. Deixar esfriar por 20 minutos, em temperatura ambiente. Lavagens em água corrente e água destilada;
4. Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída volume a volume em metanol, em três banhos de 10 minutos cada. Lavagens em água corrente e água destilada. Lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 10mM, pH 7,4 por 5 minutos;
5. Bloqueio de proteínas inespecíficas com Cas Block™ (Invitrogen, EUA) por 10 minutos a 37° C. Escorrer e incubar com o anticorpo primário;
6. Incubação das lâminas com anticorpo primário (anticorpo monoclonal de coelho anti-Ki 67, clone SP6, Abcam, cod. Ab16667 - específico para o antígeno) com diluição de 1:100 em solução de albumina bovina (BSA / SIGMA, EUA) a 1% e azida sódica - NaN₃ (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida por 30 min. a 37 °C e, em seguida, 18 horas (overnight) a 4° C. Lavagens em tampão PBS com três trocas;
7. Incubação com o Polímero HRP EP-12-20502 do Kit Easy Link One, Easy Path, fabricado por Immunobioscience Corp, EUA por 60 minutos a 37 °C. Lavagens com tampão PBS com três trocas de 3 a 5 minutos cada uma;

8. Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, EUA) a 0,06%, 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;
9. Contracoloração com hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5% - solução de Scott) seguida de lavagens em água corrente e água destilada;
10. Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em 3 banhos de xilol e montagem em meio permanente (Entellan Merck) com lamínula.

Os controles utilizados na reação imuno-histoquímica compreendem um controle positivo, sabidamente positivo para o anticorpo em estudo (amígdala palatina) e um controle negativo com incubação em PBS, sem utilização do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos técnicos.

4.6.1 Análise da Imuno-histoquímica

Como comumente visto em outras neoplasias endócrinas, a positividade para o Ki-67 é heterogeneamente distribuída por todo o tumor (RIGHI et al., 2012). A atividade proliferativa nos adenomas foi avaliada nas áreas tumorais onde esse marcador foi predominantemente expressado, sendo considerados aqueles núcleos fortemente positivos (SCHEITHAUER et al., 2006; GEJMAN, SWEARINGEN, HEDLEY-WHYTE, 2008).

Como sugerido por outros autores foram excluídas desta avaliação, áreas de tecido normal, áreas hemorrágicas, áreas necróticas, componentes vasculares (endotélio) e hematogênicos (PAEK et al., 2005; CHILOIRO et al., 2014).

A análise imuno-histoquímica, nesse estudo, foi realizada por um único observador que, após rastreio de toda a lâmina, elegeu as áreas com maior concentração de núcleos fortemente positivos para o antígeno Ki-67. A captura dessas imagens foi feita utilizando-se microscópio de luz, acoplado a um sistema de câmera (Micro Axion Cam MRC-Zeiss®) e a um computador.

As imagens foram fotografadas com objetiva de grande aumento (40X) nas áreas de maior positividade (*hot spots*). Para cada adenoma foram fotografados 5 a 10 campos, na dependência do tamanho da amostra. As fotomicrografias dessas áreas foram então submetidas à quantificação dos núcleos imunomarcados com a contagem manual de 1000

células tumorais positivas e negativas. Essa contagem foi iniciada sempre a partir das células positivas e depois foram contadas as negativas até um total proposto. As fotomicrografias selecionadas para contagem manual obedeceram a ordem decrescente de núcleos imunomarcados. Foi utilizado para essa contagem o programa *Image J* que se encontra livre na web (<http://imagej.nih.gov/ij/>) e assim obtivemos o índice percentual.

4.7 Análise estatística

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel 2013® e a análise estatística dos resultados foi realizada no programa estatístico Stata 14.0.

Para as associações entre Índice Ki-67 e demais variáveis foi aplicado o teste Qui-quadrado e o teste Kruskal Wallis para variáveis não paramétricas. Na verificação da relação entre a média da idade e índice Ki-67 (duas categorias) foi aplicado o teste T de *student*. Na relação entre a Idade e o Ki-67 (três categorias) foi aplicado o teste ANOVA.

O teste de normalidade foi realizado através do Shapiro Wilk. Todas as associações e comparações foram consideradas como estatisticamente significativas quando alfa foi inferior a 5%.

4.8 Aspectos Éticos

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão Científica COMIC/HUUFMA com o parecer nº 005/2015 do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - (CEP-HUUFMA) em atendimento à Resolução CNS 466/2012, conforme Parecer Consubstanciado nº 1.335.011e CAAE 45704215900005086 (ANEXO A).

Respeitando a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, os participantes do presente estudo, inicialmente tomarem ciência de todos os procedimentos da pesquisa, levando-se em consideração princípios bioéticos. Estando esclarecidos e livres para optarem pela participação na pesquisa, de forma voluntária, o participante do estudo que aceitaram participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

5 RESULTADOS

5.1 População de pacientes portadores de adenomas hipofisários

Foram analisados 62 pacientes portadores de adenomas de hipófise, com a média de idade à cirurgia de 46,2 ($\pm 13,3$) anos, variando de 16 a 73 anos, sendo 31 pacientes do sexo feminino, o que correspondeu a 50% da amostra.

A maioria dos pacientes (n=32) apresentou ACNF, correspondendo a 51,6% da amostra. Os demais foram representados por 22 (35,5%) pacientes com somatotropinomas, seis (9,7%) corticotropinomas e, em menor número, 2 (3,2%) pacientes com prolactinomas (TABELA 1).

No tocante à avaliação morfométrica, houve predominância de macroadenomas em 34 (54,8%) pacientes; adenomas gigantes foram encontrados em 23 (37,1%) pacientes, enquanto os microadenomas foram observados em 5 (8,1%) pacientes (TABELA 1).

Houve expressão do antígeno Ki-67 em 37 (59,7%) pacientes, variando o seu índice de 0,1% a 2,4%. Índices de Ki-67 > 1% foram observados em 14 (22,6%) pacientes. Os maiores índices de Ki-67 foram vistos em adenomas não funcionantes e corticotropinomas, seguidos dos somatotropinomas (TABELA 1 e QUADRO 3).

Com relação ao pré-tratamento dos pacientes com adenomas hipofisários, apenas 16 (25,8%) pacientes usaram terapia medicamentosa prévia e desses, 10 (62,5%) eram acromegálicos (TABELAS 1 e 5). Cinco eram portadores de ACNF e 1 de prolactinoma.

Os adenomas hipofisários apresentaram-se como invasivos em 16 (32%) dos 50 pacientes com exames de imagem disponível para análise (TABELA 1). Desses 16 pacientes, 6 (37,5%) eram acromegálicos e 9 (56,2%) eram portadores de ACNF.

Tabela 1. Características demográficas e clínicas de pacientes com adenomas hipofisários, São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	N	%
Sexo		
Feminino	31	50,0
Masculino	31	50,0
Idade (anos)		
Até 30	6	9,7
Entre 31 e 40	17	27,4
Entre 41 e 49	14	22,6
Entre 50 e 59	14	22,6
60 ou mais	11	17,7
$\bar{X}\pm dp$	46,20±13,03	
Diagnóstico		
ACNF	32	51,6
Somatotropinomas	22	35,5
Corticotropinomas	6	9,7
PRL	2	3,2
Tamanho		
Macroadenoma	34	54,8
Adenoma Gigante	23	37,1
Microadenoma	5	8,1
Índice ki-67		
Negativo	25	40,3
0,01 a 1,00	23	37,1
1,01 ou mais	14	22,6
Pré-tratamento		
Não	46	74,2
Sim	16	25,8
Invasão/Knosp (grau)		
Não (0 a 2)	34	54,8
Sim (3 e 4)	16	25,8
Não Disponível	12	19,4
TOTAL	62	100,0

Quadro 3. Descrição da série de 37 pacientes com adenomas hipofisários com positividade para proteína Ki-67.

CASUÍSTICA	IDADE	SEXO	ÍNDICE KI-67 %	DIAGNÓSTICO	TAMANHO	KNOSP
1	36	M	0,3	ACNF	Macroadenoma	1
2	31	M	0,1	ACNF	Macroadenoma	2
3	16	M	0,5	Corticotropinoma	Microadenoma	0
4	52	F	0,2	ACNF	Macroadenoma	1
5	32	M	1,2	Prolactinoma	Gigante	ND
6	44	F	1,0	ACNF	Gigante	1
7	33	F	2,4	Corticotropinoma	Macroadenoma	ND
8	59	M	0,2	ACNF	Gigante	3
9	47	M	0,6	Somatotropinoma	Macroadenoma	1
10	65	M	0,4	ACNF	Gigante	1
11	52	M	1,5	ACNF	Gigante	2
12	62	M	0,6	ACNF	Macroadenoma	1
13	40	M	0,3	Somatotropinoma	Macroadenoma	3
14	48	M	0,6	ACNF	Gigante	2
15	35	M	0,2	Somatotropinoma	Gigante	2
16	74	F	2,4	ACNF	Gigante	1
17	51	F	1,1	Somatotropinoma	Gigante	3
18	39	F	0,1	Corticotropinoma	Macroadenoma	ND
19	46	M	1,8	ACNF	Gigante	1
20	59	M	0,3	ACNF	Macroadenoma	2
21	42	M	0,6	Somatotropinoma	Gigante	0
22	58	M	0,2	ACNF	Macroadenoma	3
23	37	F	0,4	Somatotropinoma	Macroadenoma	2
24	39	F	0,2	ACNF	Macroadenoma	ND
25	34	M	0,2	ACNF	Gigante	ND
26	60	F	0,4	ACNF	Macroadenoma	ND
27	73	F	0,9	ACNF	Gigante	1
28	43	F	2,1	Somatotropinoma	Macroadenoma	1
29	30	M	0,7	Somatotropinoma	Macroadenoma	4
30	54	F	2,3	ACNF	Gigante	3
31	51	M	0,7	ACNF	Gigante	ND
32	69	M	0,2	ACNF	Macroadenoma	3
33	46	M	0,8	Somatotropinoma	Macroadenoma	ND
34	48	F	1,7	ACNF	Macroadenoma	2
35	42	M	2,1	Somatotropinoma	Macroadenoma	0
36	47	F	1,3	Somatotropinoma	Gigante	1
37	40	F	1,1	Somatotropinoma	Macroadenoma	2

Legenda: Idade em anos; M – masculino; F – feminino; ND – Não Disponível

5.2 Índice Ki-67 e Características Demográficas

A expressão para o antígeno Ki-67 esteve presente em 17 (54,8%) de 31 pacientes do sexo feminino e em 20 (62,5%) do sexo masculino. Quando os pacientes foram estratificados de acordo com o índice de Ki-67 e a sua mediana, um índice >1% foi predominantemente no sexo feminino, assim como a mediana de 1,1% frente a 0,5% no sexo masculino, com um valor de $p=0,04$ e $p=0,02$, respectivamente, alcançando significância estatística (TABELAS 2 e 3).

Com relação à faixa etária, foi observada positividade para o Ki-67 em 31(60,8%) de 51 pacientes abaixo de 60 anos e em 6 (54,5%) de 11 pacientes acima de 60 anos. Houve discreto predomínio nas faixas etárias entre 41 e 59 anos com 18(64,4%) de 28 pacientes apresentando positividade para Ki-67. Tal predomínio foi mantido quando analisada a distribuição por índice de Ki-67 e sua mediana, mas sem alcançar significância estatística (TABELAS 2 e 3).

Tabela 2. Relação entre a expressão do Ki-67 e as características demográficas de pacientes com adenoma hipofisário. São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	Índice Ki-67		Valor de p*
	Positivo f (%)	Negativo f (%)	
Sexo			
Feminino	17 (54,8)	14 (45,2)	0,44
Masculino	20 (62,5)	11 (37,5)	
Idade (anos)			
Até 30	2 (33,3)	4 (66,7)	0,68
Entre 31 e 40	11 (64,7)	6 (35,3)	
Entre 41 e 49	9 (64,3)	5 (35,7)	
Entre 50 e 59	9 (64,3)	5 (35,7)	
60 ou mais	6 (54,5)	5 (45,5)	
$\bar{X} \pm dp$	47,1 ($\pm 12,8$)	44,9 ($\pm 13,5$)	0,25
TOTAL	37	25	

F Teste T de Student. * Dados disponíveis em 50 pacientes

Tabela 3. Relação do Índice Ki-67 e sua mediana com características demográficas de pacientes com adenoma hipofisário. São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	Índice Ki 67 (%)			p*	Índice Ki-67 (%)	
	Negativo	0.01 a 1,0	≥ 1,01		Mediana (Min. – Max)	p*
Sexo						
Feminino	14 (45,2)	7 (22,6)	10 (32,2)	0,04	1,1 (0,1-2,4)	0,02
Masculino	11 (35,5)	16 (51,6)	4 (12,9)		0,5 (0,2-1,8)	
Idade						
Até 30	4 (66,8)	1 (16,6)	1 (16,6)	0,71	0,6 (0,5-0,8)	0,52
Entre 31 e 40	6 (35,3)	8 (47,0)	3 (17,7)		0,3 (0,1-2,4)	
Entre 41 e 49	5 (35,7)	4 (28,6)	5 (35,7)		1,0 (0,6-2,1)	
Entre 50 e 59	5 (35,7)	5 (35,7)	4 (28,6)		0,7 (0,2-2,3)	
60 ou mais	5 (45,4)	5 (45,4)	1 (9,2)		0,5 (0,2-2,4)	
$\bar{X} \pm dp$	44,9±13,5	48,3±12,7	45,1±13,1	0,62¥		
TOTAL	25	23	14			

*Kruskall Wallis. ¥ ANOVA

5.3 Índice Ki-67 e Características Clínicas dos Adenomas Hipofisários

A análise quanto ao diagnóstico demonstrou a expressão do Ki-67 em maior número de pacientes com ACNF, com 21(65,6%) de um total de 32 pacientes. Os demais eram adenomas funcionantes dos quais 12 (54,5%) de 22 pacientes apresentavam somatotropinomas, 03 (50%) eram corticotropinomas e apenas 01 (50%) com prolactinoma, como visto na tabela 4.

Quanto aos índices de Ki-67 houve uma distribuição muito homogênea nos diferentes diagnósticos. Todavia, a mediana do Ki-67 foi de 0,8% em acromegalia e 0,4% em ACNF, mas sem alcançar significância estatística (TABELA5).

Em relação ao tamanho dos adenomas hipofisários com expressão para o Ki-67, 19 pacientes com macroadenomas e 16 com adenomas gigantes responderam pela grande maioria dos casos. Somente 2 eram microadenomas (TABELA 4). Dentre os gigantes, 8 (34,8%) de um total de 23 apresentaram um índice de Ki-67 >1%, o que foi observado em 6 (15,4%) de 39 macro e microadenomas. Somente quando avaliada a mediana do índice de Ki-67, os gigantes demonstraram mediana mais elevada que os demais, o que alcançou significância estatística (TABELA 5). A figura 5 ilustra paciente com ACNF gigante com índice de Ki-67 de 2,3%.

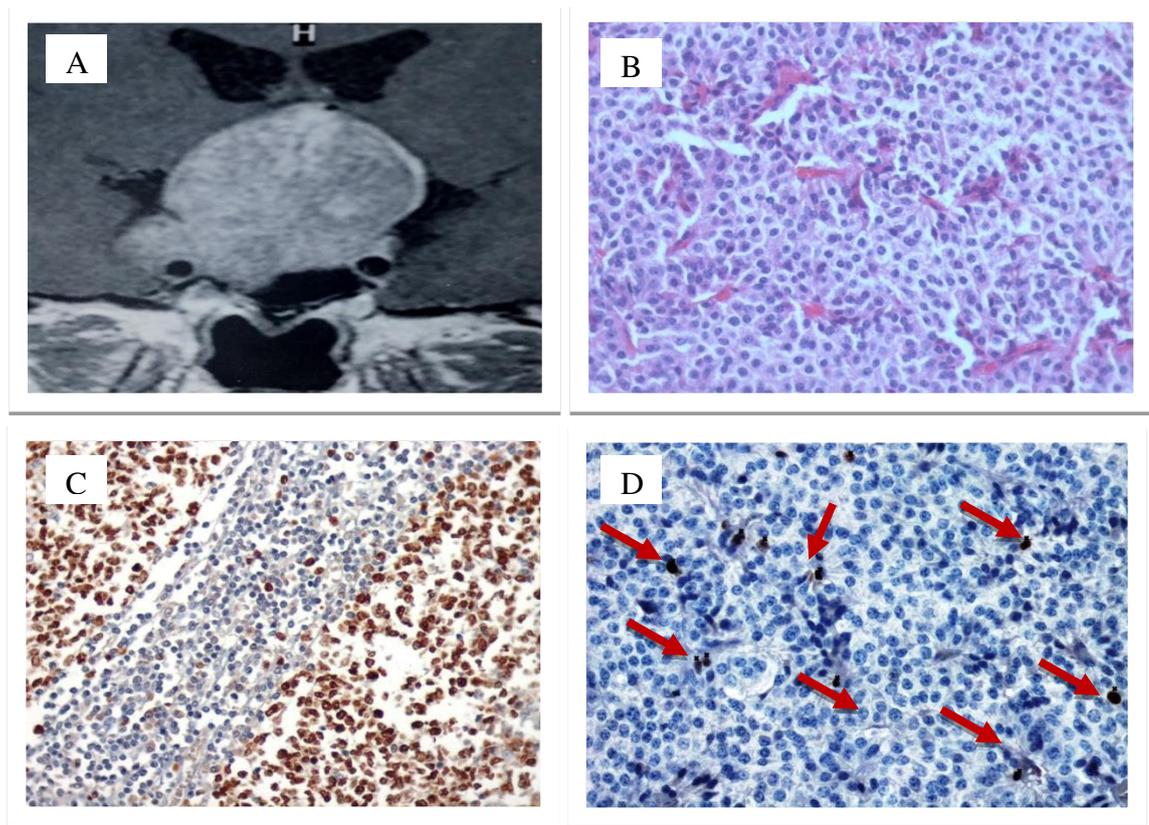


Figura 5. Feminino, 42 anos com Adenoma Gigante clinicamente não funcionante. A: Corte coronal de RNM em T1 com contraste: volumosa lesão expansiva selar, supraselar, com extensão para seio cavernoso a direita (Knosp3). B: corte histológico de adenoma hipofisário, padrão sólido, vascularização abundante (HE 400X). C: Amígdala controle positivo do Ki-67. D: positividade para Ki-67. Observar núcleos corados em marrom (setas) índice 2,3%. Fonte: ACERVO DOS AUTORES (2016).

Ao analisarmos a expressão do Ki-67 com relação ao pré-tratamento, obtivemos positividade do Ki-67 em 7 (43,7%) dos 16 pacientes sob uso de terapia medicamentosa. Naqueles não submetidos a essa terapia, 30 (65,2%) apresentaram tal positividade. Quanto aos índices de Ki-67 e sua mediana, os resultados foram muito semelhantes entre os pacientes submetidos e não submetidos à terapia medicamentosa prévia (TABELAS 4 e 5).

No que diz respeito ao critério invasão, a expressão do Ki-67 ocorreu em 7 (43, 8%) dos 16 adenomas invasivos e em 23 (67,6%) dos 34 não invasivos.

O índice de Ki-67 foi >1% em 2 (12,5%) de 16 invasivos e em 10 (29,4%) de 34 pacientes com adenomas não invasivos, com mediana de 0,3% e 0,6%, respectivamente (TABELAS 4 e 5).

Tabela 4. Relação entre a expressão de Ki-67 e as características clínicas de pacientes com adenoma hipofisário. São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	Índice Ki-67		Valor de p*
	Positivo f (%)	Negativo f (%)	
Diagnóstico			
ACNF	21 (65,6)	11 (34,4)	0,79
Somatotropinoma	12 (54,5)	10 (45,6)	
Corticotropinoma	3 (50,0)	3 (50,0)	
Prolactinoma	1 (50,0)	1 (50,0)	
Tamanho			
Microadenoma	2 (40,0)	3 (60,0)	0,38
Macroadenoma	19 (55,9)	15 (44,1)	
Adenoma Gigante	16 (69,6)	7 (30,4)	
Tamanho			
Gigante	16 (69,6)	7 (30,4)	0,22
Micro + macro	21 (53,8)	18 (46,2)	
Pré tratamento			
Não	30 (65,2)	16 (34,8)	0,13
Sim	7 (43,7)	9 (56,3)	
Invasão/ Knosp (graus)*			
Não (0 a 2)	23(67,6)	11(32,4)	0,19
Sim (3 a 4)	7 (43,8)	9 (56,2)	
TOTAL	37	25	

F Teste T de Student. *Kruskall Wallis. ** Dados disponíveis em 50 pacientes.

Tabela 5. Relação do Índice Ki-67 e sua mediana com características clínicas de pacientes com adenoma hipofisário. São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	Índice Ki 67 (%)			p*	Índice Ki-67	
	Negativo	0,01 a 1,0	≥ 1,01		Mediana (Min. – Max)	p*
Diagnóstico						
ACNF	11 (34,4)	15 (46,9)	6 (18,7)	0,65	0,4 (0,1-2,4)	0,85
Somatotropinoma	10 (45,4)	7 (31,8)	5 (22,8)		0,8 (0,2-2,1)	
Corticotropinoma	3 (50,0)	1 (16,7)	2 (33,3)		0,5 (0,1-2,4)	
Prolactinoma	1 (50,0)	0 (0,0)	1 (50,0)		1,2 (1,2-1,2)	
Tamanho						
Adenoma gigante	7 (30,4)	8 (34,8)	8 (34,8)	0,38	0,9 (0,2-2,4)	0,36
Macroadenoma	15 (44,1)	14 (41,2)	5 (14,7)		0,3 (0,1-2,4)	
Microadenoma	3 (60,0)	1 (20,0)	1 (20,0)		0,5 (0,5-0,6)	
Tamanho						
Adenoma gigante	7 (30,4)	8 (34,8)	8 (34,8)	0,62	0,9 (0,2-2,4)	0,04
Macro + micro	18 (46,1)	15 (38,5)	6 (15,4)		0,4 (0,1-2,4)	
Pré-tratamento						
Não	16 (34,8)	19 (41,3)	11 (23,8)	0,31	0,6 (0,1-2,4)	0,27
Sim	9 (56,2)	4 (25,0)	3 (18,8)		0,8 (0,2-2,4)	
Invasão/Knosp**						
Não (0 a 2)	11 (32,4)	13 (38,2)	1 (29,4)	0,22	0,6 (0,1-2,4)	0,31
Sim (3 e 4)	9 (56,2)	5 (31,3)	2 (12,5)		0,3 (0,2-2,3)	
TOTAL	25	23	14			

*Kruskall Wallis. †ANOVA. **Dados disponíveis em 50 pacientes

5.4 População de Pacientes Portadores de Adenomas Hipofisários Somatotróficos

Foram avaliados 22 pacientes com somatotropinomas, sendo 12 (54,5%) do sexo feminino e com a média de idade à cirurgia de 42,1±9,8 anos, variando de 17 a 66 anos.

O antígeno Ki-67 foi expresso em 12 (54,5%) pacientes e de forma homogênea quanto ao sexo e faixa etária, variando o seu índice de 0,2% a 2,1% (TABELAS 6 e 7). Índices de Ki-67 >1% foram observados em 5 (22,7%) pacientes (TABELA 8).

Houve predominância de macroadenomas, que ocorreram em 14 (63,7%) pacientes; adenomas gigantes foram encontrados em 5 (22,7%), enquanto microadenomas foram observados em 3 (13,6%) pacientes (TABELA 6).

Dentre os adenomas gigantes, 4 (80%) demonstraram expressão para o Ki-67, que esteve presente em 7 (50%) dos macroadenomas e em apenas 1(33,3%) dos microadenomas (TABELA 7).

Invasão foi documentada em 6 (30%) dos pacientes com somatotropinomas e a expressão do Ki-67 ocorreu de forma homogênea entre os adenomas invasivos e não invasivos (TABELAS 6 e 7).

Terapia medicamentosa prévia foi utilizada por 10 (45,5%) dos pacientes com somatotropinomas e entre aqueles não submetidos a essa terapia houve expressão de Ki-67 em 75% dos casos, ou seja, em 9 dos 12 pacientes; já nos submetidos, apenas 3 (30%) apresentaram expressão, o que alcançou significância estatística (TABELAS 6 e 7).

Índices de Ki-67 mais elevados, ou seja, >1%, estiveram presentes, exclusivamente no sexo feminino, alcançando significância estatística. Ocorreram em 2 (40%) dos adenomas gigantes, em 3 (21,4%) dos macroadenomas e em nenhum microadenoma. Ainda, em apenas em 1 (16,7%) dos adenomas invasivos, enquanto em 4 (28,6%) dos não invasivos (TABELA 8). Em pacientes não submetidos à farmacoterapia prévia, índices de Ki-67 >1% ocorreram em 4 (33,3%) casos, o que foi visto em apenas 1 (10%) dos pacientes sob terapia prévia, sem alcançar um valor significativo, com valor de $p=0,10$ (TABELA 8).

Tabela 6. Caracterização demográfica e do tumor de 22 pacientes com adenoma hipofisário tipo somatotropinoma. São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	N	%
Sexo		
Feminino	12	54,5
Masculino	10	45,5
Idade (anos)		
Até 30	2	9,1
Entre 31 e 40	8	36,4
Entre 41 e 49	7	31,8
Entre 50 e 59	4	18,2
60 ou mais	1	4,5
Variação	42,13±9,8	17-66
Índice KI-67		
Negativo	10	45,5
0,01 a 1,00	7	31,8
1,01 ou mais	5	22,7
Tamanho		
Microadenoma	3	13,6
Macroadenoma	14	63,7
Adenoma Gigante	5	22,7
Pré Tratamento		
Sim	10	45,5
Não	12	54,5
Invasão / Knosp (grau)*		
Sim (3 e 4)	6	30,0
Não (0 a 2)	14	70,0
TOTAL	22	100,00

*Dados disponíveis em 20 pacientes.

Tabela 7. Relação entre a expressão do Ki-67 e características demográficas de 22 pacientes com adenoma hipofisário tipo somatotropinoma. São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	Índice KI-67		Valor de p
	Positivo %	Negativo %	
Sexo			
Feminino	6 (50,0)	6 (50,0)	0,64
Masculino	6 (60,0)	4 (40,0)	
Idade (anos)			
Até 30	1 (50,0)	1 (50,0)	0,71
Entre 31 e 40	4 (50,0)	4 (50,0)	
Entre 41 e 49	5 (71,4)	2 (28,6)	
Entre 50 e 59	2 (50,0)	2 (50,0)	
60 ou mais	0 (0,0)	1 (100,0)	
$\bar{X} \pm dp$	42,4±6,4	41,8±13,2	0,44
Tamanho			
Microadenoma	1 (33,3)	2 (66,7)	0,37
Macroadenoma	7 (50,0)	7 (50,0)	
Adenoma Gigante	4 (80,0)	1 (20,0)	
Pré Tratamento			
Não	9 (75,0)	3 (25,0)	0,03
Sim	3 (30,0)	7 (70,0)	
Invasividade/Knosp*			
Não (Grau 0 a 2)	9 (64,3)	5 (35,1)	0,55
Sim (Graus 3 e 4)	3 (50,0)	3 (50,0)	
TOTAL	12 (54,5)	10 (45,5)	

F Teste T de Student. *Dados disponíveis em 20 pacientes.

Tabela 8. Relação entre o Índice Ki-67 e características demográficas e clínicas de 22 pacientes com adenoma hipofisário tipo somatotropinoma São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	Índice Ki-67 (%)			Valor de p
	Negativo	0,01 a 1,0	1,01 ou mais	
Sexo				
Feminino	6 (50,0)	1 (8,3)	5 (41,7)	0,01
Masculino	4 (40,0)	6 (60,0)	0(0,0)	
Idade (anos)				
Até 30	1 (50,0)	1(50,0)	0(0,0)	0,67
Entre 31 e 40	4 (50,0)	3(37,5)	1 (12,5)	
Entre 41 e 49	2 (28,6)	3(42,8)	2 (28,6)	
Entre 50 e 59	2 (50,0)	0(0,0)	2 (50,0)	
60 ou mais	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
$\bar{X} \pm dp$	41,8013,2	39,5±6,1	46,4±4,8	0,51
Tamanho/Morfometria				
Microadenoma	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (00,0)	0,63
Macroadenoma	7 (50,0)	4 (28,6)	3 (21,4)	
Adenoma Gigante	1 (20,0)	2(40,0)	2 (40,0)	
Pré Tratamento				
Sim	7 (70,0)	2 (20,0)	1 (10,0)	0,10
Não	3 (25,0)	5 (41,7)	4 (33,3)	
Invasão/ Knosp*				
Sim (3 e 4)	3 (50,0)	2 (33,3)	1 (16,7)	0,79
Não (0 a 2)	5 (35,7)	5(35,7)	4 (28,6)	
TOTAL	10 (45,5)	7 (31,8)	5 (22,7)	

¥ ANOVA. * Dados disponíveis em 20 pacientes.

6 DISCUSSÃO

Adenomas hipofisários são neoplasias comuns, com uma prevalência de 1 caso para 1000 habitantes (DALY et al., 2006; FERNANDEZ, KARAVITAKI, WASS, 2010). Apesar de uma maioria apresentar-se como benigno e de crescimento muito lento, não obstante, demonstram um amplo espectro de comportamento clínico, alguns com rápida expansão e recorrência após cirurgia (CHACKO et al., 2010).

O manejo das neoplasias hipofisárias pode ser difícil e, pelo fato de não haver um preditor de seu comportamento, a pronta instituição de uma terapia, de forma mais precoce ou multimodal pode não ocorrer (SALEHI et al., 2009; DI LEVA et al., 2014).

Um relevante estudo de revisão demonstra que a expressão do antígeno Ki-67 pode estar envolvida na patogenicidade e agressividade desses tumores, sendo esse parâmetro utilizado como preditor de progressão e recorrência (SALEHI et al., 2009).

No presente estudo, fez-se a correlação do antígeno Ki-67 com aspectos demográficos e vários parâmetros clínicos dos pacientes com adenomas hipofisários.

Na análise da nossa série, obtivemos uma expressão de Ki-67 muito semelhante entre os sexos, porém, os índices de Ki-67 acima de 1% predominaram no feminino, que também apresentou uma mediana mais elevada e tais achados alcançaram significância estatística.

Os dados prévios da literatura são divergentes quanto à relação entre Ki-67 e sexo. A maioria dos trabalhos não conseguiu demonstrar qualquer predominância em homens ou mulheres com respeito a esse marcador de proliferação (SALEHI et al., 2009; DE AGUIAR et al., 2010). Outros trabalhos encontraram índices de Ki-67 mais elevados no sexo masculino em adenomas hipofisários (PAEK et al., 2005; QIAN et al., 2002) e, notadamente, em grandes prolactinomas (DELGRANGE et al., 1997).

Por outro lado, uma predominância de índices de Ki-67 mais elevados no sexo feminino foi um achado único de WOLFSBERGER et al (2004), o que está de acordo com os nossos resultados.

O fato que prolactinomas podem apresentar-se com índices mais elevados no sexo masculino como demonstrado por DELGRANGE et al. (1997) e que os mesmos foram sub-representados em nossa série, com 2 (3,2%) dos casos, pode justificar nossos achados.

A expressão do Ki-67 nesse estudo foi discretamente predominante em pacientes com idade em torno de 40 a 60 anos de idade, o mesmo ocorrendo quando da avaliação da distribuição por índice de Ki-67 e sua mediana, porém, sem haver significância estatística. Tal

achado é corroborado por outros autores (ABE et al., 1997; MASTRONARDI, GUIDUCCI E PUZZILLI, 2001; PIZARRO et al., 2004; SUZUKI et al., 2006; CHACKO et al., 2010).

A maioria dos estudos demonstra uma relação inversa entre a idade e o índice de Ki-67 em adenomas hipofisários (JAFFRAIN-REA, 2002; TANAKA, 2003). Índice mais elevado de Ki-67 em pacientes mais jovens, abaixo dos 30 anos, quando comparado àqueles acima de 40 anos foi um achado de Yonezawa et al.(1997).

De fato, embora tenha sido encontrada predominância de índices de Ki-67 mais elevados em pacientes com idade abaixo de 60 anos, o pequeno número de pacientes nos extremos das faixas etárias avaliadas, sobretudo em pacientes jovens com menos de 30 anos, impossibilitou uma análise adequada dessa variável em nosso estudo.

Com respeito à funcionalidade tumoral, nossos achados demonstraram um predomínio discreto da expressão de Ki-67 em adenomas não-funcionantes, porém com mediana mais baixa em relação aos funcionantes, sejam estes analisados como grupo, sejam analisados isoladamente. Entretanto, esses dados não alcançaram significância estatística.

Diversos estudos encontraram uma correlação entre Ki-67 e status funcional, porém os achados não foram uniformes (SALEHI et al., 2009; DE AGUIAR et al., 2010). Muitos autores demonstraram índices significativamente mais altos em adenomas funcionantes (LANDOLT, SHIBATA, KLEIHUES, 1987; THAPAR et al., 1996; WOLFSBERGER et al., 2004; SCHEITHAUER et al., 2006). Por outro lado, índices de Ki-67 mais elevados em não funcionantes também foram descritos (SUZUKI et al., 2006). Nenhuma correlação ocorreu entre essas variáveis em outros estudos (SULIMAN et al., 2001; PIZARRO et al., 2004; PAEK et al., 2005).

Dentre os fatores que podem obscurecer os achados quanto ao status funcional, destaca-se o uso de fármacos previamente à cirurgia. Assim, em Jaffrain-Rea et al. (2002), somente quando tumores funcionantes não submetidos à farmacoterapia foram analisados isoladamente, uma diferença significativamente estatística foi observada em relação aos não funcionantes.

Visto que cerca de 1/3 dos pacientes de nossa amostragem de adenomas funcionantes utilizaram medicações dirigidas a esses tumores, enquanto esse uso foi irrisório em não funcionantes, não é possível descartar que nossos resultados possam ter sido influenciados por tal característica de nossa série de pacientes.

Revisões recentes da literatura consideram que a relação entre o tamanho tumoral e o índice de Ki-67 não é clara e que os subtipos tumorais devem analisados conjuntamente para uma correta interpretação dos resultados (SALEHI et al., 2009; DE AGUIAR et al., 2010).

Os achados relacionados ao tamanho dos adenomas hipofisários nesse estudo demonstram uma tendência para um índice de Ki-67 mais elevado em adenomas gigantes em contraposição a macro e microadenomas, porém sem alcançar significância estatística. Por outro lado, a mediana dos índices de Ki-67 foi mais alta nos gigantes e esse achado foi estatisticamente significativo.

O tamanho tumoral não é, necessariamente, um preditor de curso clínico nos adenomas. Embora pareça intuitivo que tumores com índices elevados cresçam mais rapidamente, quando as diferentes séries com adenomas gigantes são analisadas, os índices de Ki-67 são, de uma forma geral, baixos. Esse achado, no entanto, parece estar mais relacionado a um diagnóstico tardio, em decorrência da escassez de sintomatologia observada em alguns casos (CHACKO et al., 2009; SALEHI et al., 2009; CHACKO et al., 2010).

Embora o tamanho do tumor quando do momento diagnóstico possa não ser indicativo de agressividade e responder favoravelmente a abordagens terapêuticas diversas, essa associação pode sugerir um potencial para progressão ou recorrência e a necessidade de observação mais rigorosa.

A expressão do Ki-67, no presente estudo, não guardou qualquer relação com a invasão tumoral dos seios cavernosos. O índice de Ki-67 distribuiu-se de forma homogênea, seja nos tumores intrasselares grau 0 de Knosp, seja nos francamente invasivos.

Os achados da literatura são totalmente inconsistentes quanto à relação do Ki-67 e invasão tumoral. Parte dessa divergência está relacionada aos diferentes critérios para definir essa variável nos diversos estudos. Alguns autores consideraram a infiltração dural, enquanto outros, a imagem pré-operatória ou ainda, os achados intra-operatórios como critérios de invasão (SALEHI et al., 2009).

Adicionalmente, os sistemas classificatórios de invasão dos seios cavernosos utilizam imagens radiológicas que não são capazes de discernir a expansão do tumor através de deficiências da parede medial dos seios cavernosos, de uma verdadeira invasão tumoral (YOKOYAMA et al, 2001; MICKO et al, 2015). Essa limitação poderia justificar nossos achados, visto que estudos mais recentes com protocolos mais uniformes de critérios de invasão apontam para uma relação significativa entre invasão tumoral e maiores expressão e índice do antígeno Ki-67 (CHACKO et al., 2010; SARKAR, CHACKO, CHACKO, 2015).

O uso de terapia farmacológica prévia à abordagem cirúrgica dos adenomas hipofisários pode levar a uma redução da expressão e dos índices do antígeno Ki-67 e esse dado é observado especialmente em prolactinomas e somatotropinomas sob agonistas

dopaminérgicos e análogos da somatostatina, respectivamente, quando comparados com ACNF não tratados (LOSA et al., 2001; JAFFRAIN-REA et al., 2002).

No estudo atual, uma menor expressão do Ki-67 esteve presente nos pacientes submetidos à farmacoterapia prévia à cirurgia, embora sem atingir significância estatística. Mais provavelmente, a ausência de significância se deu em decorrência do pequeno número de pacientes sob terapia farmacológica, ao fato de que alguns pacientes com ACNF a utilizaram e ainda, do número exíguo de prolactinomas em nosso estudo.

Quando da análise isolada dos somatotropinomas, nos quais, quase metade dos pacientes fez uso de análogos da somatostatina e agonistas dopaminérgicos de forma isolada ou combinada, a expressão do antígeno Ki-67 esteve francamente mais presente ($p=0,03$) nos pacientes que utilizaram a cirurgia como terapia primária; esse dado é concordante com os achados que predominam na literatura (JAFFRAIN-REA et al., 2002).

7 CONCLUSÃO

Os índices de Ki-67 relativamente baixos encontrados nessa série de pacientes confirma que esses tumores, em geral, têm uma baixa razão de proliferação. Apesar disso, um número significativo de adenomas hipofisários apresentou grandes dimensões e invasão dos seios cavernosos.

Índices de Ki-67 menores ou ausência de sua expressão em pacientes com adenomas hipofisários e, em particular, com somatotropinomas que fizeram uso de farmacoterapia prévia, sugerem um potencial antiproliferativo e, portanto, efetividade terapêutica das drogas utilizadas.

O antígeno Ki-67 tem papel relevante em adenomas hipofisários. Em conjunto com outros biomarcadores como verdadeira invasão tumoral, grande volume do adenoma à apresentação inicial dos pacientes, documentação de rápida velocidade de crescimento do tumor e, ainda, a imunexpressão para P53 e AIP, pode conduzir a uma abordagem terapêutica multimodal mais efetiva ou a um seguimento pós-operatório mais rigoroso.

REFERÊNCIAS

- ABE, T. et al. Proliferative potential in pituitary adenomas: measurement by monoclonal antibody MIB-1. **Acta Neurochir (Wien)**, v.139, p: 613-18,1997.
- AFLOREI, E.D.; KORBONITS, M. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. **J Neurooncol**,v.117, p. 379-94, 2014.
- AL-BRAHIM, N.Y.; ASA, S.L. My approach to pathology of the pituitary gland. **J Clin.Pathol.**, v.59, n.12, p:1245-53, 2006.
- ALEXANDER, J.M. et al. Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. **J Clin Invest.**, v.86, n.1, p:336-40, 1990.
- ASA, S.L. Practical pituitary pathology: what does the pathologist need to know? **Arch Pathol Lab Med.**, v.132, n.8, p:1231-40, 2008.
- ASA, S.L. The normal pituitary gland. In: ASA, S.L. **AFIP atlas of tumor pathology**. Fourth series.Fascicle 15.Tumors of the Pituitary Gland.Washington:ARP Press AFIP. p. 1-54,2011.
- ASA, S.L. Pituitary adenomas. In: ASA, S.L. **AFIP atlas of tumor pathology**. Fourth series.Fascicle 15.Tumors of the Pituitary Gland. Washington:ARP Press AFIP. p. 55-172, 2011.
- ASA, S.L.; EZZAT, S. Aggressive Pituitary Tumors or Localized Pituitary Carcinomas: Defining Pituitary Tumors. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**, v.11, n.2, p:149-162, 2016.
- ASA, S. L.;KOVACS, K. Functional morphology of the human fetal pituitary.**Pathol Annu.**19 Pt 1:275-315, 1984.
- BLANK, A. et al. Interlaboratory variability of MIB1 staining in well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors.**Virchows Arch**. v.467, n.5, p:543-50, 2015.
- CHACKO, G.et al.Clinicopathologic correlates of giant pituitary adenomas.**J Clin.Neurosci.**, v.16, p:660-5, 2009.
- CHACKO, G. et al. The clinical significance of MIB-1 labeling index in pituitary adenomas. **Pituitary**., v.13, n.4, p:337-44, 2010.
- CHATZELLIS, E. et al. Aggressive pituitary tumors. **Neuroendocrinology**., v.101, n.2, p:87-104, 2015.
- CHILOIRO, S. et al.Radically resected pituitary adenomas: prognostic role of Ki 67 labeling index in a monocentric retrospective series and literature review.**Pituitary**., v.17, n.3, p:267-76, 2014.

CUSIMANO, M. D. Outcomes of surgically treated giant pituitary tumours. **Can J NeurolSci.**, v.39, n.4, p:446-57, 2012.

DALY, A.F. et al. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. **J Clin.Endocrinol.Metab.**, v.9, n.12, p:4769-75,2006.

DE AGUIAR, P.H. et al., Labeling index in pituitary adenomas evaluated by means of MIB-1: is there a prognostic role? A critical review. **Neurol Res.** ,v.32, n.10, p: 1960-71, 2010.

DELGRANGE, E. et al. Sex-related difference in the growth of prolactinomas: a clinical and proliferation marker study. **J Clin. Endocrinol. Metab.**, v.82, p: 2102-07, 1997.

DI LEVA, A. et al. Aggressive pituitary adenomas--diagnosis and emerging treatments. **Nat Rev Endocrinol.**v.10, p: 423-35, 2014.

DUBOIS,S. et al. Relevance of Ki-67 and prognostic factors for recurrence/progression of gonadotropic adenomas after first surgery. **Eur J Endocrinol.**, v.157, n.2, p:141-7, 2007.

EZZAT, S. et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review.**Cancer.**v.101, n.3, p:613-9, 2004.

FERNANDEZ, A.;KARAVITAKI, N.; WASS, J.A. Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). **Clin.Endocrinol. (Oxf)**., v.72, n.3, p:377-82, 2010.

FINK, G. et al. Neural control of the anterior lobe of the pituitary gland (pars distalis) In: **Handbook of Neuroendocrinology.** FINK, G; PFAFF, D; LEVINE, J. eds. 1st. ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.p 97-137.

GEJMAN, R.;SWEARINGEN, B.; HEDLEY-WHYTE, E.T. Role of Ki-67 proliferation index and p53 expression in predicting progression of pituitary adenomas. **Hum Pathol.** v.39, n.5, p:758-66, 2008.

GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67. **J.Immunol.**, Baltimore, v.133, p.1710-1715, 1984.

GERDES, J. et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67.**Am J Pathol.**, v.138, n.4, p:867-73,1991.

GOLD, E.B.Epidemiology of pituitary adenomas. **Epidemiol Rev.**, v.3, p:163-83, 1981.

HE, W. et al. Metastatic involvement of the pituitary gland: a systematic review with pooled individual patient data analysis. **Pituitary**, v.18, n.1, p: 159-168, 2015.

HEANEY, A.Management of aggressive pituitary adenomas and pituitary carcinomas. **J Neurooncol**, v.117, n.3, p:459-68, 2014.

HEIDEBRECHT, H.J. et al. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the “Ki-67” proteins. **Cell Prolif.**, Oxford, v.29, p.413-425, 1996.

HENTSCHEL, S.J. et al. P53 and MIB-1 immunohistochemistry as predictors of the clinical behavior of nonfunctioning pituitary adenomas. **Can J Neurol Sci.**, v.30, n.3, p:215-9, 2003.

HERMAN, V. et al. Clonal origin of pituitary adenomas. **J Clin Endocrinol Metab.** v.71, n.6, p:1427-33, 1990.

HSU, D.W. et al. Significance of proliferating cell nuclear antigen index in predicting pituitary adenoma recurrence. **J Neurosurg.**, v.78, n.5, p:753-61, 1993.

JAFFRAIN-REA, M.L. et al. A critical reappraisal of MIB-1 labelling index significance in a large series of pituitary tumours: secreting versus non secreting adenomas. **Endocr Relat Cancer.**, v. 9, p:103-13, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.57 , 2013.

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, 1993.

KONTOGEORGOS, G. Predictive markers of pituitary adenoma behavior. **Neuroendocrinology.**, v.83, n3-4, p:179-88, 2006.

KOVACS, K.; HORVATH, E. Pathology of growth hormone-producing tumors of the human pituitary. **Semin.Diagn.Pathol.**, v.3, n.1, p:18-33, 1986.

KOVACS, K. et al. Letter to the editor. **Endocr.Pathol.**, v.26, n.1, p:93-4, 2015.

LANDOLT, A. M.; SHIBATA, T.; KLEIHUES, P. Growth rate of human pituitary adenomas. **J Neurosurg.**, v. 67, p:803-06, 1987.

LI, L.T. et al. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). **Mol Med Rep.**, v.11, n.3, p:1566-72, 2015.

LLOYD, R. V. et al. Pituitary tumors: Introduction. In: DELELLIS, R. A. et al. World Health Organization Classification of Tumors. **Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs**. 1st ed. Lyon: IARC Press, 2004. p. 10-13.

LOSA, M. et al. Effects of octreotide treatment on the proliferation and apoptotic index of GH-secreting pituitary adenomas. **J Clin.Endocrinol.Metab.**, v.86, n.11, p: 5194-5200, 2001.

MASTRONARDI, L.; GUIDUCCI, A.; PUZZILLI, F. Lack of correlation between Ki-67 labelling index and tumor size of anterior pituitary adenomas. **BMC Cancer.**, v.1, p: 12, 2001.

MATSUYAMA, J. Ki-67 expression for predicting progression of postoperative residual pituitary adenomas: correlations with clinical variables. **Neurol Med Chir.**(Tokyo), v.52, n.8, p:563-9, 2012.

MAYSON, S.E.; SNYDER, P.J. Silent pituitary adenomas. **Endocrinol.Metab.Clin. North Am.**, v.44, n.1, p:79-87, 2015.

MEIJ, B.P. et al. The long-term significance of microscopic dural invasion in 354 patients with pituitary adenomas treated with transsphenoidal surgery. **J.Neurosurg.**, v.96, n.2, p:195-208, 2002.

METE, O.;ASA, S.L. Clinicopathological correlations in pituitary adenomas. **Brain Pathol.**, v.22, n.4, p:443-53, 2012.

MICKO, A. S. G. 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, p:803–811, 2015.

NASCIMENTO, A. G. P.; FARIA M.F. **Relevância prognóstica da expressão imuno-histoquímica dos receptores Ki-67 em adenomas hipofisários.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Maranhão – UFMA. São Luis, 2016.

NISHIOKA, H; HARAOKA, J; AKADA K. Fibrous bodies are associated with lower GH production and decreased expression of E-cadherin in GH-producing pituitary adenomas. **Clin Endocrinol (Oxf)**., v.59, n.6, p:768-72, 2003.

PAEK, K.I.et al. Clinical significance of Ki-67 labeling index in pituitary macroadenoma. **J Korean Med Sci.**, v.20, n.3,p:489-94, 2005.

PIZARRO, C.B. et al. Measurement of Ki-67 antigen in 159 pituitary adenomas using the MIB-1 monoclonal antibody. **Braz J Med Biol Res.**, v.37, p:235-43, 2004.

QIAN, Z.R. et al. Role of E-cadherin, alpha-, beta-, and gamma-catenins, and p120 (cell adhesion molecules) in prolactinoma behavior. **Mod Pathol.**, v.15, p: 1357-65, 2002.

RAMÍREZ C et al. Expression of Ki-67, PTTG1, FGFR4, and SSTR 2, 3, and 5 in nonfunctioning pituitary adenomas: a high throughput TMA, immuno-histochemical study. **J. Clin. Endocrinol.Metab.**, v. 97, n.5, p:1745-51, 2012.

RIGHI, A. et al. A classification tree approach for pituitary adenomas. **Hum Pathol.**,v.43, n.10, p:1627-37, 2012.

SAEGER, W. et al. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. **Eur J Endocrinol.**, v.156, n.2, p:203-216, 2007.

SAEGER, W. et al. Clinical Impact of the Current WHO Classification of Pituitary Adenomas. **Endocr. Pathol.**, v.27, n.2, p:104-14, 2016.

SALEHI, F. et al. Ki-67 in pituitary neoplasms: a review-part I. **Neurosurgery.**, v.65, n.3, p:429-37, 2009.

SALEHI, F. et al. Biomarkers of pituitary neoplasms: a review (Part II). **Neurosurgery.**, v.67, n.6, p:1790-8, 2010.

SARKAR, S.; CHACKO, A.; CHACKO, G. Clinicopathological correlates of extrasellar growth patterns in pituitary adenomas. **Journal of Clinical Neuroscience.**, v.22, p: 1173-77, 2015.

SAV, A. et al. Invasive, Atypical and Aggressive Pituitary Adenomas and Carcinomas. **Endocrinol.Metab.Clin. North Am.**, v.44, n.1, p:99-101, 2015.

SCHEITHAUER, B.W. et al. Tumors of the adenohypophysis. In: Histological typing of endocrine tumors, SOLCIA E. et al. eds., 2^{ed}. Geneva: Springer, 2000.p. 15-28.

SCHEITHAUER, B.W. et al. Pituitary Carcinoma. In: DELELLIS, R. A. et al. World Health Organization Classification of Tumors. **Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs.** 1^{ed}. Lyon: IARC Press, 2004. p. 36–39.

SCHEITHAUER, B.W. et al. Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas. **Neurosurgery.**, v.59, p: 341–53, 2006.

SCHLÜTER, C. et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. **J Cell Biol.**, v.123, n.3, p:513-22, 1993.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J. Cell Physiol.**, New York, v.182, p.311-322, 2000.

SULIMAN, M. et al. Mdm2 and the P53 pathway in human pituitary adenomas. **Clin.Endocrinol (Oxf).**,v.54, p:317-25, 2001.

SUZUKI, M. et al. Expression of proliferation markers in human pituitary incidentalomas. **Endocr.Pathol.**, v.17, p: 263-75, 2006.

TANAKA, Y. et al. Growth pattern and rate in residual nonfunctioning pituitary adenomas and carcinomas: correlations among tumor volume doubling time, patient age, and MIB-1 index. **J Neurosurg.**, v.98, p:359-65, 2003.

THAPAR, K. et al. Assessment of Mitotic Activity in Pituitary Adenomas and Carcinomas. **Endocr. Pathol.**, v.7, n.3, p: 215-221, 1996.

TROUILLAS, J. In search of a prognostic classification of endocrine pituitary tumors. **Endocr. Pathol.** , v.25, n.2, p:124-32, 2014.

VAN DIERENDONCK, J.H. et al. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. **Cancer Res.** v.49, p: 2999-3006, 1989.

VAN OIJEN, M.G. et al. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. **Am. J. Clin. Pathol.**,v.110, p: 24-31, 1998.

WOLFSBERGER, S. et al.Expression of cell proliferation markers in pituitary adenomas--correlation and clinical relevance of MIB-1 and anti-topoisomerase-IIalpha .**ActaNeurochir (Wien)**., v.146, n.8, p:831-9, 2004.

YAMADA, S. et al. A study of the correlation between morphological findings and biological activities in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. **Neurosurgery**., v.61, n.3, p:580-4, 2007.

YOKOYAMA, S. et al. Are non-functioning pituitary adenomas extending into the cavernous sinus aggressive and/or invasive? **Neurosurgery**., v.49, p:857-863, 2001.

YONEZAWA, K.; TAMAKI, N.; KOKUNAI, T. Clinical features and growth fractions of pituitary adenomas. **Surg Neurol.**, v.48, n.5, p:494-500,1997.

ZADA, G. et al. Atypical pituitary adenomas: incidence, clinical characteristics, and implications. **J.Neurosurg.**, v.114, n.2, p:336-44, 2011.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
TITULO DA PESQUISA: EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS
RECEPTORES KI-67 EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS

NOME DA PESQUISADORA: Ana Gisélia Portela de Araújo Cortês Nascimento

NOME DO ORIENTADOR: Dr. Manuel dos Santos Faria

1. Natureza da Pesquisa: O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar deste trabalho de pesquisa com a finalidade de analisar a presença de uma proteína chamada ki-67, que é um marcador de crescimento de tumores, por meio de um método chamado imuno-histoquímica. Essa proteína será estudada nos adenomas (tumores) de hipófise, visando identificar a sua ocorrência nesses tumores. O ki-67 é importante porque, dependendo da sua presença, pode-se entender melhor como esse tumor cresce e o seu tratamento. Este estudo será feito no material do tumor que foi obtido quando o Sr (a) foi operado e que se encontra arquivado no setor de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Presidente Dutra – HUUFMA.

2. Envolvimento na pesquisa: O senhor (a) tem liberdade de se recusar a participar do estudo e caso aceite participar, mesmo assim, o (a) senhor (a) poderá se recusar em qualquer momento da pesquisa, sem qualquer prejuízo ao seu tratamento ou às suas consultas. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de ética do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – HUUFMA (98 2109 1250).

3. Confidencialidade: Os seus dados serão coletados de forma anônima e confidencial, isto é, em nenhum momento será divulgado o seu nome em qualquer fase do estudo. Os seus dados serão coletados através da consulta do seu prontuário, dos seus exames já realizados no decorrer do seu acompanhamento neste serviço. Seus dados serão mantidos em segredo durante toda a pesquisa.

4. Riscos: Este estudo oferece para o Sr (a) riscos mínimos, indiretos relacionados as dimensões psíquica, moral, que serão minimizados com a garantia da confiabilidade e sigilo dos seus dados., pois se trata de material que já foi coletado para o diagnóstico do seu tumor e que

se encontra arquivado no setor de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Presidente Dutra – HUUFMA.

5. Benefícios: Esperamos que este estudo possa contribuir com o conhecimento sobre a proteína ki-67 e sua associação com tumores de hipófise. O estudo é importante, porque pode contribuir para o emprego mais precoce de tratamentos mais eficazes para o controle de sua doença. Assim, outros pacientes poderão ser beneficiados por um tratamento mais eficiente, a partir dos resultados dessa pesquisa.

6. Pagamento: O senhor (a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

7. Ressarcimentos: Não haverá despesas adicionais ao paciente ou a pesquisa quanto ao transporte, alimentação e outras necessidades do estudo, bem como outras despesas relacionadas à necessidade do acompanhante, pois todos os dados necessários para o estudo serão coletados nas consultas ao seu prontuário.

8. Indenizações: A participação nesta pesquisa não gera ônus ou bônus ao paciente e ao acompanhante. Não gera nenhuma espécie de indenização. Todo atendimento ao paciente terá seguimento ao seu retorno nas consultas ambulatoriais com assistência integral e gratuita para quaisquer necessidades advindas do paciente e de seu acompanhante.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Você deverá assinar este documento, em duas vias, na qual em seguida será rubricada em todas as suas páginas. Uma das vias ficará com você e a outra via permanecerá com o pesquisador responsável. Portanto preencha, por favor, os itens que seguem:

Confirmo que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Nota: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito do mesmo.

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você poderá procurar o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA). O Comitê de Ética em Pesquisa é composto por um grupo de diferentes profissionais e membros da sociedade que avaliam um estudo para julgar se ele é ético e atende às exigências da Resolução Nº 466 de 12 de dezembro de 2012 para garantir a proteção dos participantes. O

endereço do CEP do HUUFMA é Rua Barão de Itapary, 227, 4º andar, Centro, São Luís-MA, CEP: 65020-070, tel: (98) 2109-1250 E-mail: cep@huufma.br

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

São Luís, ____/____/____

Assinatura do Participante ou Responsável

Responsável pela pesquisa: Dr. Manuel dos Santos Faria
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
Rua Barão de Itapary, 227, Centro. Tel: (98) 2109-1095

Pesquisador: Ana Gisélia Portela de Araújo Cortês Nascimento
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
Rua Barão de Itapary, 227, Centro
Cel: (98) 98112 0979 E-mail: ana.giselia@globocom.com

Centro de Pesquisa Clínica (CEPEC)

Endereço: Rua Almirante Tamandaré, nº 01, Centro – São Luis/MA.

Fone: (98) 2109 1294

Comitê de Ética e Pesquisa (CEP)

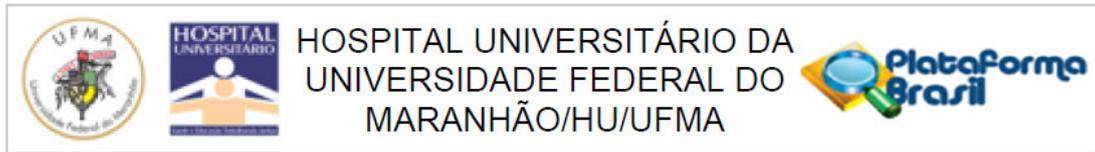
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

Rua Barão de Itapary, 227, 4º andar, Centro - São Luís-MA

CEP: 65020-070

Tel: (98) 2109-1250 / E-mail: cep@huufma.br

ANEXO A–PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES KI-67 EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS EM PACIENTES DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PRESIDENTE DUTRA (HUUFMA), SÃO LUIS - MA.

Pesquisador: Manuel dos Santos Faria

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 45704215.9.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.335.011

Apresentação do Projeto:

Adenomas hipofisários representam de 10 a 15% de todas as neoplasias intracranianas. Os tipos clinicamente funcionantes, que determinam clínica decorrente da hipersecreção hormonal, são os ditos: somatotropinomas, prolactinomas, corticotropinomas e TSHomas; os mais frequentes são os dois primeiros. Será realizado um estudo analítico do tipo prospectivo e retrospectivo para avaliar o índice do marcador imunohistoquímico de proliferação celular, antígeno Ki-67 em adenomas hipofisários. Estudos mostram que a expressão do antígeno Ki-67 pode estar envolvida na patogenicidade e agressividade desses tumores. Assim, a importância deste estudo é contribuir com o conhecimento sobre a ação dos marcadores biológicos imuno- histoquímicos em adenomas hipofisários, com ênfase na avaliação da expressão do antígeno Ki-67, visando identificar preditores para a progressão e/ou recorrência destes tumores endócrinos. Serão utilizados tecidos de tumores hipofisários de pacientes oriundos do Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, respeitando-se todas as normas estabelecidas para pesquisas envolvendo seres humanos. Para avaliação funcional dos adenomas serão realizadas dosagens séricas de prolactina, TSH, T4livre, ACTH, cortisol, LH, FSH, estradiol (mulheres) e testosterona (homens), GH basal e Somatomedina C (IGF-1). e outras variáveis sanguíneas: hemograma, uréia, creatinina, ALT, AST, gama-GT, cálcio total, fósforo, sódio,

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

Fax: (98)2109-1223

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.335.011

potássio, albumina, glicemia em jejum e perfil lipídico. Para analisar a expressão do Ki-67, será realizada a técnica de imunohistoquímica utilizando-se o anticorpo primário monoclonal anti-humano para Ki-67 chamado MIB-1, expressada pela porcentagem de núcleos imunopositivos sob forma de índice de marcação de Ki-67. Este estudo contribuirá para identificação de pacientes com expressão elevada do antígeno Ki-67 que demonstrem um comportamento clínico agressivo, permitindo uma abordagem terapêutica mais precoce e adequada. Os resultados obtidos serão analisados utilizando os programas Sigma Stat v.2.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA) e SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, EUA), teste de simetria de Kolmogorov-Smirno, teste Kruskal-Wallis. Este projeto será subsidiado com os recursos do Fundo de Pesquisa do Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar a expressão e o índice do marcador de proliferação celular antígeno Ki-67 e sua relevância prognóstica em adenomas hipofisários.

Objetivo Secundário:

Avaliar o índice do antígeno Ki-67 em adenomas hipofisários funcionantes em seus distintos subtipos;
 Avaliar o índice do antígeno Ki-67 em adenomas hipofisários não- funcionantes;
 Correlacionar o antígeno Ki-67 com o comportamento biológico desses tumores;
 Correlacionar o antígeno Ki-67 com a resposta a terapia farmacológica, especificamente em somatotropinomas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

De acordo com os pesquisadores este estudo oferece riscos indiretos e mínimos ao paciente relacionados à possibilidade de danos a dimensão psíquica ou moral estando associada à confidencialidade dos dados. Os riscos serão minimizado com a garantia da confidencialidade e sigilo dos dados, que serão mantidos durante todo o estudo. Não serão divulgadas informações que possibilitem a identificação do paciente. O material biológico tumoral que será utilizado na pesquisa encontra-se armazenado em bloco de parafina, arquivado na Unidade de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Presidente Dutra – HUUFMA.

Benefícios:

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227
Bairro: CENTRO **CEP:** 65.020-070
UF: MA **Município:** SAO LUIS
Telefone: (98)2109-1250 **Fax:** (98)2109-1223 **E-mail:** cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.335.011

De acordo com os pesquisadores o benefício deste estudo é propiciar aos pacientes a informação para a condução mais apropriada de seu tratamento, considerando o comportamento clínico associada à com expressão elevada de Ki-67. O médico assistente poderá definir condutas mais específicas e individuais, dentre as diversas modalidades terapêuticas cabíveis (cirurgia, terapia medicamentosa e radioterapia).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo relevante pois busca analisar a expressão e o índice do marcador de proliferação celular antígeno Ki-67 e sua relevância prognóstica em adenomas hipofisários e poderá propiciar aos pacientes a informação para a condução mais apropriada de seu tratamento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo apresenta documentos referente aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Orçamento financeiro detalhado, Cronograma com etapas detalhada, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Autorização do Gestor responsável do local para a realização da coleta de dados e Projeto de Pesquisa Original na íntegra em PDF.

O protocolo apresenta ainda as declarações de anuência, declaração de responsabilidade financeira e termo de compromisso com a utilização dos dados resguardando o sigilo e a confidencialidade.

Recomendações:

Após o término da pesquisa o CEP-HUUFMA sugere que os resultados do estudo sejam devolvidos aos participantes da pesquisa ou a instituição que autorizou a coleta de dados de forma anonimizada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O PROTOCOLO atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS/MS nº 466/12 e suas complementares, sendo considerado APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa–CEP-HUUFMA, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº.466/2012 e Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227
Bairro: CENTRO **CEP:** 65.020-070
UF: MA **Município:** SAO LUIS
Telefone: (98)2109-1250 **Fax:** (98)2109-1223 **E-mail:** cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.335.011

Eventuais modificações ao protocolo devem ser inseridas à plataforma por meio de emendas de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_468164.pdf	10/11/2015 21:19:18		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	10/11/2015 13:14:49	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	CARTA.pdf	10/11/2015 13:07:24	Manuel dos Santos Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	10/11/2015 13:06:58	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	DRF.pdf	22/09/2015 16:35:33	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	Declaração de responsabilidade Finaceira corrigida.pdf	15/07/2015 10:27:23		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto - KI-67.pdf	08/05/2015 11:13:43		Aceito
Outros	Termo de Compromisso.jpg	11/04/2015 17:12:04		Aceito
Outros	Ficha Cadastral.jpg	11/04/2015 16:52:58		Aceito
Outros	Declaração de Anuência.jpg	11/04/2015 16:49:48		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao de vinculo na instituicao_2014103596.pdf	11/04/2015 16:45:20		Aceito
Parecer Anterior	Parecer Consubstanciado.jpg	11/04/2015 16:44:09		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227	CEP: 65.020-070
Bairro: CENTRO	
UF: MA	Município: SAO LUIS
Telefone: (98)2109-1250	Fax: (98)2109-1223
E-mail: cep@huufma.br	



Continuação do Parecer: 1.335.011

SAO LUIS, 24 de Novembro de 2015

Assinado por:
Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa
(Coordenador)

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227
Bairro: CENTRO **CEP:** 65.020-070
UF: MA **Município:** SAO LUIS
Telefone: (98)2109-1250 **Fax:** (98)2109-1223 **E-mail:** cep@huufma.br