



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



**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DA p53 EM ADENOMAS
HIPOFISÁRIOS**

NADJA CRUZ GAIDO

SÃO LUÍS
2016

NADJA CRUZ GAIDO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DA P53 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.

Área de Concentração: Pesquisa clínica e
Laboratorial.

Orientador

Prof. Dr. Manuel dos Santos Faria

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

SÃO LUÍS

2016

GAIDO, Nadja Cruz.

Análise da expressão proteica da p53 em adenomas hipofisários / Nadja Cruz GAIDO. - 2016.

72 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. Adenoma hipofisário. 2. Imuno-histoquímica. 3. Proteína p53. I. FARIA, Manuel dos Santos. II. Título.

NADJA CRUZ GAIDO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DA P53 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: 30/09/2016.

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

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

Dr. Marcelo Magalhães Silva (Examinador)
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

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

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai, Napoleão Gaido (in memoriam),
acompanhou-me durante toda a graduação, foi
o meu maior incentivador, sempre acreditando
que atingiria meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo, por não permitir perder a fé diante dos obstáculos.

Aos meus pais, Napoleão Gaido (*in memoriam*) e Maria Gaido, aos meus irmãos por toda a força durante esses anos de aprendizado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manuel dos Santos Faria, por orientar-me neste projeto, com sabedoria e competência. Tornou-se um pai, no qual me sinto honrada pela orientação e amizade. Sou-lhe eternamente grata pelas oportunidades, por tudo.

Ao meu noivo Fabiano Linhares, por toda paciência e força, desde o seletivo para aprovação a conclusão do mestrado, sendo infinitamente compreensivo, companheiro, amigo e incentivador.

Ao Programa de Pós-graduação Saúde do Adulto e da Criança- PPGSAC-UFMA, pela aprovação do projeto junto à banca seletiva e a todos os funcionários pela assistência.

A CAPES e FAPEMA, pela disponibilidade de recurso.

Ao MSc. Bruno de Almeida Nunes, que se fez amigo dando-me a oportunidade de está na equipe e ser orientada por Dr. Manuel dos Santos Faria.

Aos amigos que me incentivaram e torceram, todos passaram por mim deixando sua essência e amizade. Eternamente agradecida a Sullayne Araújo, Laura Reis, Roxana Veras, Fernanda Oliveira, Fabio França, Ellen Dias, Sabrina Damianse, Luana Priscila e Mayara Nunes. Em especial a Ana Gisélia Cortês Nascimento, por todo o apoio e parceria durante todos esses meses, pessoa incrível, muito amiga e sempre disposta a ajudar em tudo que fosse preciso, não tenho palavras para agradecer pela amizade, uma honra tê-la como amiga.

A MSc. Adriana Guimarães Sá, pela disposição em nos ajudar na coleta de dados, sempre muito gentil e solícita.

Ao Dr. Gilvan Cortês Nascimento, que se fez presente na elaboração do trabalho, posso considerá-lo co-orientador, tornou-se um grande colaborar na fase crucial do projeto.

Ao Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA, pela assistência na coleta de dados.

Aos médicos neurocirurgiões Dr. Emilio Carneiro, Dr. Gelson Soeiro e a equipe da neurocirurgia, por se fazerem sempre solícitos a nos informar o momento adequado para realizarmos a coleta.

Aos médicos radiologistas Dr. Alysson Milhomen Rocha e ao residente Eduardo Medeiros de Araújo, pela avaliação radiológica.

Ao Centro de Pesquisa Clínica – CEPEC/HUUFMA, pela hospitalidade, meu sentimento de gratidão a todos os funcionários.

A Prof.^a Dr.^a Christina Maeda Takiya, com vasta experiência na técnica utilizada; auxiliou-me na padronização, para o desenvolvimento da pesquisa, no Laboratório de Immunopatologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

A Pesquisadora Dr. Alda Wakamatsu, do Laboratório de Investigação Médica - LIM14, Patologia Hepática da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP. Teve participação importantíssima neste projeto por conduzir a técnica em nossa casuística, orientando-me sobre como padronizar e prosseguir com a técnica.

A Aline Assato, biomédica no Laboratório de Investigação Médica - LIM14, Patologia Hepática da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, pelo acolhimento, companheirismo e atenção.

Ao Prof. Dr. Gyl Eanes que nos auxiliou durante o processo técnico do trabalho, esteve presente sempre que precisávamos e, sobretudo agradecer a sua hospitalidade no Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica (LIME - HUUFMA).

Ao técnico Victor Maulen por toda assistência, paciência e disposição em auxiliar na realização da técnica, orientou-me sobre a melhor maneira de conduzi-la.

“A vida é vontade e movimento”

(Eça de Queiroz)

RESUMO

Os adenomas hipofisários representam cerca de 10 a 15% das neoplasias intracranianas e são geralmente benignos e compostos por uma população celular de origem monoclonal. São classificados conforme aspectos macroscópicos e radiológicos, status funcional, tintoriais, imuno-histoquímica e microscópicas. Cerca de 70% dos cânceres humanos possuem principalmente uma deficiência na função do gene. O gene *p53* é extensivamente estudado nas neoplasias mostrando que pacientes com mutações apresentam um pior prognóstico, assim, a proteína p53 é fundamental na prevenção do desenvolvimento de tumores exercendo a função de detecção de alterações no DNA e, conseqüentemente, correção ou apoptose. É possível que o aumento na expressão desta proteína seja decorrente de uma tentativa de frear o ciclo celular como resposta à desregulação por um estímulo de outra origem. Dessa forma, o estudo busca avaliar a imunoexpressão da proteína p53 em adenomas hipofisários. Foi realizado um estudo analítico com delineamento do tipo transversal, no qual foram incluídos 62 pacientes com idade superior 16 anos de ambos os sexos, que apresentaram diagnóstico de adenoma hipofisário no período de 2008 a 2016, oriundos do Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – HUUFMA. Esses pacientes foram submetidos à ressecção cirúrgica do tumor, com obtenção das amostras do tecido tumoral. Após diagnóstico histopatológico convencional, foram emblocadas em parafina, para realização do estudo imuno-histoquímico com o objetivo de identificar a imunoexpressão para proteína p53 e implicações correlacionadas ao comportamento biológico dos adenomas hipofisários. A análise para expressão da proteína p53 em adenomas hipofisários foi obtida através da reação imunoenzimática da streptoavidina-biotina-peroxidase ou imuno-histoquímica. A imunoexpressão da proteína p53 não revelou correlação estatisticamente significativa, quanto aos achados clínicos e características demográficas, tais como sexo, idade, imunoexpressão da p53 para os subtipos tumorais e volume tumoral. Torna-se necessário obter números mais expressivos de pacientes para que a imunoexpressão da p53 seja efetiva, quanto ao real valor prognóstico em adenomas hipofisários.

Palavras-chave: Adenoma hipofisário. Proteína p53. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

The pituitary adenomas represent about 10 to 15% of intracranial tumors and are usually benign, comprising a cell population of monoclonal origin. They are classified as macroscopic and radiological aspects, functional status, dyeing, immunohistochemistry and microscopic. About 70% of human cancers have mainly a deficiency in the function gene. The p53 gene is extensively studied in tumors, showing that patients with mutations have a worse prognosis, as well, the p53 protein is critical in preventing tumor development performing change detection function in DNA and thereby fix or apoptosis. It is possible that the increase in expression of this protein is the result of an attempt to stop the cell cycle in response to deregulation by a stimulus from another source. This way, the study seeks to determine the expression of p53 protein in pituitary adenomas. an analytical study, with cross-sectional was held in which were included 62 patients older than 16 years of both sexes, who were diagnosed with pituitary adenoma, from 2008 to 2016, arising from the Endocrinology Service University hospital of the Federal University of Maranhão - HUUFMA. These patients underwent surgical resection of the tumor, obtaining the samples of tumor tissue. After conventional histopathology, they were embedded in paraffin, for carrying out the immuno-histoquimico study aimed to identify the expression of p53 protein and implications correlated with biological behavior of pituitary adenomas. The analysis for p53 protein expression in adenomas was obtained by immunoenzymatic of streptoavidin-biotin or immunohistochemistry. The p53 protein immunostaining revealed no statistically significant correlation, as the clinical and demographic characteristics such as gender, age, p53 expression in tumor subtypes and tumor volume. It is necessary to obtain greater numbers of patients, so that p53 expression is effective when the real prognostic value in pituitary adenomas.

Key words: Pituitary adenoma. p53 protein. Immunohistochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo celular	17
Figura 2. Ilustração anatômica da glândula pituitária e sua localização	19
Figura 3. Sistema de classificação de Knosp, para quantificar a invasão do adenoma hipofisário em seio cavernoso	22
Figura 4. Estrutura Linear da proteína p53	27
Figura 5. Fluxograma	30
Figura 6. Fotomicrografia de adenoma hipofisário clinicamente não funcionante	39
Figura 7. Fotomicrografia de adenoma hipofisário de paciente acromegálico	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Hormônios liberados e inibidos pelo hipotálamo	20
Tabela 2. Definições para invasivo e agressivo	22
Tabela 3. Classificação dos adenomas hipofisários de acordo com a Organização Mundial da Saúde, 2004 (OMS, 2004)	24
Tabela 4. Os adenomas hipofisários são classificados de acordo com seu comportamento hormonal, traduzindo uma diversidade de manifestações clínicas	25
Tabela 5. Comportamento imuno-histoquímico da proteína p53, biomarcador de supressão tumoral.....	28
Tabela 6. Caracterização demográfica da série de 62 pacientes com adenomas hipofisários	34
Tabela 7. Perfil imuno-histoquímico de pacientes positivos para proteína p53 com adenoma hipofisário invasivo	35
Tabela 8. Perfil imuno-histoquímico da proteína p53, na serie de 62 pacientes com adenomas hipofisários	36
Tabela 9. Relação de pacientes negativos para p53, com invasão de acordo com os critérios de classificação de Knosp	37
Tabela 10. Características demográficas e a imunoexpressão da p53 em pacientes ACNF	38
Tabela 11. Perfil imuno-histoquímico da proteína p53 em pacientes imunorreativos para subtipo ACNF	40
Tabela 12. Características demográficas de pacientes acromegálicos	41
Tabela 13. Perfil imuno-histoquímico de acromegálicos imunorreativos para proteína p53	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC - Anticorpo

ACTH - *Adrenocorticotrophic hormone* – Hormônio adrenocorticotrófico

ACNF - Adenoma Hipofisário Não Clinicamente Funcionantes

CDKs - Quinase Dependente de Ciclina

CDKI - Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina

ADH - Hormônio Antidiurético

AH - Adenoma hipofisário

BSA - *Bovine serum albumin* – Albumina sérica bovina

CEP - Comitê de ética e pesquisa

CEPEC - Centro de Pesquisa Clínica

COMIC - Comissão Científica

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DAB - 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto dihidratado

EDTA - *Diaminoethane tetraacetic acid* - ácido etilenoaminotetracético

FSH - Follicle-stimulated hormone – hormônio folículo estimulante

G1 – Fase do ciclo celular (*gap1* – primeiro intervalo)

G2 – Fase do ciclo celular (*gap2* – segundo intervalo)

GH - *Growth Hormone* – Hormônio do crescimento

GHRH - *Growth-hormone releasing hormone* - Hormônio liberador do hormônio do crescimento

HE - Hematoxilina-eosina

HUUFMA - Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

IHQ - Imuno-histoquímica

ICD - Código Internacional de Saúde

IGF-I - *Insulin-like growth factor type I* – Fator de crescimento insulina-símile tipo I

LH - *luteinizing hormone* – Hormônio Luteinizante

LIME - Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica

M – Fase do ciclo celular (Mitose)

OCT - Ocitocina

OMS - Organização Mundial da Saúde

TP53 - *tumor protein 53* – Proteína 53 tumoral

p53 – Gene que codifica a proteína p53

PBS – *Phosphate buffer saline* – Tampão salina fosfato

PRL - Prolactina

RNM - Ressonância nuclear magnética

S – Fase do ciclo celular (Síntese)

SNC - Sistema nervoso central

TRIS - *Tris(hydroxymethyl) aminomethane* - tris (hidroximetil) aminometano

TC - Tomografia computadorizada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA	18
2.1 Eixo Hipotálamo – Hipofisários	18
2.2 Agressividade e invasividade	21
2.3 Invasão de seio cavernoso de acordo com a classificação de classificação de Knosp	22
2.4 Classificação	23
2.5 Manifestações clínicas e modalidades terapêutica	24
2.6 Epidemiologia	25
2.7 Imuno-histoquímica (IHQ)	26
2.8 Proteína p53	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 Geral	29
3.2 Específico	29
4. METODOLOGIA	30
4.1 Tipo de estudo	30
4.2 Período e local do estudo	30
4.3 Aspectos éticos	30
4.4 Amostragem	30
4.5 Coleta da amostra	31
4.6 Procedimentos imuno-histoquímico	31
4.7 Análise quantitativa da imunoexpressão da p53	33
4.8 Análise estatística	33
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	61
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	66

1 INTRODUÇÃO

Os adenomas hipofisários representam cerca de 10% a 15% das neoplasias intracranianas, sendo geralmente benignos e compostos por uma população celular de origem monoclonal (MELMED et al., 2010; AFLOREI e KORBONITS, 2014). Apesar de relativamente comuns na população geral, apenas uma pequena fração destes adenomas leva à manifestações clínicas, seja pela presença de compressão de estruturas vizinhas (hipopituitarismo, sintomas visuais, cefaleia) ou devido a outros distúrbios endócrinos causados por hipersecreção hormonal (CLAYTON; FARELL, 2009).

São classificados conforme aspectos *morfométricos e radiológicos* (microadenomas com diâmetro <1 cm e macroadenoma com diâmetro ≥1 cm, ou ainda, adenoma gigante com diâmetro > 4,0 cm; invasivos ou não invasivos); *status* (funcionantes e não-funcionantes); *tintoriais* (acidófilo, basófilos e cromóforos), *imuno-histoquímica (IHQ)* e ou *microscopia eletrônica* (somatotropinomas, prolactinomas, corticotropinomas, tireotropinomas e gonado-tropinomas) (ASA; EZZAT, 2009; ZADA et al., 2011).

Os adenomas hipofisários podem apresentar-se com evolução e manifestações clínicas variáveis. Variantes agressivas e não agressivas podem exibir aspecto histológico semelhante, motivando a investigação imuno-histoquímica, genética e de biologia molecular, com o propósito de relacionar mecanismos de tumorigênese com o comportamento biológico desses tumores, tais como invasão, recorrência e persistência, a despeito das diferentes modalidades de tratamento (HIMES; RAETZMANR, 2009; CHAHAL et al., 2010).

Do ponto de vista funcional, os adenomas hipofisários funcionantes estão divididos em produtores de prolactina (PRL); hormônio do crescimento ou somatotrópico (GH); hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); hormônio tireotrófico (TSH); hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH), podendo co-secretar dois ou mais hormônios; já os adenomas clinicamente não funcionantes (ACNF), não secretam quantidades apreciáveis de hormônios adenohipofisários, mas podem expressá-los imuno-histoquimicamente (OSAMURA et al., 2008; PINTO; BRONS-TEIN, 2011).

A incidência relativa dos diferentes adenomas mostra que os funcionantes representam cerca de 70% dos casos, sendo o prolactinoma o mais frequente,

seguido dos produtores de somatotrofinas, que causam acromegalia e gigantismo; corticotropinomas, que manifestam doença de Cushing e os tumores não funcionantes (30%), que podem ter características oncocíticas por apresentarem histologicamente citoplasma granular acidófilo, com grande acúmulo de mitocôndrias e, até 60% de ocupação do citoplasma; ou não oncocíticas (*null cell*), quando não apresentam imunorreatividade (IHQ) e sinais clínicos (GREENMAN; STERN, 2009; NISHIOKA et al., 2012).

A progressão dos adenomas hipofisários pode ocorrer por ativação de oncogênese, inativação de genes supressores tumorais e alterações de genes envolvidos com o ciclo celular. Cerca de 70% dos tumores humanos possuem principalmente uma deficiência na função do gene *TP53*, que codifica a proteína p53 (fosfoproteína53), e possui um papel importante relacionado ao bloqueio do ciclo celular sinalizando correções a mutações (ASA; EZZAT, 2009; VANDEVA et al., 2010; PERTUIT et al., 2011).

O gene *TP53* é exaustivamente estudado nas neoplasias, mostrando que pacientes com mutações apresentam um pior prognóstico. Tais achados apoiam a hipótese do defeito intrínseco de uma célula levando à expansão monoclonal, e provavelmente os hormônios hipotalâmicos e outros fatores locais têm um papel permissivo na promoção do crescimento e na evolução do comportamento invasivo (ASA et al., 2010). A proteína p53 exerce importante função de sensor de alterações no DNA e, conseqüentemente, correção ou apoptose, exercendo um papel fundamental na prevenção do desenvolvimento de tumores. É possível que o aumento na expressão dessa proteína seja decorrente de uma tentativa de frear o ciclo celular como resposta à desregulação. (FASSNACHT; LIBE et al., 2011).

O ciclo celular exerce papel fundamental no processo de duplicação e divisão celular. Esse mecanismo é coordenado por uma rede de atividades bioquímicas que regulam o andamento e as passagens entre fases do ciclo (G1, S, G2 e M) de forma que garanta replicação gênica, segregação dos cromossomos, regulação dos processos de diferenciação, senescência e morte celular (Figura1) (SIDDIK et al. 2005; QUEREDA; MALUMBERS, 2009).

Há duas importantes fases do ciclo celular; a fase de interfase ou mitose e a fase M. A interfase subdivide-se em três: fase G1 que permite o crescimento e a replicação dos cromossomos, nela a p53 ativa genes que determinam a checagem do seu ciclo até que ocorram correções ao DNA; fase S cujo período é marcado pela

síntese ou replicação de DNA e G2 que prepara a célula para divisão mitótica; já na fase M, ocorre separação das cromátides com a formação de dois núcleos não idênticos (SIDDIK et al. 2005; QUEREDA; MALUMBERS, 2009; DE LIMA et al., 2012).

O ciclo celular é regulado pela interação de um conjunto de proteínas que induzem e coordenam à progressão do ciclo de forma controlada (VANDEVA et al., 2010). Esse evento envolve as ciclinas (A, B, C, D e E), as quinases dependentes de ciclinas (CDKs 1, 2, 4 e 6) e seus inibidores (CDKI p27 e p21), que induzem a p53 na regulação do ciclo celular (QUEREDA; MALUMBERS, 2009; DE LIMA et al., 2012).

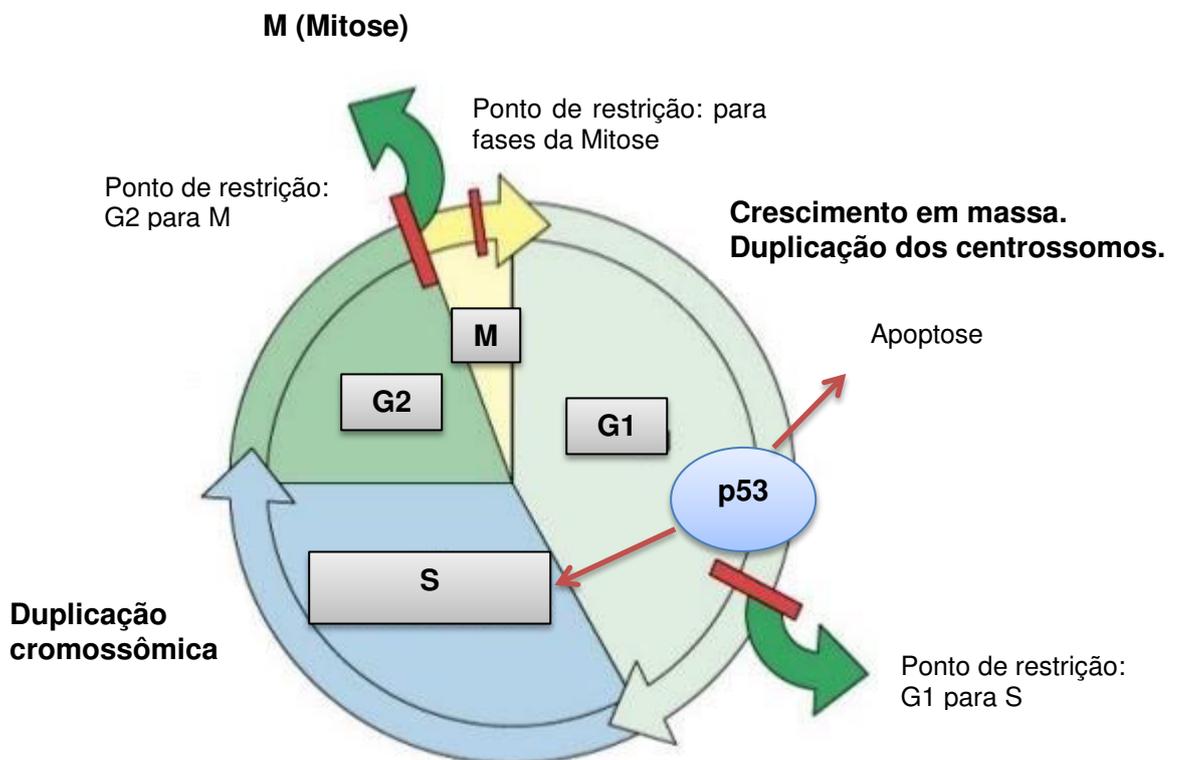


Figura 1. Ciclo celular. G1 para S - checagem do tamanho celular e condições favoráveis do ambiente; G2 para M - Checagem do DNA danificado ou não duplicado e checagem por cromossomo não duplicado; M - Checagem da ligação dos cromossomos ao fuso mitótico. Fonte. <http://labs.icb.ufmg.br/>. Com adaptações. Acesso em: 06/2016.

Assim, a proteína p53 tem como função o bloqueio da divisão de células geneticamente modificadas e, portanto, a perda da sua função propicia o crescimento tumoral. Atua como um sensor de danos no DNA e auxilia o sistema de reparo, utilizando os momentos de *checkpoints* (sitio de inspeção) para paralisar o

ciclo celular ou induzir a apoptose, prevenindo, assim, que ocorra a proliferação de células com o DNA mutado sendo produto de transcrição do gene *TP53* (LEVINE; MOMAND; FINALY, 2009).

As células que apresentam o gene *TP53* mutado com a inativação da p53 comprometem o ciclo celular de tal forma que interferem no reparo do DNA. Em consequência dessas modificações celulares, ocorrem mutações e rearranjos cromossômicos adicionais, levando a uma rápida proliferação de clones de células com DNA mutado e transformação neoplásica (RAVEROT et al., 2010).

Apesar de amplamente estudado, os mecanismos da tumorigênese hipofisária ainda são pouco compreendidos. A importância deste estudo é identificar a presença da expressão da proteína p53 e suas implicações com os aspectos invasivos e agressivos do adenoma hipofisário, bem como buscar fatores preditores desta agressividade, progressão e recidivas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Eixo Hipotalâmico – Hipofisário

A hipófise, também chamada de pituitária, é uma glândula dinâmica, heterogênea que mede em média 13 x 9 x 6 mm nos diâmetros transversal, anteroposterior e vertical, respectivamente, oval, com peso cerca de 0,6 g, exercendo um papel fundamental na integração de vários sistemas regulatórios, por meio da produção de hormônios específicos, proporcionando o funcionamento de diversas glândulas do corpo. Localiza-se na base do encéfalo no interior da sela túrcica relacionando-se pela porção superior com o quiasma óptico e pela porção inferior com o seio intercavernoso e parte do teto do seio esfenoidal. Lateralmente tem contato com os seios cavernosos e as estruturas neles contidas. Os seios cavernosos anterior e posteriormente a hipófise, comunicam-se entre si, formando o seio cavernoso (WILLIN et al., 2010; ASA, 2011; AMATO, 2014).

A glândula pituitária divide-se em duas regiões distintas denominadas lobo anterior (adeno-hipófise), que equivale a 80% da glândula, constituída pela parte tuberal, parte intermédia e parte distal; lobo posterior (neuro-hipófise) formada pela parte nervosa e pelo infundíbulo hipofisário (Figura 2) (MILANO et al., 2010).

A adeno-hipófise é constituída por seis tipos celulares secretoras de hormônios que liberam seus produtos na corrente sanguínea através do sistema porta-hipofisário, sendo responsável pela produção de LH, FSH, HGH, TSH, PRL e ACTH. A neuro-hipófise contém fibras nervosas amielínicas e axônios de neurônios hipotalâmicos secretores que conduzem e promovem a secreção de ADH (Hormônio Antidiurético) e OCT (Ocitocina). Desta forma, os eixos hipotálamo-hipofisário realizam uma conexão entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema endócrino, mantendo o equilíbrio da função das glândulas endócrinas e do sistema fisiológico a estes relacionados (ASA et al., 2009).

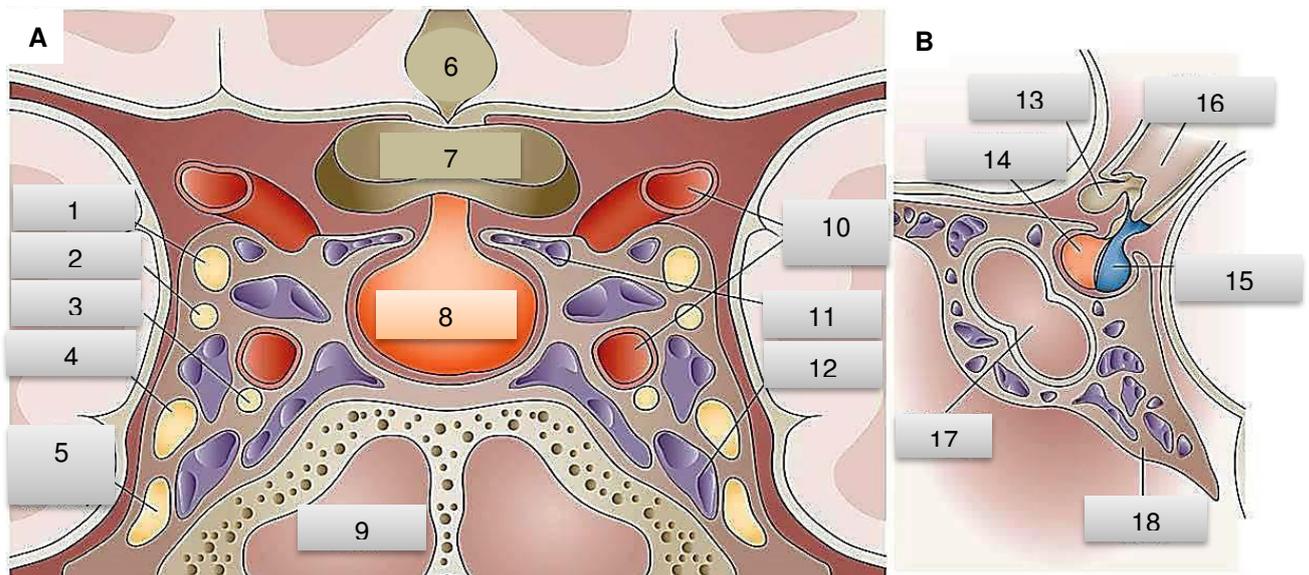


Figura 2. Ilustração anatômica da glândula pituitária e sua localização. **A.** 1. Terceiro nervo; 2. Quarto nervo; 3. Sexto nervo; 4. Quinto nervo (primeira divisão); 5. Quinto nervo (segunda divisão); 6. Terceiro ventrículo; 7. Quiasma óptico; 8. Hipófise (região de sela túrcica); 9. Seio esfenoidal; 10. Artéria carótida interna; 11. Diafragma sellar; 12. Seio cavernoso; **B.** 13. Quiasma óptico; 14. Hipófise anterior; 15. Hipófise posterior; 16. Terceiro ventrículo; 17. Seio esfenoidal; 18. Osso esfenoidal.
Fonte: DI IEVA et al., 2014.

O hipotálamo realiza impulsos conduzidos por seus núcleos, proporcionando o controle da função hipofisária. Essa atividade é regulada por sinais induzidos por hormônios ou por aferências neurais, que tem sua origem no tálamo, o sistema reticular ascendente neural, o sistema límbico, na retina e no neocortex. Anatômica e funcionalmente o hipotálamo é organizado em duas porções, anterior e posterior, sendo cada uma delas compostas das áreas medial e lateral. A área medial é constituída por grupos de células nervosas, organizada em três grandes grupos nucleares: anterior (supra-óptico), tuberal e posterior (mamilar) (ALHOSEINI;

MOVAGHAR, 2012). A área hipotalâmica lateral, região que forma a borda lateral do complexo nuclear hipotalâmico medial, constitui-se de três grandes grupos neuronais, é a maior via pela qual os núcleos hipotalâmicos comunicam-se com o restante do cérebro. A região hipotalâmico anterior inclui os núcleos magnocelulares (supra-óptico e paraventricular) que sintetizam os hormônios da neuro-hipófise. A região posterior contém os complexos mamilares, supramamilar e túbero mamilar. Os núcleos ventromedial, dorso medial e arqueado compõem a região tuberal (NOSE, 2010).

Os hormônios do hipotálamo, envolvendo fatores liberadores ou inibidores, atuam na adeno-hipófise (glândula pituitária anterior) controlando a secreção dos hormônios desta região da glândula (Tabela 1). A secreção dos dois principais hormônios da adeno-hipófise, a prolactina e o hormônio do crescimento, estão sujeitos a controle hipotalâmico e outros fatores liberadores e inibidores (DUARTE, 2009; SALGADO et al., 2013).

Todos os hormônios hipotalâmicos liberadores correspondem aos hormônios da adeno-hipófise, porém não existem inibidores que correspondam a todos os outros hormônios tais como, TSH, ACTH, FSH e LH. Esses hormônios controlam respectivamente as funções da tireoide, córtex suprarrenal, ovários e testículos. Para tais hormônios que não possuem fatores inibidores hipotalâmicos, a inibição acontece por resposta (feedback) dos órgãos-alvo para cessar sua atuação (MUŞAT et al., 2010). O hipotálamo pode ser considerado como um centro comum, onde sinais com origem em múltiplos sistemas são integrados e processados para a hipófise anterior (COLAO et al., 2011).

Tabela 1. Hormônios liberados e inibidos pelo hipotálamo.

Fator hipotalâmico	Efeito	Hormônio correspondente
Dopamina	Inibitório	Prolactina
Hormônio liberador de tireotrofina (TRH)	Estimulatório	TSH e prolactina
Hormônio liberador de corticotrofina (CRH)	Estimulatório	ACTH
Hormônio liberador de GHRH	Estimulatório	HGH
Somatostatina	Inibitório	HGH
Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH)	Estimulatório	LH e FSH

Fonte: SALGADO et al., 2013.

2.2 Agressividade e invasão

Os adenomas hipofisários exibem vários comportamentos biológicos; alguns do ponto de vista hormonal são considerados secretores ou não secretores, outros, exibem crescimento lento ou rápido, infiltrando tecidos adjacentes, com características invasivas e agressivas (Tabela 2) (ASA, 2011). Adenomas hipofisários são, geralmente, considerados agressivos a partir do ponto de vista clínico, com característica para invasão maciça de tecidos adjacentes, velocidade de crescimento, tamanho tumoral expressivo, tendência à recidiva, com resistência às modalidades terapêuticas (LLOYD et al., 2004; TROUILLAS et al., 2013).

Cerca de 15% dos adenomas hipofisários, com ressecção cirúrgica, possuem características de adenomas hipofisários agressivos, quanto a localização, exibindo variabilidade de crescimento, comportamento hormonal e dificuldade de serem controlados clinicamente, o que aponta para um mau prognóstico. Assim, a identificação precoce desses adenomas pode contribuir com melhor resultado terapêutico (RAVEROT et al., 2010; COLAO; SAVASTANO; 2011).

Para invasão, a frequência de tumores hipofisários invasivos é definida como uma infiltração do tecido circundante, com cerca de 25 a 55% dos adenomas hipofisários para o seio esfenoidal, osso e seio cavernoso. A invasão tumoral compreende, inicialmente, infiltração na dura-máter envolvendo a sela e o assoalho selar, diafragma ou na parede medial do seio cavernoso selar. A ressonância nuclear magnética (RNM) é uma abordagem comum, considerada eficaz para critério de invasão, adotando o sistema de classificação de Knosp (KNOSP et al., 1993). De acordo com a classificação de Knosp, apenas o grau 3 e 4 são considerados adenomas verdadeiramente invasivos, quando há invasão parasselar dos seios cavernosos (KNOSP et al., 1993). Essa classificação não considera a extensão suprasselar como critério de invasão (MEIJ et al., 2002; FAHLBUSCH; BUSLEI, 2006; CUSIMANO et al., 2012).

2.3 Invasão de seio cavernoso de acordo com a classificação de classificação de Knosp

A extensão parasselar, avaliada por Knosp, permite identificar através dos exames de RNM, invasão para o seio cavernoso, comparando achados cirúrgicos com base na localização tumoral através das linhas intercarótídeas. É classificado com grau 0, quando não envolve seio cavernoso; nos tipos 1 e 2, o tumor comprime a parede medial do seio cavernoso, mas não excede uma linha imaginária, que se estende entre os centros dos dois segmentos da artéria carótida interna, ou ainda não excede as margens laterais da própria artéria; no grau 3, o tumor estende-se lateralmente para a artéria carótida interna para dentro do seio cavernoso; já no grau 4, a artéria carótida interna é completamente envolvida pelo adenoma (Figura 3) (KNOSP et al., 2009; TROUILLAS et al., 2013).

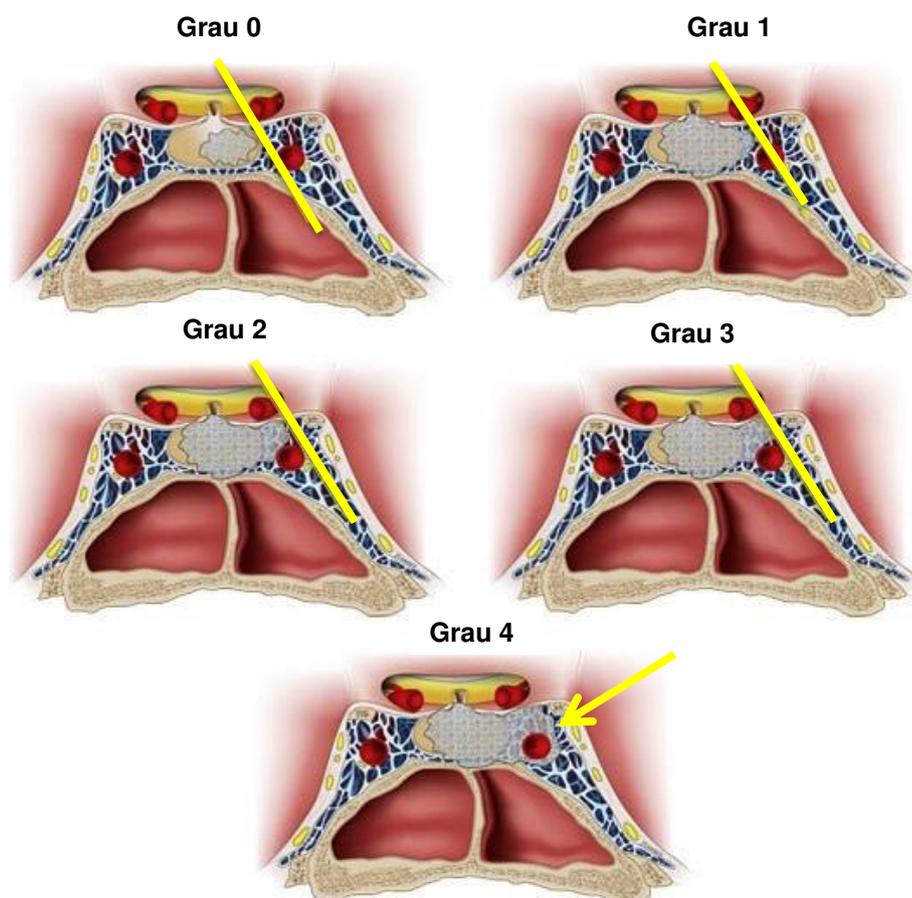


Figura 3. Sistema de classificação de Knosp, para quantificar a invasão do adenoma hipofisário em seio cavernoso. Grau 0, condição normal do espaço do seio cavernoso; Grau 1 e 2, a extensão do tumor não passa de uma linha entre os centros da secção transversal das artérias carótidas; Grau 3, tumor se estende lateralmente à tangente lateral intra e supracavernosa; Grau 4, envolve totalmente a artéria carótida intracavernosa. Fonte: <http://oncolex.org/> Acesso em: 06/2016.

Tabela 2. Definições para adenoma hipofisário invasivo e agressivo

MORFOMETRIA	
Microadenoma (volume tumoral <10 mm) Macroadenoma (volume tumoral ≥10 mm) Adenoma gigante (tamanho > 40 mm ou volume > 10 cm ³)	
INVASÃO	AGRESSIVIDADE
Invasão de estruturas vizinhas com base de exames radiológicos e histopatológicos.	A agressividade tem como base o comportamento clínico.
Invasão do seio esfenoidal e, ou seio cavernoso (25-55% dos tumores da hipófise).	Com percentual indefinido
Extensão suprasselar do tumor não é um critério de invasão.	Exposição de resultados atípicos, como alta atividade mitótica, Ki-67 ≥3%, ou imunopositividade p53.
Knosp, grau 3 e grau 4 define a invasão do tumor dentro do seio cavernoso.	Geralmente são adenomas invasivos, macro ou gigantes com extensão selar ou invasão ossea.
Macroadenomas pode ser invasivo, mas muitas vezes não são clinicamente agressivos.	Algumas exceções foram descritos para microadenomas secretores de ACTH com agressividade e ou tumores caracterizados por uma elevada taxa de recorrência ou a falta de resposta à terapêutica. Não metastático, mas compartilham histologicamente características comuns com carcinomas da hipófise.

Fonte: DI LEVA et al., 2014.

2.4 Classificação

Os adenomas hipofisários são classificados de acordo com volume (radiologicamente), atividade funcional, aspectos histológicos, a técnica de imunohistoquímica (IHQ) e microscopia eletrônica (Tabela 3). Importante ressaltar que embora haja várias classificações, na prática, consideram-se dois critérios importantes: a ocorrência ou não de modificações hormonais (funcionantes e não funcionantes) (Tabela 4) e o tamanho e a extensão do tumor obtido por imagem. Quando excedem de forma expansiva os limites da sela túrcica são subclassificados

em suprassellar (com compressão de nervo óptico), parassellar (com invasão de seio cavernoso), infrassellar (para seio esfenoidal) ou inter-relações entre estas (ASA et al., 2009; ALVES et al., 2011).

Tabela 3. Classificação dos adenomas hipofisários de acordo com a Organização Mundial da Saúde, 2004 (OMS, 2004).

Classificação com base em características histológicas, imuno-histoquímicas e microscopia eletrônica.	
<p><u>Adenomas típicos (ICD8272/0)</u> Podem ser invasivos e delimitados com crescimento para várias regiões anatômicas adjacentes.</p>	<p><u>Adenoma produtor de ACTH</u> Adenomas Corticotropinomas Densamente granulado Esparsamente granulado</p>
<p><u>Adenomas atípicos (ICD8272/1)</u> São invasivos; índice para Ki-67 \geq 3%, e imunorreatividade nuclear intensa para a proteína p53.</p>	<p><u>Adenoma produtor de PRL</u> Adenomas prolactinomas Densamente granulado Esparsamente granulado</p>
<p><u>Carcinomas (ICD8272/3)</u> Comportamento metastático.</p>	<p><u>Adenoma produtor de gonadotrofina</u> Adenomas gonadotropinomas ou adenoma não funcionante (FSH/LH)</p>
<p><u>Adenomas produtores de GH</u> Adenoma Somatotrófico Densamente granulado Esparsamente granulado Adenoma misto ou Somatomatotropinomas. Adenoma Mamosomatotrófico ou Mamosomatotropinomas. Adenomas somatotropinomas silenciosos</p>	<p><u>Adenoma de células nulas</u> Adenomas de hormônios imunonegativos Oncocitomas</p> <p><u>Adenomas Pluri- hormonais</u></p>

Fonte: AL-SHRAIM et al., 2006; HEANEY, 2011.

2.5 Adenomas hipofisários: manifestação clínicas e modalidades terapêuticas

Tabela 4. Os adenomas hipofisários são classificados de acordo com seu comportamento hormonal, traduzindo uma diversidade de manifestações clínicas.

Adenomas Hipofisários	Manifestações Clínicas
Somatotropinoma (HGH) Modalidades terapêuticas	Gigantismo em crianças; Acromegalia em adultos; Infiltrativos e agressivos. Farmacológica, radiológica e cirúrgica.
Prolactinoma (PRL) Modalidades terapêuticas	Hiperprolactinemia; Hipogonadismo: Galactorreia e Amenorreia em mulheres, infertilidade, disfunções sexuais, osteoporose, acne, hirsutismo e ganho de peso. Disfunção erétil e diminuição de libido em homens. Farmacológica e cirúrgica
Corticotropinoma (ACTH) Modalidades terapêuticas	90% dos casos são de adenomas hipofisários para microadenoma; Produção elevada de ACTH; Hiper cortisolismo ou Síndrome de Cushing (SC); Farmacológica, radiológica e cirúrgica.
Adenomas Hipofisários Clinicamente Não Funcionantes (ACNF) Modalidades terapêuticas	15% dos casos são de macroadenomas; Hipopituitarismo; Na imuno-histoquímica são imunopositivos para FSH, LH e subunidades; Imunonegativos para <i>null cell</i> e oncocitomas. Farmacológica, radiológica e cirúrgica.

Fonte: COLÃO, 2009; LUGO et al., 2012; MELMED; JAMESON, 2013; SZCZESNIAK et al., 2015.

2.6 Epidemiologia

Os adenomas hipofisários são a causa de aproximadamente 25% de todas as ressecções cirúrgicas para tumores do sistema nervoso central (SNC) (ASA; EZZAT, 2009; MELMED, 2011). Os sintomáticos podem ocorrer 1 em 1064 indivíduos, com uma prevalência na população global com cerca de 80 a 90 por 100.000 da população (RAAPPANA et al., 2010; MELMED, 2011). Muitos estudos revelaram que a incidência tem aumentado com a idade variando em 3 a 9%, na qual são diagnosticados antes de completar 20 anos, quanto que cerca de 30% dos indivíduos com idades entre 50 a 60 anos são oficializados com diagnóstico para incidentalomas, ACNF diagnosticados acidentalmente (ASA; METE, 2014).

Os prolactinomas são os mais frequentes com incidência de 50 a 60%, seguido dos ACNF de 20 a 30%, somatotropinomas de 10 a 15%, corticotropino-mas

de 5 a 10% e tireotropinomas de 1 a 2% (ARAFAH; NASRALLAH, 2001; DALY et al., 2004; METE; ASA, 2012).

2.7 Imuno-histoquímica (IHQ)

A imuno-histoquímica tem como objetivo estudar as neoplasias, doenças infecciosas e doenças degenerativas, podendo ser aplicada em estudos e na investigação de outras doenças. Apresenta-se como uma técnica padrão-ouro, como meio de investigação de várias estruturas celulares e teciduais que estão relacionadas às diversas patologias de possível diagnóstico pela mesma (TORLAKOVIC et al., 2010). Existem algumas particularidades quanto ao desenvolvimento da técnica de IHQ; esta merece cuidado desde a fixação da amostra, escolha dos anticorpos, manuseio das reações durante o procedimento até a interpretação dos resultados. Tal técnica permite um grau de confiabilidade e otimização, contribuindo para uma melhor acurácia diagnóstica (BLOCH, 2012; BRATTHAUER et al., 2013).

2.8 Proteína p53

O gene que codifica a proteína p53 (*fosfoproteína53*) é denominado gene *TP53* (*tumor proteína 53*), considerado um gene de supressão tumoral, localiza-se no cromossomo 17 (17p13. 1), possui 20 Kb e é composto por 11 éxons. O referido gene exerce o controle de regular a integridade do genoma diante de danos celulares, como interferências de rearranjo cromossômico, assim como depleção de metabólitos, choque térmico, hipóxia, oncoproteínas virais e ativação de oncogenes celulares (ALMEIDA et al. 1999; FERREIRA; ROCHA, 2010; PASKULIN et al., 2012; SHAHBAZI et al., 2013). O gene realiza a transcrição da proteína p53, que exerce um papel importante no controle do ciclo celular de forma que conduz a prevenção do surgimento de neoplasias, pois a p53 realiza o bloqueio na divisão celular parando o ciclo em G1, prevenindo assim, danos ao DNA, realizando checagens de reparo ou levando a célula a apoptose (FASSNACHT et al., 2011; LIBE et al. 2011).

A p53 é constituída por 393 aminoácidos com peso molecular de 53kilodaltons (kDa), denominada proteína p53 em referência a seu peso molecular;

está estruturada em quatro importantes regiões ou domínios: (i) a região *N-terminal*, primeira região, constituída de um domínio de transativação e interação com vários fatores de transcrição; (ii) um domínio *central*, segunda região, onde se liga ao DNA para que ocorra a transcrição em sequência específica, no qual controla de forma positiva ou negativa a ativação de diversos genes-alvos; (iii e iv), a *região C-terminal* é uma *região de oligomerização* que estabelece uma ligação específica sendo fundamental para que ocorra a transativação de sequências específicas, com um domínio regulatório e um domínio de tetramerização. Todo esse arranjo envolvendo as atividades da p53 ocorre sistematicamente no ciclo celular (Figura 4) (SUZUKI et al., 2011).



Figura 4. Estrutura Linear da proteína p53. Domínios funcionais da proteína p53. Fonte. VOUSDEN; LANE, 2007.

Caracteriza-se por um tempo de vida muito curto, cerca de 20 minutos em situações fisiológicas normais, tornando assim, muitas vezes difícil a sua interpretação, podendo ser identificado e quantificado por meio de técnicas laboratoriais como imuno-histoquímica, western blot, ou por citometria de fluxo (GONZALEZ et al., 2008; KLOPFLEISCH et al., 2010).

Quando as células sofrem injúria, a p53 se acumula no núcleo, possibilitando a regulação dos alvos de transcrição para induzir os eventos como apoptose e parada do ciclo celular (ZHANG; XIONG, 2001). Com gene mutado e proteína p53 inativa, o ciclo celular continua sua atividade mitótica sem o reparo no DNA, produzindo células geneticamente instáveis com resultados de mutações e consequentemente proliferação de células neoplásicas. Dessa forma, a proteína p53 funciona como “guardião do DNA”, devido a sua atividade de monitoramento em garantir a integridade do genoma. A p53 revela-se como um sensor de lesões no DNA (RIBEIRO et al., 2009). Relata-se que 15% a 25% dos adenomas hipofisários

invasivos expressam de forma aumentada a p53, e quase 100% em carcinomas (FLAGIA; SPADA, 2001; HENTS-CHEL et al., 2003).

As alterações moleculares podem induzir o desenvolvimento de tumores contribuindo para início da patogênese, cujo evento inicial ocorre na glândula hipofisária, com mutações cromossômicas e a expressão de proto-oncogenes específicos da hipófise, resultando em adenomas hipofisários (PAMPALONA et al., 2012). A tumorigênese hipofisária pode iniciar com uma mutação espontânea, através de fatores tróficos, intrínsecos ou extrínsecos, que traduzem a progressão do tumor. Tal mecanismo resulta em proliferação celular, transcrição gênica e secreção hormonal alterada, induzindo a um comportamento clínico e biológico variável (VANDEVA, et al., 2010).

Adenomas hipofisários gigantes e macroadenomas exibem comportamento para invasivo, agressivo, com recorrências múltiplas, tendendo a expressar intensa imunopositividade para p53 (METE et al., 2012). O comportamento do tumor está associado com a expressão da p53, apresentando níveis variados de reatividade quanto à aplicação da imuno-histoquímica, com 0% de imunoreatividade em adenomas hipofisários não invasivos, 15,2% em adenomas invasivos e de 100% para carcinomas (SALEHI et al., 2010).

Tabela 5. Vantagens e desvantagens da proteína p53 como biomarcador de supressão tumoral.

Vantagens	Desvantagens
Os elevados níveis de p53 estão associados com a agressividade clínica;	Falta de padronização de um método de quantificação para a sua expressão;
Os valores mais elevados são encontrados em carcinomas da hipófise;	Critérios diferentes protocolos de quantificação para definir a amostra como p53 positivo ou negativo.
A positividade para p53 está incluso nos critérios para a definição de adenomas hipofisários atípicos (OMS, 2004).	

Fonte: METE et al., 2012.

O estudo da p53 em adenomas hipofisários por meio da IHQ é importante, primeiro, porque a detecção da expressão pode contribuir para o prognóstico, segundo, porque é um elemento importante para abordagens das diversas modalidades terapêuticas, como terapia medicamentosa, cirúrgico e radioterapia.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a imunexpressão da proteína p53 em adenomas hipofisários.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Relacionar a imunexpressão da p53 com achados clínicos e características demográficas, tais como idade, sexo e volume tumoral;
- ✓ Correlacionar a expressão imuno-histoquímica da proteína p53 aos diversos tipos histológicos de adenomas hipofisários;
- ✓ Correlacionar a imunexpressão da proteína p53 em relação à invasividade.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo analítico com delineamento do tipo transversal.

4.2 Período e local de estudo

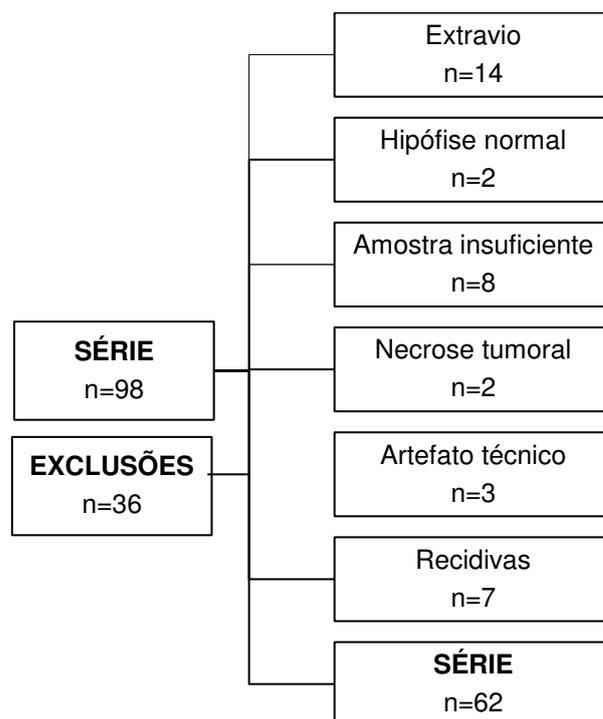
O estudo foi desenvolvido no período de outubro de 2015 a agosto de 2016, no Serviço de Endocrinologia, na Unidade de Anatomia Patológica, no Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica (LIME) e Centro de Pesquisa Clínica (CEPEC) do Hospital Universitário da Unidade Presidente Dutra, da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA).

4.3 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão Científica COMIC/HUUFMA com o parecer nº 006/2015 e Comitê de Ética em pesquisa CEP/HUUFMA, em atendimento à Resolução CNS nº 466/12, com parecer de aprovação de número: 1.293.972 e CAAE: 45445815.1.0000.5086.

4.4 Amostragem

Foi incluída, neste estudo, uma série de 98 pacientes com idade entre 16 a 73 anos, de ambos os sexos, que apresentaram diagnóstico de adenoma hipofisário, submetidos a procedimento cirúrgico pelo Serviço de Neurocirurgia, no período de 2008 a 2016, oriundos do Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – HUUFMA. Foram excluídos pacientes cujas amostras tumorais apresentaram artefato técnico, necrose tumoral, amostra insuficiente, amostras extraviadas, tecido normal e recidivas que impossibilitassem a realização da técnica (Figura 5).

Figura 5. Fluxograma

Fonte: HUUFMA – Dados trabalhados pelos autores, 2016.

4.5 Coleta da amostra

As amostras são tecidos tumorais, emblocados em parafina pelo Serviço de Patologia da Unidade de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - Hospital Presidente Dutra – HUUFMA. Estas foram resgatadas do arquivo da Unidade de Anatomia Patológica para realização da imuno-histoquímica.

4.6 Procedimento imuno-histoquímico

A análise da expressão da proteína p53 foi obtida através da reação imunoenzimática da streptoavidina-biotina-peroxidase. Este procedimento obedeceu ao seguinte protocolo: primeiramente foram obtidos cortes histológicos de 3µm do material emblocado em parafina, utilizando-se lâminas silanizadas. Em seguida, este material é acondicionado em estufa a 60°C para a retirada da parafina. No passo seguinte, realizou-se banho de xilol para remoção da parafina residual. Seguido da

hidratação do material com etanol absoluto, banhos em água corrente e água destilada.

A fase seguinte foi a recuperação antigênica com a incubação das lâminas em solução de TRIS-EDTA 10mM/1mM pH 9,0 ou Tampão de recuperação de antígeno 4 (Tampão TRIS-EDTA, pH 9.0, 100x concentrado) marca Spring Bioscience cod. PMB4®, em panela a vapor, seguido de resfriamento à temperatura ambiente e lavagens em água corrente e água destilada.

Em seguida realizou-se bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol. Seguidos de lavagens em água corrente e água destilada e lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4.

Realizou-se posteriormente a etapa do bloqueio de ligações inespecíficas com Cas Block™ (Invitrogen, EUA), com as lâminas acondicionadas em bandeja de incubação. Após o tempo concluído da incubação, escoou-se a proteína de bloqueio e aplicou-se com o anticorpo (Ac) primário. A incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) foi diluída (1:100) em solução de albumina bovina (BSA) (SIGMA, E.U.A.) a 1,0% e azida sódica NaN₃ (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida por 18 horas (overnight) a 4° C. Utilizou-se o anticorpo primário contra a p53, o anticorpo monoclonal de camundongo anti - proteína p53 humana, clone DO-7®, DAKO, cod. M7001.

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

Após a incubação over night, foram executadas lavagens em tampão PBS. Realizou-se a incubação com o Polímero HRP EP-12-20502 do Kit Easy Link One, Easy Path®, fabricado por Immunobioscience Corp. Em seguida a etapa denominada revelação, esta se realizou com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma®, E.U.A.) a 0,06%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (Labsynth®) a 1% em PBS a 37 °C. Após imunomarcção, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada.

A etapa após revelação constitui-se da contra coloração com Hematoxilina de Harris, e, em seguida, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido novamente de

lavagens em água corrente e água destilada. Segue-se com a desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto e a diafanização em banhos de xilol e montagem em meio permanente (Entellan Merck®) com lamínula. (BÁRTEK et al., 1991; VOJTĚŠEK et al., 1992; RAMAEL et al., 1992; COOPER et al., 1997; KONTOGEORGOS et al., 1999; NIEDER et al., 2001; adaptado).

4.7 Análise quantitativa da imunexpressão da p53

Os cortes histológicos foram devidamente selecionados para a técnica imuno-histoquímica a partir de preparações coradas pela hematoxilina e eosina (HE), de modo que fosse identificada a presença do adenoma, com a ausência de artefatos técnicos.

Alguns cortes (pacientes) foram excluídos por apresentar áreas em necrose tumoral, diminutos cortes que dificultaram a quantificação e tecido normal. Com a possibilidade de traduzir vieses na análise da imuno-histoquímica. Toda casuística submetida à técnica de IHQ foi realizada pelo mesmo pesquisador e analisadas por um único patologista.

A obtenção das imagens para a quantificação dos núcleos positivos fez-se através da captura em microscopia de luz acoplado a um sistema de câmara (Micro Axion Cam MRC – Zeiss®), nos quais os campos foram fotografados com objetiva de grande aumento para 40X (ampliação 40 vezes), em áreas de maior positividade. Estas foram transferidas para um sistema de computação que nos viabilizou o arquivamento das imagens, para a possível quantificação dos núcleos imunorreativos para p53. A imunorreatividade foi quantificada considerando 10 núcleos fortemente positivo por 10 campos de grande aumento de acordo com Trouillas et al. (2013).

4.8 Análise estatística

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel 2013® e a análise estatística dos resultados foi realizada no programa estatístico Stata 14.0. As associações entre a p53 e demais variáveis foram aplicadas o teste Qui-Quadrado. Na verificação da relação entre a média da idade e p53 foi aplicado o teste T de student. 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%.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da casuística

Foi analisada uma série de 62 pacientes portadores de adenomas hipofisários, dos quais 31 são do sexo feminino (50%), com a média de idade de 46, $20 \pm 13,3$ anos, na data de intervenção cirúrgica, com faixa etária variando entre 16 a 73 anos.

Quanto aos subtipos tumorais obtivemos 32 (51,6%) com ACNF, 22 (35,4%) pacientes com somatotropinoma, 6 (9,6%) pacientes com corticotropinoma e em menor número pacientes com prolactinoma 2 (3,23%).

Na avaliação morfométrica observou-se achados em maior número para adenomas gigantes 23 (37,1%) pacientes com predominância de macroadenomas em 34 (54,8%) pacientes e com 5 (8,06%) com microadenomas.

A imunopressão para proteína p53 foi observada em 8 (12,9%) pacientes.

O critério de invasão Knosp (grau 3 e 4) foi identificado em 16 (32%) pacientes e 34 (68%) não apresentaram invasão (grau 0 a 2) (Tabela 6 e 7).

Tabela 6. Caracterização demográfica da série de 62 pacientes com adenomas hipofisários. São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	N	%
Sexo		
Feminino	31	50
Masculino	31	50
Idade (anos)		
Até 30	6	9,6
Entre 31 e 40	17	27,4
Entre 41 e 49	14	22,5
Entre 50 e 59	14	22,5
60 ou mais	11	17,7
X \pm dp		46,20 \pm 13,03
Diagnostico		
ACNF	32	51,6
Somatotropinoma	22	35,4
Corticotropinoma	6	9,6
Prolactinoma	2	3,2
Morfometria		
Microadenoma	5	8,0
Macroadenoma	34	54,8
Adenoma Gigante	23	37,1
p53		
Positivo	8	12,9
Negativo	54	87,1
Invasão*/ Knosp		
Sim	16	32
Não	34	68
TOTAL	62	100

*Perda de dados. Fonte. HUUFMA – Dados trabalhados pelos autores, 2016.

Tabela 7. Perfil imuno-histoquímico de pacientes positivos para proteína p53 com adenoma hipofisários não invasivo de acordo com os critérios de classificação de Knosp (grau 0-2).

Nº	PACIENTES	SEXO	IDADE	DIAGNOSTICO	MORFOMETRIA	KNOSP
1	AH33	F	43	ACNF	Adenoma Gigante	1
2	AH61	M	35	Somatotropinoma	Adenoma Gigante	2
3	AH63	F	54	ACNF	Macroadenoma	1
4	AH65	F	74	ACNF	Adenoma Gigante	1
5	AH72	M	46	ACNF	Adenoma Gigante	1
6	AH75	M	27	ACNF	Macroadenoma	2
7	AH97	M	46	Somatotropinoma	Macroadenoma	1
8	AH102	F	40	Somatotropinoma	Macroadenoma	2

Fonte. HUUFMA – Dados trabalhados pelos autores, 2016.

5.2 Perfil imuno-histoquímico da proteína p53 em adenomas hipofisários.

Em nossa série de adenomas hipofisários obtivemos imunoeexpressão para p53 em 8 (12,9 %) pacientes. Dos quais 5 (15,6%) pacientes são portadores de ACNF e 3 (13,6%) somatotropinoma.

A morfometria apresentou-se em macroadenomas (11,7%) e adenomas gigantes (17,39%).

A classificação de Knosp para critério de invasão mostrou-se ausente em todos os 8 (12,9%) pacientes com imunoeexpressão para a proteína p53, com variantes para grau 0 a 2 (Tabela 8 e 9).

Tabela 8. Perfil imuno-histoquímico da proteína p53, na série de 62 pacientes com adenomas hipofisários. São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	p53		Valor de p
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Sexo			
Feminino	4 (50)	27 (50)	1,000
Masculino	4 (50)	27 (50)	
Idade (anos)			
Até 30	1 (12,5)	5 (9,2)	0,817
Entre 31 e 40	2 (25)	15 (27,7)	
Entre 41 e 49	3 (37,5)	11 (20,3)	
Entre 50 e 59	1 (12,5)	13 (24)	
60 ou mais	1 (12,5)	10 (18,5)	
$\bar{X} \pm dp$	45,2 \pm 13,9	45,6 \pm 12,6	0,4971 †
Diagnostico			
ACNF	5 (62,5)	27 (50)	0,704
Somatotropinoma	3 (37,5)	19 (35,1)	
Corticotropinoma	0 (0)	6 (11,1)	
Prolactinoma	0 (0)	2 (3,7)	
Morfometria			
Microadenoma	0 (0)	5 (9,2)	0,551
Macroadenoma	4 (50)	30 (55)	
Adenoma Gigante	4 (50)	19 (35)	
Invasão*/Knosp			
Sim (Grau 3 e 4)	0 (0)	16 (38,1)	0,034
Não (Grau 0 a 2)	8 (100)	26 (61,9)	
TOTAL	8 (12,90)	54 (87,10)	

† Teste T de Student; *Perda de dados.

Tabela 9. Relação de pacientes negativos para p53, com invasão de acordo com os critérios de classificação de Knosp (grau 3 e 4).

Nº	PACIENTES	SEXO	IDADE	DIAGNOSTICO	MORFOMETRIA	KNOSP
1	AH03	F	32	Somatotropinoma	Adenoma Gigante	3
2	AH14	M	62	ACNF	Adenoma Gigante	3
3	AH16	F	40	ACNF	Macroadenoma	4
4	AH41	F	17	Somatotropinoma	Adenoma Gigante	4
5	AH51	M	59	ACNF	Adenoma Gigante	3
6	AH59	M	40	Somatotropinoma	Macroadenoma	3
7	AH66	F	51	Somatotropinoma	Macroadenoma	3
8	AH68	F	50	ACNF	Macroadenoma	3
9	AH78	M	58	ACNF	Macroadenoma	3
10	AH86	F	53	Somatotropinoma	Microadenoma	3
11	AH87	M	68	ACNF	Macroadenoma	3
12	AH89	M	43	Prolactinoma	Adenoma Gigante	4
13	AH91	M	30	Somatotropinoma	Adenoma Gigante	4
14	AH92	F	54	ACNF	Adenoma Giagante	3
15	AH94	M	69	ACNF	Macroadenoma	3
16	AH95	F	35	ACNF	Adenoma gigante	3

Fonte. HUUFMA – Dados trabalhados pelos autores, 2016.

5.3 Caracterização demográfica de pacientes com adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes (ACNF) e sua relação com o perfil imunohistoquímico para proteína p53.

Analizamos uma série de 32 pacientes com ACNF, 14 (43,75%) eram do sexo feminino e 18 (56,25%) pacientes do sexo masculino com a média de idade de $50,20 \pm 12,9$ anos.

Entre os ACNF obtivemos imunoposição para proteína p53 em 5 (15,6%) pacientes. Quanto à avaliação morfométrica observou-se adenomas gigantes e em macroadenomas respectivamente em 16 (50%) pacientes.

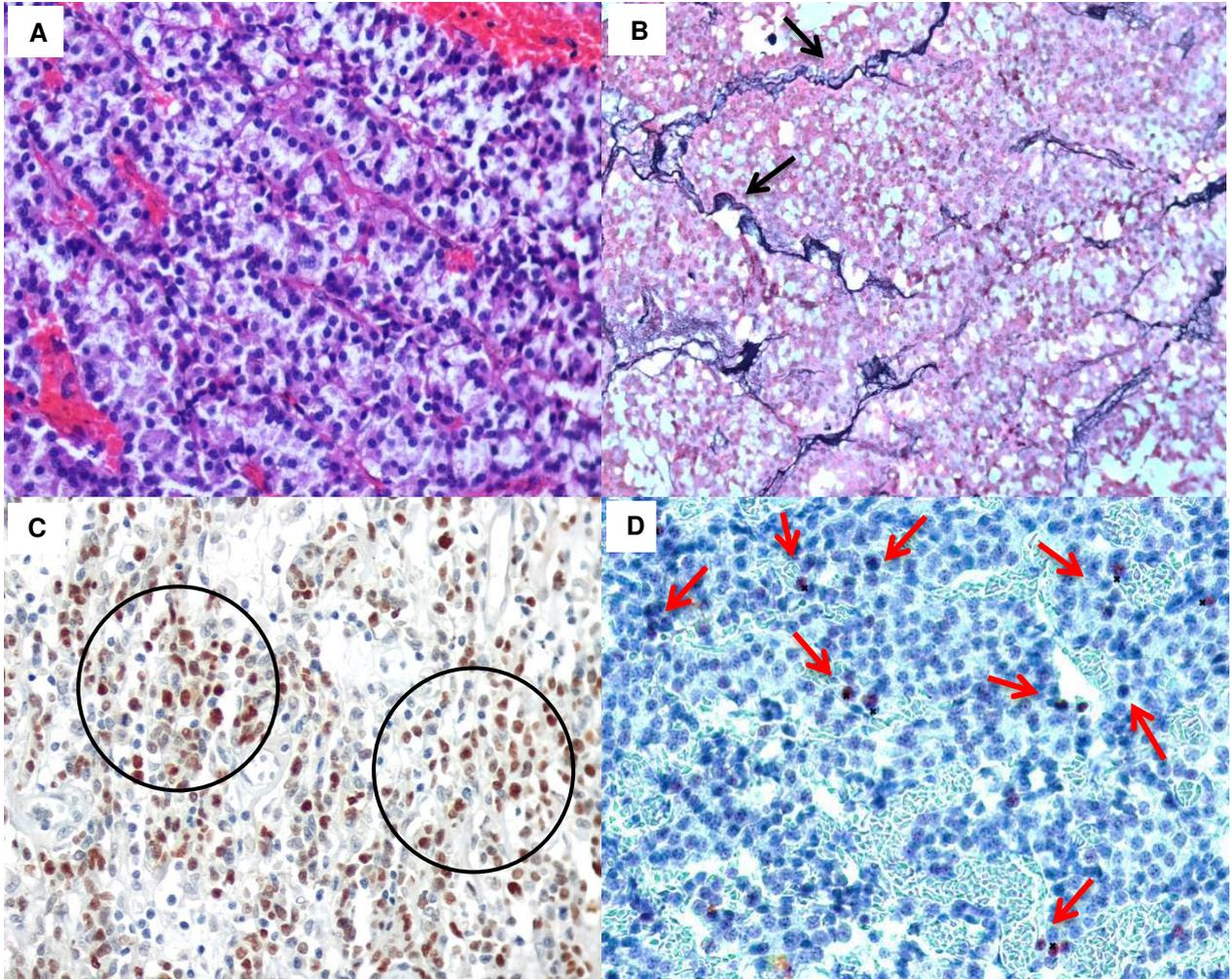
Os adenomas invasivos (Knosp 3 e 4) foram observados em 9 (34,6%) pacientes ACNF, no entanto 17 (65,38%) não apresentaram invasão (Tabela 10).

Tabela 10. Características demográficas e a imunoposição da p53 em pacientes com adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes (ACNF). São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	N	%
Sexo		
Feminino	14	43,7
Masculino	18	56,2
Idade (anos)		
Até 30	2	6,2
Entre 31 e 40	6	18,7
Entre 41 e 49	5	15,6
Entre 50 e 59	9	28,1
60 ou mais	10	31,2
$\bar{X} \pm dp$		$50,6 \pm 12,9$
p53		
Positivo	5	15,6
Negativo	27	84,3
Morfometria		
Macroadenoma	16	50
Adenoma Gigante	16	50
Invasão*/ Knosp		
Sim (Grau 3 e 4)	9	34,6
Não (Grau 0 a 2)	17	65,3
TOTAL	32	100

*Perda de dados.

Figura 6. Fotomicrografia de adenoma hipofisário clinicamente não funcionante – AH65. **A.** Coloração em HE, ampliação 400X. **B.** Técnica para fibras reticulínicas, ampliação 200X; **C.** Procedimento imuno-histoquímico: controle positivo: carcinoma colón humano com marcação para **anti - p53**, ampliação 400X; **D.** AH65 - ACFN forte imunoexpressão da p53, ampliação 400X.



Fonte: Dados trabalhados pelos autores, 2016.

5.4 Perfil imuno-histoquímico da p53 em pacientes com adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes (ACNF)

A imunoexpressão para proteína p53 em adenomas clinicamente não funcionantes foram identificados em 3 (21,4%) pacientes do sexo feminino e 2 (8,3%) do sexo masculino, com a média de idade de $49,2 \pm 17,0$ anos.

Nesta série de 5 pacientes positivos para p53, os achados morfométricos identificados foram 2 (12,5%) pacientes com macroadenoma, 3 (18,7%) pacientes com adenomas gigante.

Não houve invasão para os pacientes com ACNF positivos para p53 (Tabela 11).

Tabela 11. Perfil imuno-histoquímico da proteína p53, na série de 5 pacientes imunorreativos para o subtipo ACNFs . São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	p53		Valor de p
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Sexo			
Feminino	3 (60)	11 (40,7)	0,425
Masculino	2 (40)	16 (59,2)	
Idade (anos)			
Até 30	1 (20,00)	1 (3,7)	0,237
Entre 31 e 40	0 (0)	6 (22,2)	
Entre 41 e 49	2 (40)	3 (11,1)	
Entre 50 e 59	1 (20)	8 (29,6)	
60 ou mais	1 (20)	9 (33,3)	
X \pm dp	49,00 \pm 17,08	51,90 \pm 12,65	
Morfometria			
Macroadenoma	2 (40)	14 (51,8)	0,626
Adenoma Gigante	3 (60)	13 (48,1)	
Invasão*/Knosp			
Sim (Grau 3 e 4)	0 (0)	9 (33,3)	0,778
Não (Grau 0 a 2)	5 (100)	13 (66,6)	
TOTAL	5 (16,6)	27 (84,3)	

† Teste T de Student; *Perda de dados.

5.5 Caracterização demográfica de pacientes com somatotropinoma

Na série de 22 pacientes acromegálicos o estudo obteve 12 (54,5%) pacientes do sexo feminino e 10 (45,4%) pacientes do sexo masculino. Com morfometria para microadenoma em 3 (13,6%) pacientes, 14 (63,6%) pacientes com macroadenoma e 5 (22,7%) pacientes com adenoma gigante.

A imunopressão para a proteína p53 revelou-se em 3 (13,6%) pacientes. A invasão revelou-se em 6 (30%) pacientes obedecendo ao critério de Knosp (grau 3 e 4); Para Knosp 0 a 2, obtivemos 14 (70%) pacientes (Tabela 12).

Tabela 12. Características demográficas de pacientes portadores de somatotropinoma. São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	N	%
Sexo		
Feminino	12	54,5
Masculino	10	45,4
Idade (anos)		
Até 30	2	9,0
Entre 31 e 40	8	36,3
Entre 41 e 49	7	31,8
Entre 50 e 59	4	18,1
60 ou mais	1	4,5
Morfometria		
Microadenoma	3	13,6
Macroadenoma	14	63,6
Adenoma Gigante	5	22,7
p53		
Positivo	3	13,6
Negativo	19	86,3
Invasão*/Knosp		
Sim (Grau 3 e 4)	6	30
Não (Grau 0 a 2)	14	70
TOTAL	22	100

*Perda de dados.

5.6 Perfil imuno-histoquímico da proteína p53 em somatotropinoma e sua relação com as características demográficas

A imunoexpressão para proteína p53 em pacientes acromegálicos foi observada em 1 (8,3%) paciente do sexo feminino e 2 (16,6%) pacientes do sexo masculino, com a média de idade de 40,3±5,5 anos. Nesta série de 3 pacientes positivos para p53, 2 (14,2%) eram macroadenomas e 1 (20%) adenoma gigante. Não houve evidências de invasão (Knosp 0 a 2) (Tabela 13).

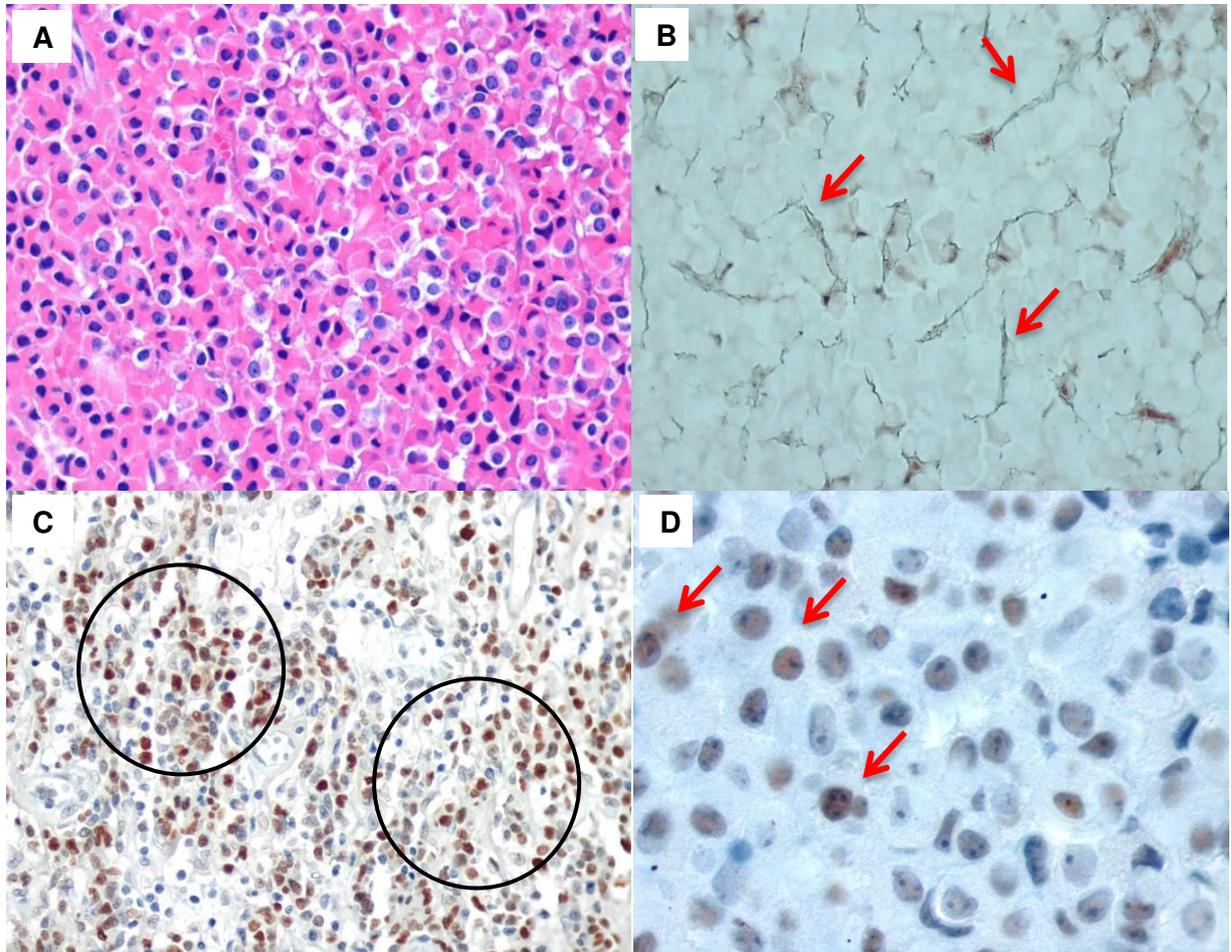
Tabela 13. Perfil imuno-histoquímico na série de 3 pacientes acromegálicos imunorreativos para proteína p53. São Luís, Maranhão, 2016.

Variáveis	P – 53		Valor de p
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Sexo			
Feminino	1 (33,3)	11 (57,8)	0,427
Masculino	2 (66,6)	8 (42,1)	
Idade (anos)			
Até 30	0 (0)	2 (10,5)	0,739
Entre 31 e 40	2 (66,6)	6 (31,5)	
Entre 41 e 49	1 (33,3)	6 (31,5)	
Entre 50 e 59	0 (0)	4 (21)	
60 ou mais	0 (0)	1 (5,2)	
$\bar{X} \pm dp$	40,3±5,5	42,4±10,4	0,6292 †
Morfometria			
Microadenoma	0 (0)	3 (15,7)	0,722
Macroadenoma	2 (66,6)	12 (63,1)	
Adenoma Gigante	1 (33,3)	4 (21)	
Invasão*/Knosp			
Sim (Grau 3 e 4)	0 (0)	6 (35,2)	0,219
Não (Grau 0 a 2)	3 (100)	11 (64,7)	
TOTAL	3 (13,64)	19 (86,36)	

† Teste T de Student; *Perda de dados.

A imunoexpressão da proteína p53 não revelou correlação estatisticamente significativa, quanto aos achados clínicos e características demográficas, tais como sexo ($p=1000$; $p=0,425$; $p=0,427$), idade ($p=0,817$; $0,237$; $p=0,739$), diagnóstico da p53 para os subtipos tumorais ($p=0,704$) e volume tumoral ($p=0,551$; $p=0,626$; $p=0,722$) (Tabelas 8,11 e 13) respectivamente. Houve significância em 16 (38,1%, $p=0,034$) pacientes negativos para p53 com comportamento invasivo de acordo com o sistema de classificação de Knosp (Tabela 8).

Figura 7. Fotomicrografias de adenomas hipofisários de paciente acromegálico – AH97. **A.** Coloração em HE, ampliação 400X. **B.** Técnica para fibras reticulínicas, ampliação 400X; **C.** Procedimento imuno-histoquímico: controle positivo: carcinoma colón humano com marcação para **anti - p53**, ampliação 400X; **D.** AH97 - ACFN forte imunoexpressão da p53, ampliação 400X.



Fonte. Dados trabalhados pelos autores, 2016.

6 DISCUSSÃO

Mutações no gene *p53* são anormalidades ou inativações gênicas mais frequentes no desenvolvimento de tumor humano, com evidências em mais de 50% dos tumores investigados. O gene *p53* codifica a proteína p53, sendo considerado um gene de supressão tumoral fundamental no evento de apoptose e defesa contra injúria tumoral, de modo que regula a transcrição do DNA permitindo que a proteína p53 realize o mecanismo de checagem dos erros espontâneos ou induzidos do DNA (LEVINE et al., 1991; MOLL et al., 2001).

Adenomas hipofisários são neoplasias geralmente benignas e indolentes, esses tumores são classificados clinicamente em funcionantes e não funcionantes. Muitos desses tumores comportam-se de forma invasiva, com alguns clinicamente agressivos (SCHEITHAUER et al., 1986; MEIJ et al., 2002; MCCORMACK et al., 2011; RAVEROT et al., 2012)

No presente estudo buscamos relacionar a imunexpressão da proteína p53 com os achados clínicos e características demográficas dos adenomas hipofisários. Assim, a incidência dos adenomas hipofisários em nosso estudo, quanto a variável sexo, ocorreu de forma igual em ambos os sexos (n=31/62, 50%), estando de acordo com várias publicações (KOVACS et al., 2001; EZZAT et al., 2004).

Os adenomas hipofisários quanto à idade ocorrem entre a terceira e sexta década; tais achados assemelham-se ao nosso estudo com maior incidência na terceira década de vida (SHAMIM et al., 2008).

O comportamento invasivo em adenomas hipofisários é definido como invasão de estruturas adjacentes à hipófise, como seios cavernosos e esfenoidais, confirmados por exames de imagens como tomografia computadorizada (TC) e em especial a RNM (DI LEVA et al., 2014).

No presente estudo, a técnica de imuno-histoquímica viabilizou achados para imunexpressão da proteína p53 em 8 de 62 (12,9%) pacientes com adenoma hipofisário. Os resultados nesse estudo foram predominante em ACNF (n=5/32, 15,6%) e em somatotropinomas (n=3/22, 13,6%). Tais adenomas hipofisários não apresentaram invasão, de acordo com o critério de classificação de Knosp. Esses achados compreendem macroadenomas e adenomas gigantes.

Thapar et al. (1996) não encontraram expressão da p53 em adenomas não invasivos, contudo registraram imunexpressão da p53 em 15% de adenomas

invasivos e 100% em carcinomas hipofisários metastáticos, em uma série de 70 pacientes com adenoma hipofisário.

Análogo ao nosso trabalho, Lloyd et al. (2004) obtiveram resultados negativos para p53 em adenomas não invasivos, mas a p53 foi expressa em cerca de 15% dos adenomas considerados invasivos.

Já o trabalho de Schreiber et al. (1999) diferentemente dos nossos achados, encontraram positividade da p53 em ACNF, com comportamento invasivo em torno de 20%, em uma série de 160 pacientes. Esses autores ressaltam que resultados negativos não excluem a possibilidade clínica do caráter invasivo. Diante desses dados, os autores sugerem ainda, a p53 como um marcador útil para validar comportamento agressivo em ACNF.

De modo semelhante aos nossos achados, Yarman et al. (2010) observaram que o comportamento invasivo dos ACNF, não estabelece qualquer correlação a imunoexpressão da p53.

No presente estudo o tamanho tumoral, demonstrou resultados para macroadenomas (n=34/62 54,8%) e adenomas gigantes (n=23/62 37,1%) com alta predominância para ACNF (50%). De acordo com dados epidemiológicos, os ACNF apresentam-se com um terço (1/3) dentre os vários subtipos tumorais, segundo Asa et al. (2001).

Ferreira et al. (2005), não obtiveram relação significativa da p53 e o volume tumoral em ACNF (n=39/117, 33,3%) pacientes. Esse estudo corrobora com os nossos achados em ACNF com p53 positivo (15,6%), sem nenhuma relação com o caráter invasivo, a despeito de serem macroadenomas.

A predominância dos ACNF com dimensões para macroadenomas são confirmados em outros trabalhos. Apesar de não evidenciarem clínica de hipersecreção hormonal, os mesmos são diagnosticados incidentalmente em cerca de 20% dos casos (MOLITCH, 2008; CARON, 2009).

Quanto aos achados para somatotropinomas, obtivemos resultados positivos para p53 (n=3/22, 13,6%), em consonância com os nossos resultados, Botelho et al. (2006) encontraram expressão da p53 em seu trabalho (n=3, 7,8%).

Os achados de Alimohamadi et al. (2014) identificaram que houve diferença significativa quanto a imunoexpressão da p53 em macroadenomas produtores de GH e pacientes do sexo masculino em uma série de 47 pacientes. No presente estudo não houve relação significativa nessa população.

Nossos resultados para prolactinomas foram todos negativos para p53, com cinquenta por cento ($n=1/2$, 50%) de achados para comportamento invasivo. Importante ressaltar que a nossa amostra para este tipo tumoral revelou-se diminuta ($n=2/62$, 3,2%) com 100% dos casos, que eram do sexo masculino.

Contrário ao presente estudo Botelho et al. (2006) obtiveram imunoexpressão da p53 em prolactinomas ($n=9/38$ 23,7%). Ainda para esse tipo tumoral, os estudos realizados por Wierinckx et al. (2007) obtiveram resultados positivos para a expressão da p53 em prolactinomas com caráter invasivo e agressivo ($n=4/25$, 16%).

Já, Müller et al. (1999) estudaram pacientes com somatotropinoma, adenomas pluri-hormonais e adenomas produtores de PRL, obtendo imunoexpressão negativa para p53 em todos os casos, o que difere dos nossos resultados.

Quanto aos corticotropinomas, Buckley et al. (1994) obtiveram a imunoexpressão da p53 em 16% de sua amostra em corticotropinomas (doença de Cushing) ($n=2/4$) e ACNF ($n=4/15$). Outro achado importante foi o de Levy et al. (1994) no qual observaram a imunoexpressão da p53 ($n=4/29$), também em corticotropinomas, com evidências de adenomas não invasivos.

No presente estudo não encontramos imunoexpressão da p53 em corticotropinomas (11,1%), assim como nenhuma evidência de comportamento invasivo. Já, Gejman et al. (2008) relataram achados para imunoexpressão da p53 em microadenoma produtor de ACTH em 1 paciente, em 1999, Suhardja et al encontraram imunoexpressão positiva para p53 em mais de 60% de corticotropinomas, revelando uma incidência elevada em comparação aos nossos achados.

Os achados de Suliman et al. (2000) de forma semelhante ao presente estudo, avaliaram a imunoexpressão da p53 em 40 adenomas hipofisários, dos quais 24 amostras foram positivas, mas sem evidências de invasão de acordo com os critérios de classificação de Knosp.

Em nosso trabalho 16 (38%) pacientes apresentaram invasão ($n=9$, 21,4% ACNF; $n=6$, 14,3% GH e $n=1$, 2,3% PRL), de acordo com os critérios de classificação de Knosp, com base em RNM, mas negativos para proteína p53. Bassarova et al. (1998) ressaltam que resultados negativos para p53, não impossibilitam achados de comportamento invasivo e agressivo.

Contudo, a expressão da p53, no presente estudo, considerada uma amostragem pequena, não evidenciou relação estatisticamente significativa, mas os nossos resultados corroboram com vários achados relatados na literatura.

7 CONCLUSÃO

A imunexpressão da proteína p53 mostrou-se em 8 (12,9%) pacientes, uma frequência que está de acordo com as descritas na literatura;

Não houve associação estatisticamente significativa da imunexpressão da p53, quanto às variáveis sexo, idade, tamanho do tumor e comportamento invasivo;

Houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,034$) em relação aos adenomas hipofisários negativos para p53 e invasivos;

Assim, podemos ainda concluir que casos invasivos poderiam ser classificados equivocadamente como não invasivos, o que seria justificado pelas limitações da classificação;

Resultados negativos para p53 não invalidam achados para o comportamento invasivo do tumor;

Os achados do presente estudo corroboram com publicações anteriores para baixa imunexpressão da p53, assim como para os achados clínicos e características demográficas;

Faz-se necessário a continuidade do estudo a fim de obter números mais expressivos, de forma que a análise da imunexpressão da p53 seja efetiva quanto ao real valor prognóstico em adenomas hipofisários.

REFERENCIAS

AFLOREI, E.D.; KORBONITS, M. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. **J Neurooncol.**, v.117, p. 379-94, 2014.

ALHOSEINI, M.S.; MOVAGHAR, V.R. Pituitary adenomas: A Review. **Journ of In and Viol**, v.4, p. 56, 2012.

ALIMOHAMADI, M. et al. The impact of immunohistochemical markes of Ki-67 and p53 on the long-term outcome of growth hormone-secreting pituitary adenomas: a cohort study. **Asian J Neurosurg**, v.9, n. 3, p: 130-6, 2014.

ALVES, M; PAIVA, I; BELO, F; REBELO, O; BASTOS, M; CARVALHEIRO, M. Adenoma atípico da hipófise ou corticotrofinoma maligno? **Acta Med Port.**, v.24 (S3), p:661-666, 2011.

AL-SHRAIM M, ASA SL: The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: What is new? *Acta Neuropathol* 2006;111: 1–7

AMATO, M.C.M.A. **Manual do Médico Generalista**. Na Era do Conhecimento. v.11, Roca, 2014.

ARAFAH, B.M.; NASRALLAH, M.P. Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. **Endocrine Related Cancer**; v.8, n.4, p:287-305, 2001.

ASA, S.L; EZZAT, S. The pathogenesis of pituitary tumors. **Annu Rev Pathol Mech Dis.**, v.4, p.97-126, 2009.

ASA, S.L.; HORVATH, E.; KOVACS, K.T. Functional pituitary anatomy and histology. In: Melmed S. **Endocrinology**. 4^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p.168-182.

ASA, S.L.; METE, O. A history of pituitary pathology. **Endocrine Pathol.**; v.25, n.1, p:6–11, 2014.

BANCROFT, J.D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 6th ed. London: Churchill Livingstone; 2008.

BARBOSA, E.R. et al. Controle hormonal dos adenomas hipofisários pela cirurgia transesfenoidal: evolução dos resultados nos primeiros cinco anos de experiência. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 55, p. 16-28, 2011.

BASSO, A.M.M. et al. Aplicações Biotecnológicas dos Transgênicos na Área de Saúde. **Acta Monographica**, v. 2010, n. 2, 2010.

BASSAROVA, A.V.; POPOV, A.A. Immunohistochemical detection of p53—effect of fixation and methods of antigen retrieval. **Folia Histochem Cytobiol.**, v.36, n.3, p:127–132, 1998.

BOTELHO, C.H. A., et al. Expression of p53, Ki-67 and c-erb B2 in growth hormone-and/or prolactin-secreting pituitary adenomas. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v.64, n.1, p: 60-66, 2006.

BOTELHO, C.H.A et al. A diagnostic marker set for invasion, proliferation and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocrine-Related Cancer*; v.14, p: 887–900, 2007.

BLOCH, D.R. **Organic chemistry demystified**. New York: McGraw-Hill; 2006. Disponível em: <<http://site.ebrary.com/id/10155018>.> Acesso: 08 de Agosto de 2016.

BRATTHAUER, G.L. The Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Method. In: JAVOIS, L.C., ed. **Immunocytochemical Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. Humana Press; p:165–173, 1995.

BRUMBAUGH, K.; JOHNSON, W.; LIAO, W.C. et al. Overview of the Generation, Validation, and Application of Phosphosite-Specific Antibodies. In: KALYUZHNY, A.E., ed. **Signal Transduction Immunohistochemistry**. Methods in Molecular Biology. Humana Press; p:3-43, 2011.

BUCKLEY, N. et al. p53 Protein accumulates in Cushing's adenomas and invasive non-functional adenomas. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.79, n.5, p: 1513-1516, 1994.

BUCHFELDER, M. Gestão dos adenomas hipofisários agressivos: estratégias de tratamento atuais. **Pituitária**.; v.12, p :256-60, 2009.

CARNEIRO, L. E. P. et al. Os anticorpos e seus fragmentos na imunoterapia contra o câncer. **Revista Faciderv.**, v.1, n.1, 2012.

CARSON, F.L.; HLADIK, C. **Histotechnology: A Self-Instructional Text**. 3rd Edition. Chicago: American Society for Clinical Pathology; 2009.

CHANSON, P.; SALENAVE, S.; KAMENICKY, P.; CAZABAT, L.; YOUNG, J. *Pituitary tumours: acromegaly*. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.**, v.23, p: 555-574, 2009.

CHANSON, P.; SALENAVE, S. Metabolic Syndrome In Cushing's Syndrome. **Neuroendocrinology**.; v.92, p:96-101, 2010.

CHEN, L.; WHITE, W.L.; SPETZLER, R.F.; XU, B. A prospective study of nonfunctioning pituitary adenomas: presentation, management, and clinical outcome. **J Neurooncol.**; v.102, p:129, 2012.

CLAYTON, R.N.; RASKAUSKIENE, D.; REULEN, R.C, JONES PW. Mortality and morbidity in Cushing's disease over 50 years in Stoke-on-Trent, UK: audit and meta-analysis of literature. *J Clin Endocrinol Metab.*; v.96, p:632-42, 2011.

COLAO, A. et al. Medical therapy of pituitary adenomas: effects on tumor shrinkage. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 10, n. 2, p. 111-23, Jun 2009.

COLAO, A. SAVASTANO, S. Medical treatment of prolactinomas. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 7, p. 267-78, 2011.

COOPER, O.; MELMED, S. Subclinical hyperfunctioning pituitaryadenomas: the silent tumors. **Best Pract Res Clin Endocrinol. Metab.** ; v.26, p:447-60, 2012.

COSTENARO, F.; RODRIGUES, T.C.; ROLLIN, G.A.F.; CZEPIELEWSKI, M.A. Avaliação do eixo hipotálamo-hipófise adrenal no diagnóstico e na da doença de Cushing. **Arq Bras Endocrinol Metab.**; v.56, n.3, p:159-67, 2012.

COPSTEAD, L.E.; BANASIK, J.L. **Pathophysiology**. St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier; 2010.

COTTIER, J.P.; DESTRIEUX, C.; BRUNEREAU, L.; BERTRAND, P.; MOREAU, L.; JAN, M. et al. Cavernous sinus invasion by pituitary adenoma: MR imaging. **Radiology**, v.215, p:463–469, 2000.

COSTA, E.A.; VASCONCELOS, A.C.; BOMFIM, M.R.Q.; AMORIM, H.B.; LIMA, G.B.L.; COELHO, F.M.; RESENDE, M. Neurological disorder in cattle associated with bovine herpesvirus 4. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 4, p. 828– 835, 2011.

CUSIMANO, M. D. et al. Outcomes of surgically treated giant pituitary tumours. **Can. J. Neurol. Sci.**, v.39, p: 446–457, 2012.

DABBS, D. **Diagnostic Immunohistochemistry, 2e**. 2nd ed. Churchill Livingstone; 2006.

DALY, A.F.; RIXHON, M.; ADAM, C.; DEMPEGIOTI, A.; TICHOMIROWA, M.A.; BECKERS, A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**; v.91, n.12, p:4769-75, 2006.

DAKO. **Immunohistochemical staining methods**. 5a edição. Kumar G, Rudbeck L, eds. Carpinteria: Dako; 2009.

DAITA, G; YONEMASU, Y; NAKAI, H; TAKEI, H; OGAWA, K. Cavernous sinus invasion of pituitaryadenomas: Relationship between magnetic resonance imaging findings and histologically verified dural invasion. **Neurol Med Chir.**, v. 35, p.17-21, 1995.

DE LIMA, D. S. et al. SAGE analysis highlights the putative role of underexpression of ribosomal proteins in GH-secreting pituitary adenomas. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 167, n. 6, p. 759-768, 2012.

DI IEVA, A. et al. The subdiaphragmatic cistern: historic and radioanatomic findings. **Acta Neurochir. (Wien)**, v.154, p: 667–674, 2012.

DUARTE, F.H.G. et al. Tumores hipofisários secretores de TSH: relato de dois casos e revisão da literatura. **Arq Bras Endocrinol. Metab**, v. 53, p. 1157 -1166, 2009.

DWORAKOWSKA, D.; GROSSMAN, A.B. The pathophysiology of pituitary adenomas. **Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism.**; v.23, n.5, p:525-41, 2009.

EERDEN, A.W.; HEIJER, M.; OYEN, W.J; HERMUS, A.R. Cushing's syndrome and bone mineral density: lowest Z scores in young patients. **The journal of Medicine**, England, v. 65, n. 4, p. 137-141, 2007.

ELANGO, A.; SHEPHER,D.B.; CHEN, T.T. Effects of endocrine disrupters on the expression of growth hormone and prolactin mRNA in the rainbow trout pituitary. **Gen Comp Endocrinol.**, jan; v.145, n.2, p:116-27, 2006.

ELLEDEGE, S.J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science**; v.274, n.5293, p:1664-72, 1996.

ERICKSON, D., et al. Silent subtype 3 pituitary adenoma: a clinicopathologic analysis of the Mayo Clinic experience. **Clinical endocrinology**, v.71, n.1, p: 92-99, 2009.

EZZAT, S.; ASA, S.L.; COULDWELL, W.T et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. **Cancer**; v.101, p:613, 2004.

FAGLIA, G.; SPADA, A. Genesis of pituitary adenomas; state of the art. **J Neurooncol.**; Sep,v.54, n.2, p:95-110, 2001.

FAHLBUSCH, R.; BUSLEI, R. The WHO classification of pituitary tumours: a combined neurosurgical and neuropathological view. **Acta Neuropathol.**; v.111, p:86-7, 2006.

FASSNACHT, M. et al. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. **Nature Reviews Endocrinology**, v.7, n.6, p: 323-335, 2011.

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, p.377-382, 2010.

FERRAZ, M.L.C.G.; ANDRIOLO, A. **Marcadores Tumorais Bioquímicos.** Disponível: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=10>. Acesso em 22 de julho de 2016.

FERREIRA, C.; ROCHA, J. **Oncologia Molecular.** Editora Atheneu, São Paulo, 2010.

FERREIRA, J.E. et al. Funcionamento não adenomas hipofisários: características clínicas e imuno-histoquímica. **Arq Bras Endocrinol Metab** ; v.63, p:1070-8, 2005.

FRYSTYK, J.; FREDA, P.; CLEMMONS, D.R. The current status of IGF-I assays—a 2009 update. **Growth Hormone & IGF Research**, v.20, n.1, p: 8-18, 2010.

GAGLIANO, T.; FILIERI, C.; MINOIA, M.; BURATTO, M.; TAGLIATI, F.; AMBROSIO, M.R. et al. Cabergoline reduz a viabilidade celular em adenomas hipofisários não

funcionamento por inibição da secreção de fator de crescimento endotelial vascular. **Pituitária.**; v.16, p: 91-100, 2013.

GANDOUR-EDWARDS, Regina, et al. Biologic markers of invasive pituitary adenomas involving the sphenoid sinus. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v.8, n.2, p: 160-164, 1995.

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.38, n.4, p:765–770, 2008.

GEORGE, D. H. et al Crooke's cell adenoma of the pituitary: an aggressive variant of corticotroph adenoma. **Am. J. Surg. Pathol.**, v.27, p:1330–1336, 2003.

GRIMELIUS L. et al. Parathyroid adenoma. IN: DELELLIS, R.A; LLOYD, R.V.; HEITZ, P.U. et al. (eds.). **Pathology and genetics: tumours of endocrine organs, WHO classification of tumour**. IARC Press, Lyon, France, p 128-132, 2004.

GODIM, J.A; DE ALMEIDA, J. P; DE ALBUQUERQUE, L.A; SCHOPS, M; GOMES, E; FERRAZ, T. Headache associated with pituitary. **J Headache Pain.**, v.10, p. 15-20, 2009.

GOLD, E.B. Epidemiology of pituitary adenomas. **Epidemiol. Rev.**; v. 3, p:163–183, 1981.

GOMES, M. L. V. **Tumores da hipófise: contribuição do estudo clínico e molecular para o conhecimento da patogenia e comportamento biológico dos tumores clinicamente não funcionastes**. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra 2011.

GREENMAN, Y.; STERN, N. Non-functioning pituitary adenomas. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.**; v.23, p:625-38, 2009.

HE, Guangan, et al. Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. **Oncogene**, v.24, n.18, p: 2929-2943, 2005.

HENTSCHEL, Stephen J., et al. P53 and MIB-1 immunohistochemistry as predictors of the clinical behavior of nonfunctioning pituitary adenomas. **Canadian Journal of Neurological Sciences/Journal Canadien des Sciences Neurologiques**, v.30, n.3, p: 215-219, 2003.

HOLDAWAY, I.M. et al. A meta-analysis of the effect of lowering serum levels and IGF-I on mortality in acromegaly. **Eur. J. Endocrinol.**, v.159, p:89-95, 2008.

HOSOYAMA, T. et al. A postnatal pax7 progenitor gives rise to pituitary adenoma **Genes Cancer**. v. 1, p. 388–1402, 2010.

INÁCIO, J. DE C. **Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos de células-tronco adulta de origem humana e de coelho**. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 2011.

IRONSIDE, J.W. Best Practice No 172: pituitary gland pathology. **J Clin Pathol.**, v.56, n.8, p:561-8, 2003.

JAFFRAIN-REA, Marie-Lise; ROTONDI, Sandra; ALESSE, Edoardo. **New insights in the pathogenesis of pituitary tumours**. Hot topics in endocrine and endocrine-related diseases. Intech, chapter 2, p: 27-84, 2013.

KATZNELSON, L. Approach to the patient with persistent acromegaly after pituitary surgery. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**; v.95, p: 4114-23, 2010.

KHALED AL-DAHMANI, S.M et al. Massas selares: um estudo epidemiológico. **Canadian Journal of Neurological Sciences / Jornal Canadien des Sciences Neurologiques**, 43, pp 291-297, 2016.

KLIBANSKY, A. Prolactinomas. **N Engl J Med**, n. 362, p. 1219-1226, 2010.

KNOSP, E; KITZ K; STEINER E. Pituitary adenomas with parasellar invasion. **Acta Neurochir Suppl (Wien)**, v. 53, p. 65-71, 1991.

KONTOGEOGOS, G. Innovations and controversies in the WHO classification of pituitary adenomas. **Acta Neuropathol (Berl)**.; v.111, n.1, p:73-5, 2006.

KORBONITS, M.; CARLSEN, E. Recent clinical and pathophysiological advances in non-functioning pituitary adenomas. **Horm Res.**; v.71, p:123-30, 2009.

KRONENBERG, H.M.; MELMED, S.; POLONSKY, K.S.; LARSEN, P.R. Anterior pituitary. IN: **Williams textbook of endocrinology**. Canada: Saunders Elsevier; p.155–261, 2008.

KURSTAK, E.; TIJSSEN, P.; KURSTAK, C.; MORISSET, R. Enzyme immunoassays and related procedures in diagnostic medical virology. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 64, n. 3, p. 465–479, 1986.

Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular. Disponível em: <http://labs.icb.ufmg.br/>. Acesso em 06 de junho de 2016.

LACERDA, Afonso Henrique Bevilacqua Baleeiro. **Análise dos casos de agromegalia do Hospital Governador Celso Ramos**. Monografia. Universidade Federal de Santa Catarina. Curso de Medicina. Departamento de Clínica Cirúrgica. 2011.

LAMBERTS, S.W.; HOFLAND, L.J. Future treatment strategies of aggressive pituitary tumors. **Pituitary**; v.12, p:261-4, 2009.

LEVINE, A.J.; MOMAND, J.; FINLAY, C.A. The p53 tumor suppressor gene. **Nature**; v.351, n.6326, p: 453-6, 1991.

LEVY, A. et al. p53 gene mutations in pituitary adenomas: rare events. **Clinical Endocrinology**, v.41, n.6, p: 809-814, 1994.

LIN, Y.; JIANG, X.; SHEN, Y.; LI, M.; MA, H.; XING, M.; LU, Y. Mutações frequentes e amplificações do gene PIK3CA em tumores hipofisários. **Endocr Câncer Relat**; v.16, p: 301-310, 2009.

LLOYD, R.V. Pituitary tumors. IN: WHO. **Classification of Tumors of the Endocrine Organs**: Pathology and Genetics of Endocrine Organs. Lyon, IARC Press, 2004.

LOSA, M.; MORTINI, P.; BARZAGHI, R.; RIBOTTO, P.; TERRENI, M.R.; MARZOLI, S.B. et al. Early results of surgery in patients with nonfunctioning pituitary adenoma and analysis of the risk of tumor recurrence. **J Neurosurg.**; v.108, p:525–32, 2008.

LUGO, G.; PENA, L.; CORDIDO, F. Clinical manifestations and diagnosis of acromegaly. **International journal of endocrinology**, v. 2012, p:1-10, 2012.

LÜBKE, D.; SAEGER, W.; LÜDECKE, D.K. Proliferation markers and EGF in ACTH secreting adenomas and carcinomas of the pituitary. **Endocrine Pathology**, v.5, p: 45-55, 1995.

MACLACHLAN, N.; DUBOVI, E.J. **Fenner's veterinary virology**. 4. ed. London: Academic Press, 2011, 534 p.

MANORANJAN, B. et al. Estrogen receptors alpha and beta immunohistochemical expression: clinicopathological correlations in pituitary adenomas. **Anticancer Resv.** v.30, p. 2897–2904, 2010.

MANCINI, T; CASANUEVA, FF; GIUSTINA, A. Hyperprolactinemia and Prolactinomas. **Endocrinology and Metabolism Clinics North America**; v. 37, p. 67–99, 2008.

MARKO, N.F.; WEIL, R.J. Glândula pituitária: novos caminhos na patogênese dos adenomas hipofisários. **Nat Rev Endocrinol.**; v.8, p:572-573, 2012.

MAK, T.W.; SAUNDERS, M.E. **Primer to The immune response**. Amsterdam; Boston: Elsevier; 2011

MEIJ, B. P.; LOPES, M. B.; ELLEGALA, D. B.; ALDEN, T. D.; LAWS, E. R. JR. The long-term significance of microscopic dural invasion in 354 patients with pituitary adenomas treated with transsphenoidal surgery. **J. Neurosurg.**, v.96, p:195–208, 2002

MELMED, S. Medical progress: Acromegaly. **N. Eng. J. Med.**, v. 335, p: 2558-73, 2006.

_____. Acromegaly pathogenesis and treatment. **J. Clin. Invest.**; v.119, p: 3189-02, 2009.

_____. Patogênese dos tumores hipofisários. **Rev Endocrinol.**; v.7, p:257-266, 2011.

MELMED, S. et al. Diagnosis & Treatment of Hyperprolactinemia: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **Journal Clinical Endocrinology Metab.**; v. 96, p. 273–288, 2011.

MELMED, S; JAMESON, J.L. Distúrbios da adenohipófise e do hipotálamo. In: BRAUNWALD, E. et al. **Medicina interna de Harrison**. 18ª ed., cap. 339, p. 287-290. New York: Mc Graw-Hill, 2013.

MENDES, Brena Barros; BASTOS, Lorena Gomes; CARNEIRO, Cristiene Costa. Adenoma hipofisário: correlação clínica, laboratorial e radiológica. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.13, n.1, p: 256-269, 2015.

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

METE, O.; EZZAT, S; ASA, S. L. Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. **J. Mol. Endocrinol.** 49, R69–R78, 2012.

MICHAELIS, K.A.; KNOX, A.J.; XU, M, et al. Identification of growth arrest and DNA-damage-inducible gene beta (GADD45beta) as a novel tumor suppressor in pituitary gonadotrope tumors. **Endocrinology**.; v.152, n.10, p:3603–3613, 2011.

MILANO, J.B. **Estudo das alterações em exame de ressonância magnética de pacientes em pós-operatório imediato de ressecção de tumores hipofisários por via transesfenoidal**. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade DE São Paulo. São Paulo, 2010.

MOLITCH, M.E. Hipófise Anterior. In: GOLDMAN, L.; SCHAFER, A.I.C. **Tratado de Medicina Interna**. 24ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. cap. 231, p. 1643-1658.

MONTEIRO, M.L.; ZAMBON, B.K.; CUNHA, L.P. Predictive factors for the development of visual loss in patients with pituitary macroadenomas and for visual recovery after optic pathway decompression. **Can J Ophthalmol.**; v.45, n.4, p:404-408, 2010.

MÜLLER, W.; SAEGER, W.; WELLHAUSEN, L.; DERWAHL, K.M.; HAMACHER, C.; LUDECKE, D.K. Markers of function and proliferation in non-invasive and invasive bi- and plurihormonal adenomas of patients with acromegaly: an immunohistochemical study. **Pathology, Research and Practice**, v.195, p: 595-603, 1999.

MUSAT, M; MORRIS, D.G; KORBONITS M, GROSSMAN, A.B. Cyclins and their related proteins in pituitary tumorigenesis. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 326, p. 25-29, 2010.

MUSAT, M.; VAX, V.V.; BORBOLI, N.; GUEORGUIEV, M.; BONNER, S.; KORBONIT S, M.; GROSSMAN, A.B. Celular ciclo de desregulação na hipófise oncogênese. **Frente Horm Res.**; v.32, p: 34-62, 2004.

NETO, V. Recomendações do Departamento de Neuroendocrinologia da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia para o diagnóstico e tratamento da acromegalia no Brasil. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.55, n.2, p: 91-105, 2011.

NIEMAN, L.K.; BILLER, B.M.; FINDLING, J.W.; NEWELL-PRICE, J.; SAVAGE, M.O.; STEWART, P.M., et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **J Clin Endocrinol Metab.**; v.93, p:1526-40, 2008.

NISHIOKA, H.; INOSHITA, N.; SANO, T.; FUKUHARA, N.; YAMADA, S. Correlation between histological subtypes and MRI findings in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. **Endocr Pathol.**; v.23, p:151-6, 2012.

NOSÉ, V. Pituitary adenomas: a practical guide for diagnosis. **Endocr Pathol.**, v.21, p.54-55, 2010.

ONCOLOGY ENCYCLOPEDIA. Disponível em: <http://oncolex.org>. Acesso em 10 de junho de 2016.

ORIJÄ, I.B.; WEIL, R.J.; HAMRAHIAN, A.H. Pituitary incidentaloma. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.**; v.26, p:47-68, 2012.

PALMIERI, D.; D'ANGELO, D.; VALENTINO, T.; DE MARTINO, I.; FERRARO, A; WIERINCKX, A et al. Downregulation of HMGA-targeting microRNAs has a critical role in human pituitary tumorigenesis. **Oncogene.**; v.31, p:385-65, 2012.

PAMPALONA, J.; FRÍAS, C.; GENESCÀ, A.; TUSELL, L. Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e1002679, 2012.

PASKULIN, D. D; PAIXÃO-CÔRTEZ, V. R; HAINAUT, P; BORTOLINI, M. C; Ashton-Prolla, P. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 939-946, 2012.

PLATTA, C.S.; MACKAY, C.; WELSH, J.S: Pituitary adenoma: a radiotherapeutic perspective. **Am J Clin Oncol.**; v.33, p:408-419, 2010

PERTUIT, M.; ROMANO, D.; ZEILLER, C.; BARLIER, A.; ENJALBERT, A.; GERARD C. The gsp oncogene disrupts Ras/ERK-dependent prolactin gene regulation in gsp inducible somatotroph cell line. **Endocrinology**; v.152, n.4, p:1234-43, 2011.

QUEREDA, V.; MALUMBERS, M. Cell cycle control of pituitary development and disease. **J Mol Endocrinol.**; v.42, p:75-86, 2009.

RAAPPANA, A.; KOIVUKANGAS, J.; EBELING, T.; PIRILÄ, T. Incidence of pituitary adenomas in Northern Finland in 1992-2007. **J Clin Endocrinol Metab.**; v.9, n.5, p:4268-4275, 2010.

RAVEROT, G.; JOUANNEAU, E.; TROUILLAS, J. Clinic pathological classification and molecular markers of pituitary tumours for personalized therapeutic strategies. **Eur. J. Endocrinol.**, v.170, p:121-132, 2014.

RAVEROT, G., et al. Prognostic factors in prolactin pituitary tumors: clinical, histological, and molecular data from a series of 94 patients with a long postoperative follow-up. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.**, v.95, n.4, p:1708-1716, 2010.

RITZEL, K.; BEUSCHLEIN, F.; MICKISCH, A.; OSSWALD, A.; SCBEIDER, H.J.; SCHOPOHL, J.; REINCKE, M. Clinical review: Outcome of bilateral adrenalectomy in Cushing's syndrome: a systematic review. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.**; v.98, p:3939-3948, 2013.

ROCHA, R.M.; MILLER, K.; SOARES, F.; SCHENKA, N.; VASSALLO, J.; GOBBI, H. Biotin-free systems provide stronger immunohistochemical signal in oestrogen receptor evaluation of breast cancer. **J Clin Pathol.**; v.62, n.8, p:699-704, 2009.

ROITT, I.M. **Roitt's essential immunology**. Malden, Mass.: Wiley-Blackwell Pub.; 2011.

SAEGER, W.; LÜDECKE, D.K.; BUCHFELDER, M.; FAHLBUSCH, R.; QUABBE, H.J.; PETERSENN, S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. **Eur J Endocrinol.**, v.156, p:203-216, 2007.

SALEHI, F. et al. Biomarkers of pituitary neoplasms: a review (Part II). **Neurosurgery** **67**, p:1790-1798, 2010.

SALGADO, L. R; BOGUSZEWSKI, C.L; CZEPIELEWSKI, M.A. *Hipófise: glândula fundamental em endocrinologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. 457 p.

SANTOS, R.W.V.; ROCHA, S.P.L.; ALVES, A.P.; CALDATO, M.C.F. Co-secretion of growth hormone in patients with prolactinoma. **Rev. para. Med.**, v.26, n.2, 2012.

SCHEITHAUER, B.W; KOVACS, K.T; LAWS, E.R JR; RANDALL, R.V. Pathology of invasive pituitary tumors with special reference to functional classification. **J Neurosurger.**, v. 65, p. 733-744, 1986.

SCHREIBER, S; SAEGER, W; LUDECKE, D.K. Proliferation markers in different types of clinically non-secreting pituitary adenomas. **Pituitary.**; v. 1, p.213-220, 1999.

SHAMIM, M.S.; BARI, M.E.; KHURSHEED, F.; JOOMA, R.; ENAM, S.A. Pituitary adenomas: presentations and outcomes in a South Asian country. **Can J Neurol Sci.**; v.35, n.2, p.198-203, 2008.

SHI, X.; TAO, B.; ELE, H.; SUN, Q.; FAN, C.; BIAN, L.; ZHAO, W.; LU, Y.C. Rede baseada em MicroRNAs: um novo agente terapêutico em adenoma pituitário. **Med hipóteses**; v. 78, p : 380-89, 2012.

SILVA, A.M. et al. Assessment of macroprolactinemia by polyethylene glycol precipitation method. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v.9, n.1, p: 25-28, 2014.

SNYDER, P.J. Gonadotroph cell adenomas. In: MELMED S, ed. **The Pituitary**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier; 2011:637-651. Pituitary Adenomas: An Overview, 2013.

SULIMAN, M.; ROYDS, J.; CULLEN, D.; TIMPERLEY, W.; POWELL, T.; BATTERSBY, R.; JONES, T.H. Markers of pituitary adenoma invasiveness. **Pituitary**, v.3, p: 19, 2000.

SUMI, Toshiko, et al. Immunohistochemical study of p53 protein in human and animal pituitary tumors. **Endocrine Pathology**, v.4, n.2, p: 95-99., 1993.

TANASE, C.P.; NEAGU, M.; ALBULESCU, R. Key signaling molecules in pituitary tumors. **Expert Rev Mol Diagn.**; v.9, p:859-877, 2009.

THAPAR, Kamal, et al. p53 expression in pituitary adenomas and carcinomas: correlation with invasiveness and tumor growth fractions. **Neurosurgery**, v.38, n.4, p: 765-771, 1996.

TICHOMIROVA, M.A. et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B) gene variants in AIP mutation-negative familial isolated pituitary adenoma kindreds. **Endocr. Relat. Cancer.**, May; v.19, n.3, p:233-41, 2012.

TORLAKOVIC, E.E.; RIDDELL, R.; BANERJEE, D. et al. Canadian Association of Pathologists–Association canadienne des pathologistes National Standards Committee/Immunohistochemistry Best Practice Recommendations for Standardization of Immunohistochemistry Tests. **Am J Clin Pathol.**; v.133, n.3, p:354–365, 2010.

TROUILLAS, J. et al. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case–control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. **Acta Neuropathol**, v.126, p:123–135, 2013.

URISICCHIO, L.; MARRA, E.; ROSCILLI, G.; MANCINI, R.; CILIBERTO, G. The promise of anti- ErbB3 monoclonals as new cancer therapeutics. **Oncotarget.**, v.10, 2012.

VANDEVA, S.; JAFFRAIN-REA, M.L.; DALY, A.F.; TICHOMIROVA, M.; ZACHARIEVA, S.; BECKERS, A. The genetics of pituitary adenomas. **Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism.**; v.24, n.3, p:461-76, 2010.

VANDEVA, S., et al. Genetic factors in the development of pituitary adenomas. **Pediatric Neuroendocrinology**. Karger Publishers, n.17, p. 121-133, 2009.

VELOZA, A.; PRAZERES, S. Prolactina e o Laboratório. **Acta Med Port**, v. 24, p. 1029-1034, 2011.

VIDAL, S.; KOVACS, K.; HORVATH, E.; SCHEITHAUER, B.W.; KUROKI, T.; LLOYD, R.V. Microvessel density in pituitary adenomas and carcinomas. **Virchows Arch.**; v.438, n.6, p: 595-602, 2001.

VILAR, L. et al. Diagnosis and management of hyperprolactinemia: results of a Brazilian multicenter study with 1234 patients. **Jornal Endocrinol Invest**, v.31, p. 436-444, 2008.

VILAR, L. Parte 1 Neuroendocrinologia. In: **Endocrinologia clínica**. 5ª edição. São Paulo:Guanabara Koogan, 2013. cap. 1-11, p. 3-131.

VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. p53 in health and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 4, p. 275-83, Apr 2007.

WILLIN, H.D; WILSON, J.D; FOSTER, D.W. **The anterior pituitary**. Textbook of endocrinology. Ed. Saunders. p.568-575. Philadelphia, 1991.

WIERINCKX, A. et al. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. **Endocrine-related cancer**, v.14, n.3, p: 887-900, 2007.

XU, M.; KNOX, A.J.; MICHAELIS, K.A.; KISELJAK-VASSILIADES, K.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B.K.; LILLEHEI, K.O.; WIERMAN, M.E. Reprimo (RPRM) is a novel tumor suppressor in pituitary tumors and regulates survival, proliferation, and tumorigenicity. **Endocrinology**; v.153, n.7, p: 2963-73, 2012.

YARMAN, S.; KURTULMUS, N.; CANBOLAT, A.; BAYINDIR, C.; BILGIC, B.; INCE, N. A expressão do Ki-67, p53 e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) concomitantemente em crescimento adenomas hipofisários secretores de hormonas; qual deles tem um papel no comportamento do tumor? **Neuro Endocrinol. Lett.**; v.31, p:823-8, 2010.

ZHOU, Y.; ZHANG, X.; KLIBANSKI, A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor. **Journal of Molecular Endocrinology**; v.48, n.3, p:45-53, 2012.

ZHU, X.; MAO, X.; HURREN, R.; SCHIMMER, A.D.; EZZAT, S.; ASA, S.L. Deoxyribonucleic acid methyltransferase 3B promotes epigenetic silencing through histone 3 chromatin modifications in pituitary cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**; v.93, n.9, p:3610–3617, 2008.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TITULO DA PESQUISA: ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DA P53 EM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS

NOME DA PESQUISADORA: Nadja Cruz Gaido

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 p53, por meio de um método chamado imuno-histoquímico. Essa proteína será estudada nos adenomas (tumores) de hipófise, visando identificar a sua ocorrência nesses tumores. A p53 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 às dimensões psíquica, moral, que serão minimizados com a garantia da confidencialidade 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 p53 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 N^o 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, 4^o 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 Luis, ____/____/____

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: Nadja Cruz Gaido
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
Rua Barão de Itapary, 227, Centro
Cel: (98) 983256279 E-mail: nadjagaido@hotmail.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)

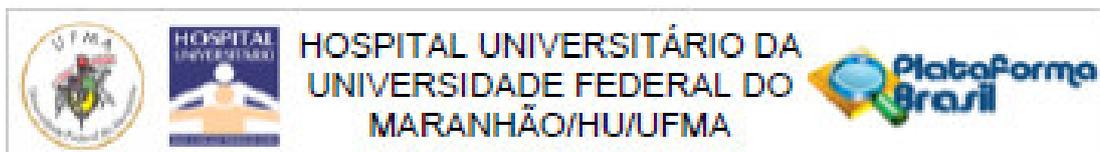
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

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: ANÁLISE DAS MUTAÇÕES DO GENE P53 E SUA CORRELAÇÃO COM OS ADENOMAS HIPOFISÁRIOS

Pesquisador: Manuel dos Santos Faria

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 45449815.1.0000.5085

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: 1.293.972

Apresentação do Projeto:

Os adenomas hipofisários representam cerca de 15% das neoplasias intracranianas e são geralmente benignos. São classificados conforme aspectos macroscópicos e radiológicos e divididos em adenomas secretores ou funcionantes e não secretores ou adenomas clinicamente não-funcionantes. Estas alterações consistem na ativação de oncogenes e na inativação de genes supressores de tumor na quais ambas são necessárias para um fenótipo neoplásico completo. Cerca de 70% dos cânceres humanos possuem principalmente uma deficiência na função do gene p53. O gene p53, é extensivamente estudado nas neoplasias, mostrando que pacientes com mutações apresentam um pior prognóstico. Trata-se de um estudo observacional transversal. A importância deste estudo é identificar a presença das mutações no gene p53 e suas implicações com os aspectos invasivos e agressivos do adenoma hipofisário, bem como buscar fatores preditores desta agressividade e progressão desses tumores. Serão incluídos 80 pacientes com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos, que apresentam diagnóstico de adenoma pituitário, oriundos dos Serviços de Endocrinologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão –HUUFMA. Os resultados obtidos serão analisados utilizando os programas Sigma Stat v.2.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA) e SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Para determinação do tipo de simetria das variáveis quantitativas contínuas será realizado o teste de simetria de Kolmogorov-

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

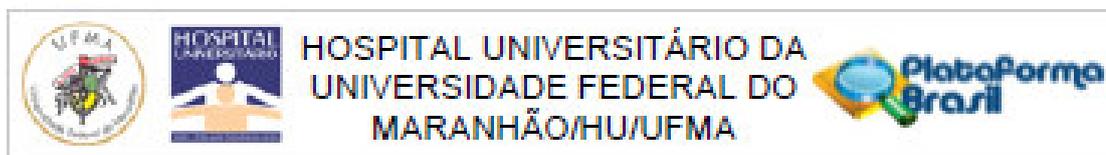
UF: MA

Município: SÃO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

Fax: (98)2109-1223

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Protocolo: 1.293.972

Smirnov. Para as variáveis com distribuição assimétrica serão utilizados testes não paramétricos, o teste Ude ulcoxon-Mann -Whitney para comparar as tendências centrais de duas amostras e o teste de Kruskal-Wallis para populações quanto à tendência central dos dados. O nível de significância estabelecido será de $p < 0,05$. Serão incluídos na pesquisa participantes maiores de 18 anos, de ambos os sexos e com diagnóstico para adenoma hipofisário hiperfuncionante (acromegalia, doença de Cushing, prolactinoma, TSHoma) e adenomas clinicamente não funcionantes; pacientes submetidos a tratamento cirúrgico. Como critérios de exclusão menores de 18 anos; pacientes que não apresentem diagnóstico para adenoma hipofisário; pacientes não submetidos a tratamento cirúrgico. A pesquisa terá apoio financeiro do Fundo de Pesquisa do Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a prevalência das mutações do gene p53 nos adenomas hipofisários.

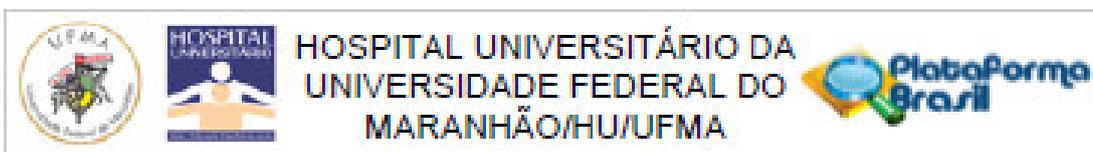
Objetivo Secundário:

Analisar clinicamente a população de pacientes com adenoma hipofisário submetidos a procedimento cirúrgico; Investigar as mutações para o gene p53 correlacionando com os subtipos de adenomas hipofisários: Somatotropinomas, Prolactinomas, Corticotropinomas e Adenomas clinicamente não funcionantes; Correlacionar as mutações do gene p53 com o comportamento biológico dos adenomas hipofisários.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador, a pesquisa apresentará riscos mínimos aos participantes, no qual estes exames serão realizados em suas consultas ambulatoriais com a retirada de amostras de sangue, mas com possíveis desconfortos: sangramento, manchas roxas, tontura, desmaio, infecção no local do furo da agulha. Os riscos serão minimizados com auxílio de profissionais de saúde treinados e capacitados para realização da coleta viabilizando uma coleta asséptica e adequada, assegurando maior conforto ao senhor (a) durante a coleta para retirada de amostra de sangue. Assim como orientar quanto aos cuidados após coleta para que não ocorra sangramento e infecção. O pesquisador dará assistência às complicações e ao risco mínimos decorrentes. Importante ressaltar que o tratamento cirúrgico faz parte do protocolo de tratamento do paciente e que o fragmento de adenoma removido será utilizado para investigação na pesquisa, já que o mesmo também é utilizado na rotina de análise patológica do Hospital Universitário - HUUFMA. A recuperação da cirurgia é muito rápida, cerca de 48h, no entanto, o paciente precisa ficar internado no hospital

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: 1.280.972

por alguns dias para observação do funcionamento dos hormônios hipofisários no pós-operatório. O adenoma hipofisário é considerado de alto risco cirúrgico, pois pode invadir e comprimir as estruturas vizinhas, ao extravasar a sela túrcica, inclusive os nervos óticos. No entanto procedimento cirúrgico é indicado para remoção do adenoma hipofisário o que se faz necessário, quando o tratamento clínico não for eficaz. Importante ressaltar que o tratamento cirúrgico faz parte do protocolo de tratamento do paciente e o fragmento de adenoma removido será utilizado para investigação na pesquisa, já que o mesmo também é utilizado na rotina de análise patológica do Hospital Universitário - HUUFMA. Os dados dos pacientes serão coletados de forma anônima e confidencial, isto é, em nenhum momento será divulgado o nome do paciente em qualquer fase do estudo. Os dados do paciente serão coletados através da consulta do prontuário, dos exames já realizados no acompanhamento do serviço e dos exames coletados durante a pesquisa. Seus dados serão mantidos em segredo durante toda a pesquisa.

Quanto aos benefícios, segundo o pesquisador, esta pesquisa contribuirá com o maior conhecimento sobre o que acontece com o tumor de hipófise para as abordagens de terapia médica como terapia medicamentosa, cirúrgica e radioterapia. Assim teremos uma maior chance de investigação e os pacientes serão beneficiados pelo diagnóstico mais cedo e tratamento mais eficiente, contribuindo para que outros pacientes sejam beneficiados com os resultados deste estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa possui relevância científica e social, pois o estudo permitirá ainda o estabelecimento de novas propostas e alternativas com importantes reflexos no cuidado dos pacientes bem como subsidiar instrumentos para o delineamento das abordagens de terapia médica.

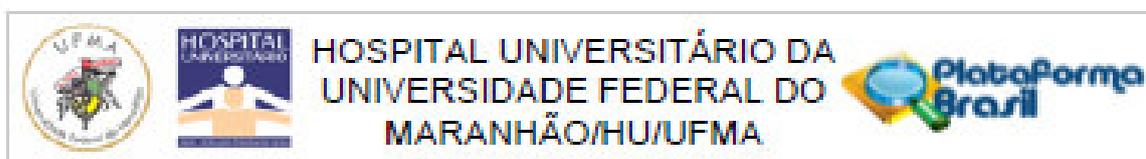
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo cumpre as exigências documentos referente aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Declaração de compromisso em anexar os resultados na Plataforma Brasil garantindo o sigilo, Orçamento financeiro detalhado, Cronograma com etapas detalhada, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e Projeto de Pesquisa Original na íntegra em Word.

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.

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227	CEP: 65.020-070
Bairro: CENTRO	
UF: MA	Município: SAO LUIS
Telefone: (98)2109-1250	Fax: (98)2109-1225
	E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.293.972

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.

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_BASICAS_DO_PROJETO_497606.pdf	10/10/2015 18:07:20		Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	10/10/2015 17:58:23	Manuel dos Santos Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Assentimento.pdf	10/10/2015 17:56:19	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	10/10/2015 16:45:43	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	Declaração de Responsabilidade Financelra PB - p53.pdf	10/07/2015 13:03:15		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto PB3.pdf	08/05/2015 11:15:58		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaração de Vinculo.pdf	12/04/2015 18:35:56		Aceito
Outros	Termo de Compromisso.pdf	12/04/2015 18:31:08		Aceito
Outros	Ficha Cadastral .pdf	12/04/2015 18:28:46		Aceito

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

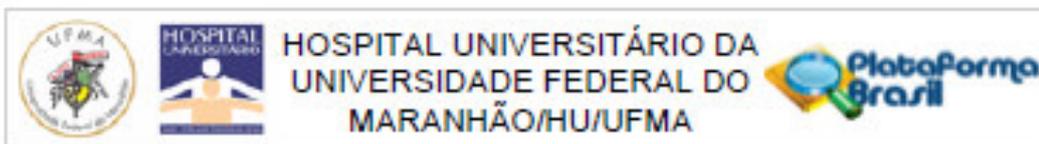
UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

Fax: (98)2109-1223

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.290.972

Outros	Declaração de Anuência.pdf	12/04/2015 18:18:05		Acelto
Parecer Anterior	Parecer.jpg	12/04/2015 17:57:42		Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 23 de Outubro de 2015

Assinado por:

Dorlene Maria Cardoso de Aquino
(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