



**Universidade Federal do Maranhão**  
**Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa,**  
**Pós-Graduação e Internacionalização**  
**Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto**  
**Mestrado Acadêmico**



**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *VDAC2* E *TERT* E  
ALTERAÇÕES MOLECULARES EM SEU PROMOTOR NOS  
TUMORES NEUROENDÓCRINOS DA HIPÓFISE (PitNETs)**

**Wellyandra Costa dos Santos**

**São Luís  
2023**

**WELLYANDRA COSTA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *VDAC2* E *TERT* E  
ALTERAÇÕES MOLECULARES EM SEU PROMOTOR NOS  
TUMORES NEUROENDÓCRINOS DA HIPÓFISE (PITNETs)**

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

Área de Concentração: Saúde e Metabolismo Humano.

Linha de Pesquisa: Alterações Endócrinas.

Orientador: Dr. Marcelo Magalhaes Silva

Co-orientador: Dr. Manuel dos Santos Faria

Coordenador: Dr. Marcelo Souza de Andrade.

São Luís  
2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

SANTOS, WELLYANDRA COSTA DOS.

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VDAC2 E TERT E ALTERAÇÕES MOLECULARES EM SEU PROMOTOR NOS TUMORES NEUROENDÓCRINOS DA HIPÓFISE PitNETs / WELLYANDRA COSTA DOS SANTOS. - 2023.

64 p.

Coorientador(a): MANUEL DOS SANTOS FARIA.

Orientador(a): MARCELO MAGALHÃES SILVA.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

1. Apoptose. 2. Biomarcadores. 3. Telomerase. 4. Tumores hipofisários. I. FARIA, MANUEL DOS SANTOS. II. SILVA, MARCELO MAGALHÃES. III. Título.

**WELLYANDRA COSTA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *VDAC2* E *TERT*  
ALTERAÇÕES MOLECULARES EM SEU PROMOTOR NOS  
TUMORES NEUROENDÓCRINOS DA HIPÓFISE (PitNETs)**

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

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rossana Santiago de Sousa Azulay (Examinadora)  
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA

---

Prof. Dr. Gilvan Cortês Nascimento (Examinador)  
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA

---

Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira (Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Haissa Oliveira Brito (Suplente)  
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA

Aos meus pais, Paulino Lopes e Maria do Socorro

Aos meus irmãos Wellyandrey e Wellyanna.

Ao meu noivo Mailson Moraes Lindoso.

Aos meus amigos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me ajudar em tudo, por todo cuidado, por não permitir que eu desistisse no meio da caminhada, e faço minhas as palavras de Jó que diz assim: “Bem sei eu que tudo podes, e nenhum dos teus propósitos pode ser impedido”. Jó 42. 2.

Aos meus pais, Paulino Lopes dos Santos e Maria do Socorro Costa dos Santos, por todo amor, todo cuidado, por compreender os momentos de ausências, e por não deixar em nenhum momento de me incentivar, Deus seja louvado pela vida de vocês.

Aos meus irmãos, Wellyandrey Santos e Wellyanna Santos, obrigada por todo o incentivo, por todo carinho, eu amo vocês. À minha cunhada, Leyde Daiana Borges e meu sobrinho, Théo Magalhães por todo incentivo e encorajamento.

Ao meu noivo, Mailson Moraes por toda dedicação, compreensão, amor, incentivo, você sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, louvo a Deus por ter você ao meu lado, amo-te.

Às minhas amigas, Leiliane Araújo, Cláudia Gusmão, Danielle Gusmão, vocês foram essenciais, pois, sei que em todos os momentos que precisei de oração, pude contar com o apoio de vocês.

Aos amigos, Luciana, Luiz Carlos, Chayanne, por toda palavra de incentivo declarada.

Agradeço especialmente à Silvia A. Gaspar, por um dia ter confiado em mim, e ter me indicado para estagiar no Centro de Pesquisa Clínica, saiba que você tem um papel fundamental nesse processo.

A Cossi Gbefon, Paulo Eduardo, Anna Karolyne, Paulo Victor, Rafaela, obrigada por toda ajuda, incentivo, por todos os momentos de descontração em meio as dificuldades, vocês sempre estiveram por perto, cada um no seu tempo, todos vocês têm um lugar especial no meu coração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Magalhães Silva, por todo incentivo, por toda orientação, todo cuidado, por todos desafios propostos a mim, você me recebeu para estagiar sem me conhecer, confiou em mim, você me viu crescer como profissional, nos momentos mais difíceis do processo você sempre esteve lá, dizendo que tudo ia dar certo, sou grata por toda confiança que tens em mim.

Ao meu Co-orientador, Dr. Manuel dos Santos Faria obrigada por todas as palavras de incentivo, todas as correções feitas em tempo oportuno, por todas as cobranças que me fizeram crescer, sei que tens um cuidado especial comigo, por incentivar a conhecer um novo idioma, que Deus lhe recompense por tudo que tens feito por mim, obrigada por tudo.

Ao Centro de Pesquisa Clínica do HUUFMA — CEPEC, onde foi possível realizar toda parte de Biologia molecular da minha pesquisa.

Aos amigos, que fiz durante todo esse tempo, no Centro de Pesquisa Clínica.

Agradeço a Universidade Federal do Maranhão — UFMA e ao Programa de Pós-Graduação Saúde do Adulto — PPGSAD, pelo mestrado ofertado, aos professores pelas disciplinas ministradas.

Ao Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA), onde foram realizadas as coletas de todas as amostras, em especial a Dra. Ana Gisélia Portela de Araújo Cortês Nascimento por identificar os PitNETs.

Agradeço a FAPEMA, por possibilitar a realização da pesquisa através do suporte financeiro, permitindo assim, a dedicação exclusiva à pesquisa.

E, por fim agradeço a todos que direta e indiretamente cooperaram para o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

**Introdução:** Os tumores neuroendócrinos da hipófise (PitNETs) são neoplasias originárias da adenohipófise e correspondem a cerca de 10 a 15% dos tumores intracranianos. Tais tumores podem ser classificados em funcionantes e não funcionantes, de acordo com a produção de hormônios em quantidade suficiente para induzir manifestações clínicas. Recentemente, alterações nos níveis de expressão dos genes *TERT* e *VDAC2* têm sugerido um importante papel desses genes no desenvolvimento de neoplasias endócrinas, podendo também estar envolvidos na oncogênese dos PitNETs. A patogênese molecular dos PitNETs ainda é pouco compreendida e, portanto, faz-se necessário um maior estudo sobre esse tema em diferentes populações. **Objetivo:** avaliar a expressão gênica de *VDAC2* e *TERT* e alterações moleculares em seu promotor em portadores de PitNETs atendidos no HUUFMA Centro de Referência para o Estado do Maranhão. **Metodologia:** foram analisadas 89 amostras de PitNETs de pacientes submetidos à cirurgia no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – HUUFMA. Realizou-se a extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA a partir do material biológico coletado e, posteriormente, foi feita a PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica de *TERT* e *VDAC2*. Para a análise de mutações no promotor *TERT* (posições C228T e C250T), foi realizado sequenciamento de DNA. **Resultados:** a maioria dos casos corresponderam ao sexo feminino (59/89 - 66,3%) e apresentavam entre 51 e 60 anos (25/89 - 28,1%). Considerando as características tumorais, 64 casos (71,9%) foram classificados como não funcionantes e 83 tumores (93,3%) apresentaram-se como macrotumores. Em relação às análises moleculares, embora os pacientes acromegálicos tenham apresentado maior índice de expressão (IE) de *TERT* (IE=1,67), não foram observadas diferenças significativas dessa variável entres os tipos tumorais. Além disso, também não foram detectadas mutações nas posições C228T e C250T do promotor *TERT*. Em relação ao *VDAC2*, comparando-se com tecido hipofisário normal, verificou-se um aumento de expressão desse gene em portadores de Doença de *Cushing* (6,83 vezes), Acromegalia (3,08 vezes) e tumores não funcionantes (3,01 vezes). Foi constatada também em nossa amostra uma significativa correlação entre as expressões de *TERT* e *VDAC2* (rs= 0,278; p=0,01). **Conclusão:** No presente estudo, a maior expressão de *VDAC2* nas amostras tumorais sugere uma possível participação desse gene na oncogênese dos PitNETs. Em adição, a correlação entre *VDAC2* e *TERT* pode apontar para uma atuação conjunta de ambas as vias de sinalização, ensejando a possibilidade de novos alvos terapêuticos.

**Palavras-chave:** Tumores hipofisários, Telomerase, Apoptose, Biomarcadores.

## ABSTRACT

**Introduction:** The pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs) are neoplasms originating from the pituitary and correspond to about 10 to 15% of intracranial tumors. Such tumors can be classified into functioning and nonfunctioning, according to whether they produce enough hormones to induce clinical manifestations. Recently, changes in the expression levels of *TERT* and *VDAC2* genes have suggested an important role of these genes in the development of endocrine neoplasms, and they may also be involved in the oncogenesis of PitNETs. The molecular pathogenesis of PitNETs is still poorly understood and, therefore, further studies on this topic in different populations is needed.

**Objective:** to evaluate the gene expression of *VDAC2* and *TERT* and molecular alterations in its promoter in patients with PitNETs treated in the state of Maranhão. **Methodology:** 89 samples of PitNETs from patients undergoing surgery at the University Hospital of the Federal University of Maranhão - HUUFMA were analyzed. Nucleic acids were extracted and cDNA synthesis was performed from the collected biological material, and then real-time PCR was performed to evaluate *TERT* and *VDAC2* gene expression. DNA sequencing was performed to analyze mutations in the *TERT* promoter (positions C228T and C250T). **Results:** most cases were female (59/89 - 66.3%) and were between 51 and 60 years old (25/89 - 28.1%). Considering the tumor characteristics, 64 cases (71.9%) were classified as non-functional and 59 tumors (66.3%) presented as macrotumors. Regarding the molecular analyses, although the acromegalic patients had a higher expression index (IE) of *TERT* (IE=1.67), no significant differences were observed between tumor types. In addition, no mutations were detected at positions C228T and C250T of the *TERT* promoter. Regarding *VDAC2*, when compared to normal pituitary tissue, an increased expression of this gene was found in carriers of non-functioning tumors (3.01-fold), Acromegaly (3.08-fold) and Cushing's disease (6.83-fold). A significant correlation between *TERT* and *VDAC2* expression was also found in our sample ( $r_s = 0.278$ ;  $p = 0.01$ ). **Conclusion:** In the present study, the higher expression of *VDAC2* in tumor samples suggests a possible participation of this gene in the oncogenesis of PitNETs. In addition, the correlation between *VDAC2* and *TERT* may point to a joint action of both signaling pathways, raising the possibility of new therapeutic targets.

**Keywords:** Pituitary tumors, Telomerase, Apoptosis, Biomarkers.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Referencial Teórico) - Hormônios hipofisários, peso molecular, glândula-alvo e suas principais ações.....	23
Tabela 2 (Referencial Teórico) - Isoformas <i>VDAC</i> (1, 2, 3) e suas respectivas funções.....	31-32
Tabela 1(Artigo) - Distribuição das variáveis de caracterização geral da amostra de pacientes com PitNETs (n=89). ....	50 e 51
Tabela 2 (Artigo) - Expressão do gene <i>TERT</i> em pacientes com PitNETs (n=89) .....	51
Tabela 3 (Artigo) - Distribuição da expressão do gene <i>TERT</i> de acordo com as variáveis demográficas e clínicas.....	52
Tabela 4 (Artigo) - Distribuição da expressão do gene <i>VDAC2</i> de acordo com as variáveis demográficas e clínicas .....	53
Tabela 5 (Artigo)- Regressão múltipla dos fatores clínicos em tamanho tumoral.....	54
Tabela 6 (Artigo) – Modelo de regressão múltipla dos preditores tipos de tumor, sexo e faixa etária sobre a expressão dos marcadores <i>VDAC2</i> .....	55
Tabela 7 (artigo) – Modelo de regressão múltipla dos preditores tipos de tumor, sexo, faixa etária sobre a expressão do marcador <i>TERT</i> .....	56

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 (Referencial Teórico) - Sistema hipotalâmico - hipofisário.....	20
Figura 2 (Referencial Teórico) - Mecanismos de retroalimentação no controle da síntese hormonal .....	20
Figura 3 (Referencial Teórico) - Vascularização do sistema hipotalâmico - hipofisário .....	21
Figura 4 (Referencial Teórico) - Anatomia do eixo hipotalâmico-hipofisário .....	22
Figura 5 (Referencial Teórico) - Representação esquemática da atuação dos hormônios hipofisários nos diferentes órgãos.....	24
Figura 6 (Referencial Teórico) - Localização do centrômero e do telômero em cromossomos humanos .....	27
Figura 7 (Referencial Teórico) - Via extrínseca da ativação da apoptose .....	29
Figura 8 (Referencial Teórico) - Via intrínseca da ativação da apoptose .....	30
Figura 9 (Referencial Teórico) – Representação das três isoformas de <i>VDAC</i> . .....	32
Figura 1 (artigo) – Análise comparativa da distribuição do tamanho do tumor de acordo com o tipo histopatológico .....	52
Figura 2 (artigo) – Análise de correlação entre a expressão gênica de <i>VDAC2</i> e <i>TERT</i> em PitNETs.....	56

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ADP	Adenosina difosfato
ADH	Hormônio Antidiurético ou Vasopressina
AGHU	Aplicativo de Gestão para Hospitais Universitários
ATP	Adenosina Trifosfato
BAK	Do inglês: <i>Bcl-2 homologous antagonist Killer</i>
BAX	Do inglês: <i>Bcl-2 associated protein X</i>
BCL-2	Do inglês: B cell Lymphoma protein 2
BCL-XL	Do inglês: Célula B de linfoma – Extra grande
cm	Centímetro
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	Ciclo Limiar (threshold)
CRH	Hormônio liberador da corticotrofina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
<i>GAPDH</i>	Do inglês: <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GH	Hormônio do Crescimento ou Somatotrófico
GHRH	Hormônio liberador do hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HK	Hexocinases
IE	Índice de expressão
LH	Hormônio Luteinizante
LTH	Hormônio Lactogênico
MSH	Hormônio estimulador de melanócitos
NF – PitNETs	Tumores Neuroendócrinos Hipofisários Não Funcionantes
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PitNETs	Tumores Neuroendócrinos da Hipófise
POT1	Proteção de telômeros 1
PRL	Prolactina
PTP	Poro de transição de permeabilidade mitocondrial
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RAP1	Proteína repressora/ativadora 1
RNA	Ácido Ribonucleico
rTNF	Receptor de fator de necrose tumoral
RT-PCR	Transcrição reversa da reação de polimerização em cadeia
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
<i>TERC</i>	Do inglês: <i>Telomerase RNA Component</i>
<i>TERT</i>	Transcriptase Reversa da Telomerase

TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio Tireotrófico
<i>VDAC2</i>	Canal de Ânion Dependente de Voltagem 2

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\pm$ : Desvio padrão.

$<$ : Menor que.

$>$ : Maior que.

$\geq$ : Maior igual.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>A Glândula Hipófise</b>	<b>19</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Anatomia</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Hormônios Produzidos</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Tumores Neuroendócrinos da Hipófise/Pituitária (PitNETs)</b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Marcadores Moleculares em PitNETs</b>	<b>26</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Replicação celular e imortalização</b>	<b>26</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Transcriptase Reversa da Telomerase - <i>TERT</i></b>	<b>27</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Apoptose</b>	<b>28</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Canal de Ânion Dependentes de Voltagem 2 - <i>VDAC2</i></b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO</b>	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os tumores neuroendócrinos da hipófise (PitNETs) são neoplasias de crescente incidência devido à evolução dos exames de imagem e dos testes hormonais para sua detecção (Mete et al., 2012). Os PitNETs podem ser classificados conforme o tamanho em microtumores (<10 mm) ou macrotumores ( $\geq 10$  mm). Quanto à clínica podem ser funcionantes e não funcionantes (Can et al., 2017).

Considerando o impacto clínico expresso pelo aumento de secreção hormonal, os PitNETs funcionantes podem ser divididos em produtores de prolactina (PRL); hormônio do crescimento ou somatotrófico (GH); hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); hormônio tireotrófico (TSH); hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículoestimulante (FSH), podendo co-secretar dois ou mais hormônios (Drummond et al. 2003). Por outro lado, os PitNETs clinicamente não funcionantes (NF-PitNETs) não secretam quantidades expressivas de hormônios adenohipofisários e, portanto, não apresentam evidência clínica e bioquímica de hiperfunção hipofisária. (Tella Jr., et al., 2002; Penn, et al., 2017; Trouillas et al., 2020; Pei et al., 2022).

Apesar da maioria dos PitNETs serem conhecidos por seu comportamento benigno, um subgrupo significativo apresenta comportamento agressivo. Esforços têm sido feitos para estabelecer o comportamento clínico de tumores individuais, com ênfase na identificação daqueles que podem apresentar-se de forma mais agressiva (Yuan et al., 2021). Embora a patogênese molecular dos PitNETs ainda seja pouco compreendida, alguns estudos têm evidenciado que o desenvolvimento dessas neoplasias é um processo multifatorial, incluindo alterações em genes relacionados à imortalização celular e resistência à apoptose (Melmed, 2011).

A aquisição de um potencial replicativo ilimitado (imortalização) é considerada uma das principais características fenotípicas de malignidade e envolve alterações em estruturas posicionadas nas extremidades cromossômicas denominadas telômeros (Lu et al., 2011; Gutierrez et al., 2014). Os telômeros são compostos por repetições de nucleotídeos (TTAGGG) e possuem como função primordial a manutenção da integridade genômica, evitando fusões e degradação cromossômica (Chico-Sordo et al., 2021). O comprimento dos telômeros é regulado pela telomerase, a grande transcriptase reversa multicomponente que reconhece, liga e alonga as extremidades dos telômeros usando seu molde de RNA intrínseco (Bell et al., 2016).

A telomerase é um complexo ribonucleoproteico formado pela transcriptase reversa da telomerase (TERT), RNA da telomerase (TERC), discernia, dentre outras (Lu et al., 2011). A atividade da telomerase é silenciada na maioria dos tecidos normais, contribuindo para que os telômeros encurtem a cada nova divisão celular. O encurtamento dos telômeros é um mecanismo de contagem que as células possuem para que haja um limite do número de vezes que uma célula pode se dividir (Cohen, 2007).

A atividade da telomerase é predominantemente regulada pelo domínio transcriptase reversa da telomerase (TERT) (Akincilar et al., 2016). Em humanos, essa importante subunidade catalítica é codificada pelo gene *TERT* localizado no braço curto do cromossomo 5 (5p15.33). Em células somáticas, o nível de expressão de *TERT* é baixo ou ausente (Cong et al., 1999). Por outro lado, em algumas neoplasias, têm sido observados significativo aumento da expressão desse gene e consequente ativação da telomerase e manutenção do tamanho dos telômeros (DeMasters et al., 1997). Tais achados indicam que a expressão de *TERT* pode desempenhar um papel crucial na imortalização celular e agressividade tumoral.

Levando-se em consideração que atividade da telomerase encontra-se elevada em diferentes neoplasias envolvendo glândulas endócrinas, tais como ovário, adrenal e tireoide (Pacini et al., 2011), a expressão de *TERT* poderia também ser um evento chave no desenvolvimento e comportamento biológico dos PitNETs. Atualmente, existem poucos trabalhos investigando a dinâmica dos telômeros no desenvolvimento dos PitNETs e os mesmos apresentaram resultados contrastantes (Yoshino et al., 2003; Martins et al., 2015; Can et al., 2017; Boresowicz et al., 2018).

Outra importante característica fenotípica de malignidade celular é evasão à apoptose, mecanismo fisiológico de morte celular programada (Chin et al., 2018).

O processo apoptótico tem como função a morte programada da célula e é coordenado pelo processo de cascata de caspases. As caspases são enzimas de ação hidrolítica que quebram as ligações peptídicas de proteínas alterando-as ou inativando-as e dessa forma interrompem os processos fisiológicos celulares desligando suas funções e preparando a célula para o processo de morte celular programada (Andrade, 2022).

Nesse sentido, evidências indicam que os canais de ânions dependentes de voltagem (VDACs) atuam como componentes regulatórios da apoptose. Dentre outras funções, estudos tem mostrado que os VDACs são responsáveis pelo transporte de metabólitos de baixo peso molecular através da membrana externa mitocondrial, incluindo trifosfato de adenosina (ATP) e difosfato de adenosina (ADP) (Chin et al., 2018).

Atualmente são descritas 3 isoformas de VDAC (*VDAC1*, *VDAC2* e *VDAC3*) com diferentes níveis de expressão celular (Józwiak, 2020). A *VDAC1* é uma proteína pró-apoptótica, a *VDAC2* é anti-apoptótica, enquanto a *VDAC3* está associada ao desenvolvimento e manutenção do tecido sexual. *VDAC2* foi indicada como a isoforma que realiza a função do canal e governa a apoptose e a autofagia; também chama a atenção devido às consequências letais do *VDAC2* em embriões de camundongos (Zinghirino et al. 2020).

Durante sua evolução, tais isoformas divergiram estruturalmente e desenvolveram características que lhes permitissem desempenhar funções altamente especializadas. Nesse aspecto, o complexo *VDAC2-Bak* parece ser fundamental na resistência celular à morte, sendo essa associação de proteínas interrompida com o desencadeamento da apoptose (Yuan et al., 2021). Além disso, a proteína *VDAC2* também parece ser vital na gametogênese e esteroidogênese (Maurya & Mahalakshmi, 2016).

A via intrínseca ou mitocondrial da apoptose é finamente controlada pela família de proteínas Bcl2, Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) pertence a essa família que pode ser dividida em membros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL) e pró-apoptóticos (Bak, Bax). Bax (Bcl-2 –associated X protein) está inativo em células saudáveis já Bak está inativo ou reprimido devido a interação com *VDAC2*. Quando Bak está ativada ela está dissociada de *VDAC2* e a dissociação do complexo *VDAC2-Bak* está diretamente relacionado à ativação da via mitocondrial da apoptose (Ambrósio, 2018).

A realização do presente estudo é justificada pela necessidade de investigação do papel dos genes *VDAC2* e *TERT* na regulação da apoptose e imortalização celular em PitNETs. Desta forma, a identificação de potenciais biomarcadores nessas neoplasias pode ser capaz de auxiliar no comportamento agressivo do tumor, podendo assim ser de grande utilidade na conduta terapêutica.

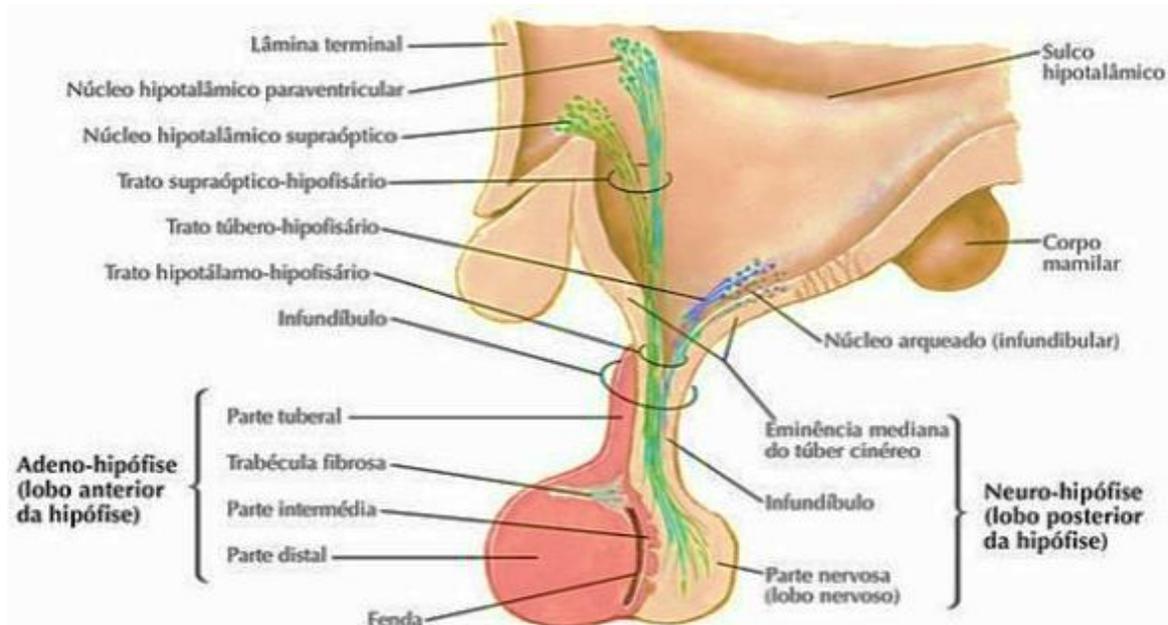
## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A Glândula Hipófise**

#### **2.1.1 Anatomia**

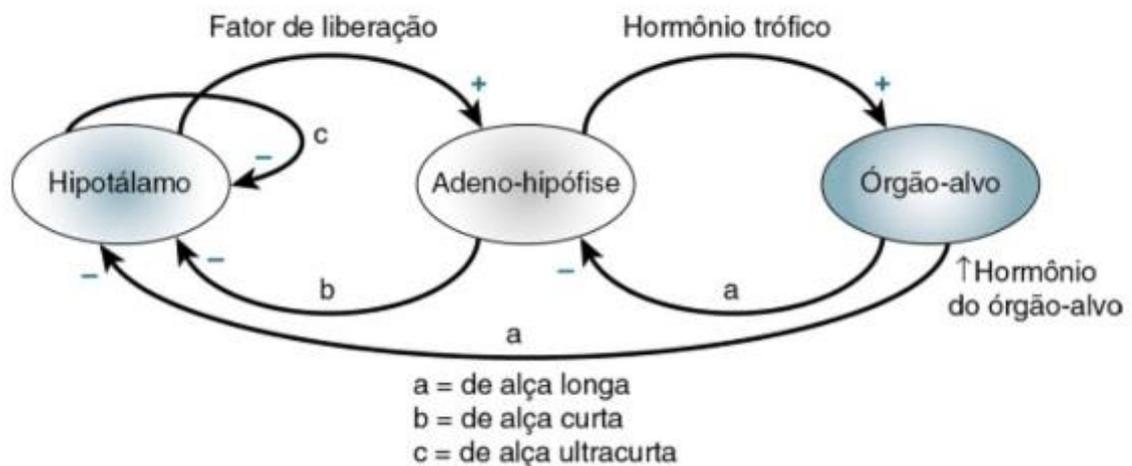
A hipófise, também denominada de pituitária, é uma complexa glândula do sistema endócrino. Apresenta cerca de 1 cm no maior diâmetro e 0,5 g de peso. Anatomicamente está localizada na sela túrcica, uma depressão em forma de sela no osso esfenoide central,

na base do crânio e conectada ao hipotálamo pela haste hipofisária (figura 1) (Rangel, 2009; Chapman, et al., 2020).



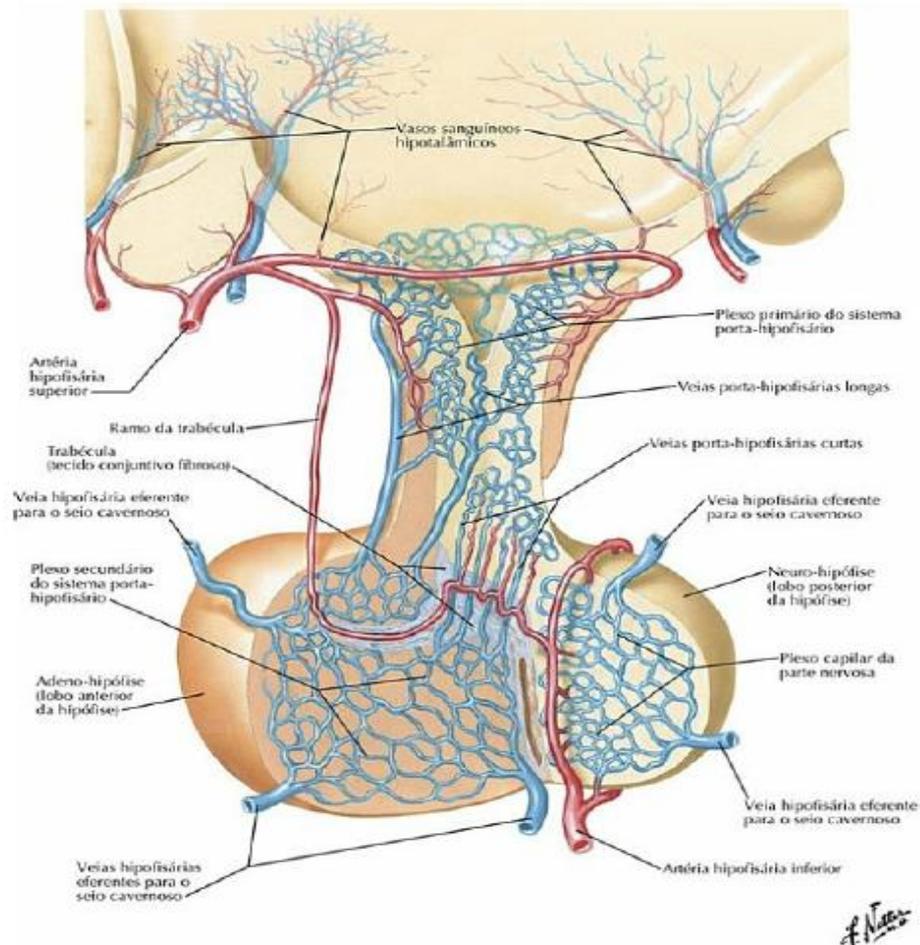
**Figura 1.** Sistema hipotalâmico- hipofisário (Netter, 2014)

O hipotálamo e a hipófise funcionam como uma unidade que faz a mediação de sinais entre o cérebro e glândulas – alvos periféricos por meio de *feedback* positivo ou negativo (figura 2) (Melmed, 2016).



**Figura 2** - Mecanismos de retroalimentação no controle da síntese hormonal. (Molina, 2021)

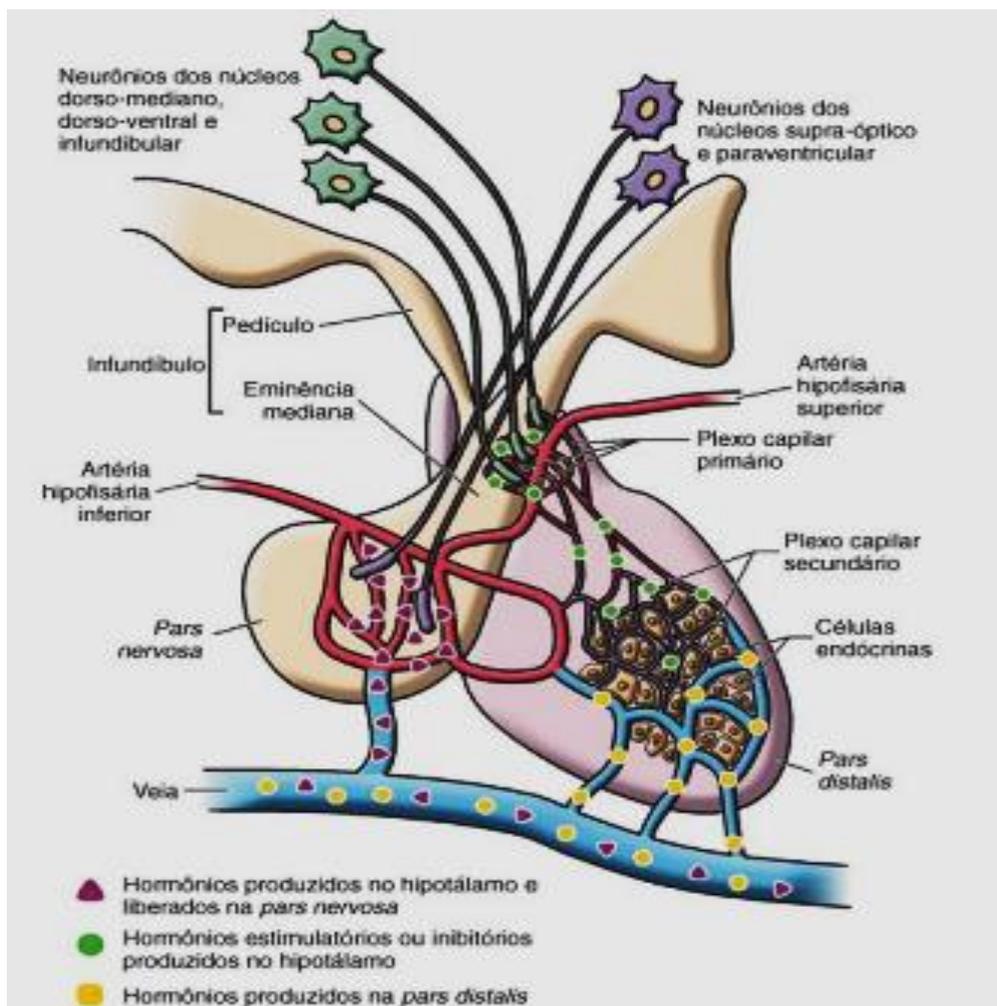
São identificados três níveis de mecanismos de retroalimentação no controle da síntese hormonal: de alça longa, de alça curta e de alça ultracurta. Os hormônios que estão sob regulação por retroalimentação negativa estimulam a produção de outro hormônio pelos órgãos-alvo. A seguir, a elevação dos níveis circulantes desse hormônio inibe a produção adicional do hormônio inicial. Os fatores de liberação do hipotálamo estimulam a liberação dos hormônios tróficos pela adenohipófise. O hormônio trófico estimula a produção e a liberação hormonal do órgão-alvo. O hormônio sintetizado pelo órgão-alvo pode inibir a liberação do hormônio trófico e do fator hipofisiotrófico por retroalimentação negativa de alça longa. O hormônio trófico pode inibir a liberação do fator hipotalâmico por retroalimentação negativa de alça curta. O fator hipofisiotrófico pode inibir sua própria liberação por um mecanismo de retroalimentação negativa de alça ultracurta. A acurácia desse mecanismo de controle possibilita o uso dos níveis circulantes de hormônios, hormônios tróficos e nutrientes para avaliar o estado funcional do órgão endócrino específico. (Molina, 2021)



**Figura 3.** Vascularização do sistema hipotalâmico-hipofisário (Netter, 2014).

A haste hipofisária carrega vasos sanguíneos (figura 3) e fibras nervosas, liberando a passagem de hormônios estimuladores e inibitórios e outras moléculas sinalizadoras. (Lechan & Toni, 2016).

A hipófise é anatômica e funcionalmente separada no lobo anterior (Adenohipófise) e no lobo posterior (Neuro hipófise). O lobo anterior contém três subdivisões, incluindo a *pars distalis*, *pars intermedia* e *pars tuberalis* (Figura 4). A *pars distalis* é a maior parte da adenohipófise e é responsável pela secreção de hormônios da adenohipófise na circulação periférica. A *pars intermedia* fica entre a *pars distalis* e a Neurohipófise. Embora considerado vestigial no homem, contém folículos enriquecidos com células folículo estreladas, principalmente em seu perímetro (ou seja, a zona marginal), provavelmente funcionando como uma subpopulação de células-tronco hipofisárias. A *pars tuberalis* é bem definido na maioria das espécies de mamíferos, incluindo o homem, e envolve o tronco infundibular (Lechan & Toni, 2016).



**Figura 4.** Anatomia do eixo hipotálamo hipofisário (Junqueira, Carneiro, 2008).

### 2.1.2 Hormônios produzidos

O hipotálamo é responsável pela liberação dos seguintes hormônios: Hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH), hormônio liberador da corticotrofina (CRH), hormônio liberador da tireotrofina (TRH), Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Elias, Rodrigues e Castro, 2007).

O GHRH controla a secreção de GH (Elias, Rodrigues e Castro, 2007). O CRH é o principal estimulador da secreção de ACTH na adenohipófise (Ayala, 2002). O TRH determina a síntese e a secreção do TSH (Moura & Moura, 2004).

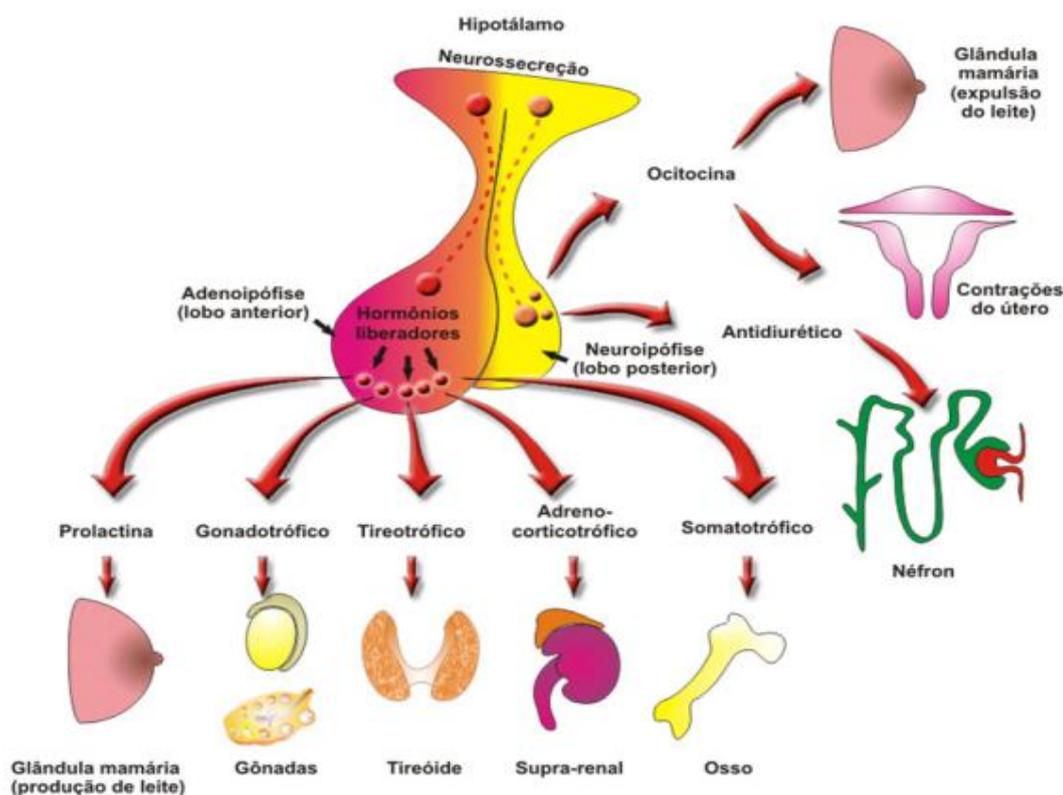
O GnRH após alcançar a adenohipófise através do sistema porta hipotálamo-hipofisário, estimula a secreção de duas gonadotrofinas: o FSH e o LH. Sendo estes responsáveis pelo aparecimento e desenvolvimento das características sexuais, pelo crescimento, pela diferenciação e pelo amadurecimento puberal, bem como pelos processos envolvidos na reprodução (Tabela 1) (Elias, Rodrigues e Castro, 2007).

A adenohipófise produz vários hormônios (Figura 5), incluindo prolactina (PRL), GH, ACTH, TSH, FSH e LH. (Chapman et al., 2020).

Tabela 1. Hormônios hipofisários, glândula- alvo e suas principais ações / características.

Hormônios hipofisários						
		LH/FSH	TSH	PRL	GH	ACTH
Glândulas alvo	– Ovário, Testículo	Tireóide	Glândula mamária, Gônadas	Fígado, osso (Ubiquo)	Adrenal	
Efeitos	Síntese e secreção de Testosterona, estradiol, Progesterona, Puberdade, ovulação, espermatogênese	Síntese e Secreção de T3 e T4	Produção de leite; Inibição do eixo Gonadal	Produção de IGF-I, crescimento esquelético Contra- regulação das ações da insulina	Produção de glicocorticoide, aldosterona, andrógenos	

(Adaptado de Elias, Rodrigues, Castro, 2007). Legenda: LH –hormônio Luteinizante; FSH – Hormônio Folículo Estimulante; TSH – Hormônio Estimulante da Tireóide; GH – Hormônio do crescimento; ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico; PRL – Hormônio Prolactina; IGF-1 – Do inglês: Insulin Growth Factor 1 ou Fator de crescimento semelhante à Insulina – Tipo 1; T3 – Hormônio Triiodotironina; T4 - Hormônio Tiroxina.



**Figura 5.** Representação esquemática da atuação dos hormônios hipofisários nos diferentes órgãos (Saraiva et al. 2010).

A PRL é produzida nas células lactotróficas da hipófise (Bernard et al., 2019), tendo múltiplas funções no organismo, atuando na memória, e responsável pela indução da neurogênese, proliferação e sobrevivência neuronal. Além disso, é principalmente conhecida por seu papel no desenvolvimento da glândula mamária e na lactação (Cabrera-Reyes et al., 2019).

O GH é produzido pelas células somatotróficas é responsável pelo crescimento dos tecidos, tendo diversas ações metabólicas. A secreção elevada deste hormônio induzida por PitNETs pode causar a acromegalia (Tavares, et al., 2023).

Já o ACTH é proveniente principalmente das células corticotróficas da hipófise e é responsável pela síntese e liberação do cortisol (Carvalho, 2017). A secreção acentuada do hormônio ACTH pode dar origem a doença de *Cushing* (Fukuoka, et al., 2020).

O TSH é fundamental para o crescimento e desenvolvimento adequados e para as funções metabólicas. Esse hormônio impulsiona o funcionamento da glândula tireoide, sendo importante para a síntese e a secreção dos hormônios tireoidianos Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4) (Zhou, et al., 2020). Ressalta-se que as disfunções relacionadas à secreção de TSH são denominadas de hipertireoidismo e hipotireoidismo (Razvi, et al., 2019). O

hipertireoidismo é o excesso na produção e secreção dos hormônios tireoidianos (Camacho; Furlanetto, 2009). Já o hipotireoidismo é uma síndrome decorrente da produção insuficiente de hormônio tireoidiano, com variada expressão clínica, e que geralmente resulta em diminuição do metabolismo basal (Silva; Furlanetto, 2009)

O FSH e o LH ligam-se a receptores nos ovários e nos testículos onde exercem seus efeitos, estimulando a produção hormonal de esteroides gonadais e a gametogênese. Na mulher, o FSH estimula o recrutamento dos folículos para desenvolvimento e, no folículo maduro o pico de LH e FSH precedem a ovulação. Na mulher, o LH estimula a produção de esteroides sexuais pelos ovários, desempenhando um papel importante no pico ovulatório e estimula a luteinização do folículo vazio e mantém a secreção de progesterona e estradiol até a involução do corpo lúteo. No homem, o FSH estimula o crescimento testicular e as células de Sertoli a produzirem vários compostos que são essenciais a espermatogênese normal (Salgado; Faria, 2003). O LH estimula as células de Leydig a produzirem testosterona, enquanto a maturação dos espermatozoides necessita de FSH e LH (Salgado; Faria, 2003).

## **2.2 Tumores Neuroendócrinos da Hipófise/Pituitária (PitNETs)**

Os PitNETs são tumores adenohipofisários com reconhecimento crescente devido ao aperfeiçoamento principalmente dos exames de imagem e da maior acurácia das dosagens hormonais (Can et al., 2017; Trouillas et al., 2020). Embora provavelmente subestimada, a prevalência desses tumores é aproximadamente 14,7 casos por 100.000 pessoas por ano (Santos et al. 2007). Tal incidência parece aumentar com a idade (Varlamov et al. 2019). Os PitNETs são frequentes na população adulta encontrando-se em 15-20% em estudos de necrópsias ou achados radiológicos e constituem aproximadamente 10% de todas as neoplasias intracranianas (Machado et al. 2020, Santoro, et al. 2022).

Os PitNETs podem ser classificados de acordo com a clínica em não funcionantes ou funcionantes. Os PitNETs funcionantes exibem um quadro clínico expressivo e são divididos em produtores de PRL; GH; ACTH; TSH; LH e FSH. Salienta-se que um tumor funcionante, pode co-secretar dois ou mais hormônios (Cecenarro et al, 2021)

Os PitNETs NF são tumores hipofisários benignos oriundos das células adenohipofisárias e caracterizam-se por não apresentar secreção hormonal em quantidades excessivas de forma a produzir uma síndrome clínica embora possam expressá-los imuno-histoquimicamente, quando ditos silenciosos (AlMalki, et al.,2020; Cheng, et al. 2019;

Trouillas et al., 2020; Pei et al., 2022). Em geral, PitNETs NF são classificados como macrotumores e podem afetar estruturas próximas à hipófise (Ogino et al., 2021). Os macrotumores são tumores de crescimento lento (maior que 1 centímetro de tamanho) (Ribeiro et al. 2014).

O macrotumor inicialmente se expande para cima devido ao elemento ósseo da sela túrcica que o limita. Na medida em que continua crescendo, começa a exercer efeito de massa sobre o limite inferior do quiasma óptico, causando assim a compressão mecânica das fibras do nervo óptico que passam ao centro do quiasma óptico. Essas estruturas são as primeiras do sistema visual a serem atingidas pela expansão tumoral por se localizarem exatamente acima da fossa pituitária (Santoro et al., 2022).

Cerca de 30-85% dos PitNETs tratados cirurgicamente são clinicamente não funcionantes (Nishioka et al., 2015; Aydin et al., 2019).

Os PitNETs têm essencialmente aspectos histológicos e morfológicos benignos, mas pode apresentar-se de maneira agressiva por invasão dos tecidos vizinhos, recorrências e resistências às terapias medicamentosas (Can et al., 2017; Mete e Asa, 2020).

## **2.3 Marcadores Moleculares em PitNETS**

### **2.3.1 Replicação celular e imortalização**

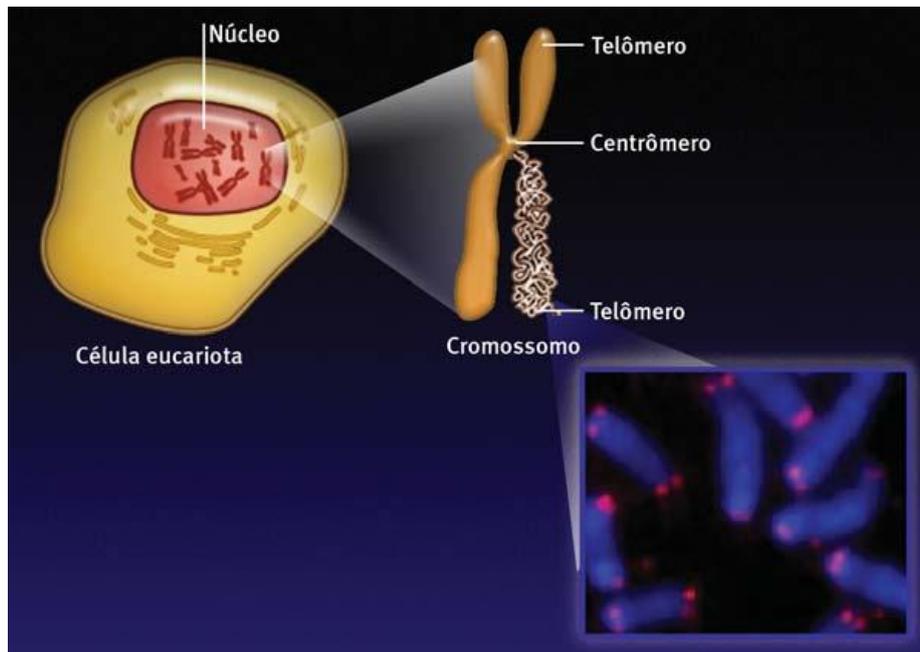
A replicação do DNA é o processo de duplicação de uma molécula de DNA de dupla cadeia. Esse processo ocorre de forma semiconservativa. As extremidades dos cromossomos apresentam uma dificuldade intrínseca de replicação e a cada ciclo de replicação há um encurtamento de uma das duas moléculas-filhas de DNA (Ribeiro, 2009).

Durante os eventos de replicação, em muitas células, os telômeros diminuem seu tamanho conduzindo a senescência (morte) celular (Zaha, Ferreira, Passaglia, 2014).

Aproximadamente 90% das células somáticas cancerígenas, que alcançam a imortalidade celular, apresentam alta expressividade da telomerase. A reativação do gene silenciado da telomerase, nessas células tumorais, tem sido um dos mecanismos utilizados para burlar o sistema natural de senescência celular e apoptose, permitindo assim que essas células continuem promovendo o alongamento dos telômeros e se repliquem de maneira descontrolada e ininterrupta (Silva et al., 2019).

### 2.3.2 Transcriptase Reversa da Telomerase - *TERT*

Os telômeros são sequências repetitivas de oligonucleotídeos (TTAGGG) que estão localizados nas extremidades dos cromossomos e, juntamente com proteínas associadas, integram importantes elementos estruturais dos cromossomos (Figura 6).



**Figura 6.** Localização do centrômero e do telômero em cromossomos humanos. (Cano, 2006).

Durante a divisão celular, os telômeros são estendidos pela telomerase, no qual a enzima transcriptase reversa da telomerase (*TERT*) desempenha um papel substancial (Koelsche et al., 2013). A Transcriptase Reversa da Telomerase é um complexo proteico ribonucleico que inclui uma subunidade catalítica *TERT* (proteína associada à telomerase 2) e uma parte da RNA (*TERC*), e mantém a homeostase dos telômeros e a integridade cromossômica (Ferrer et al. 2017).

A ausência da telomerase leva à degradação progressiva dos telômeros em células humanas em divisão devido à característica intrínseca da DNA polimerase (Shay e Wright, 2019). Quando o comprimento dos telômeros diminui para um tamanho crítico e os telômeros perdem as funções, a via de resposta ao dano do DNA é ativada e as células são acionadas para entrar em um estágio permanente de parada do crescimento chamado senescência replicativa. Acredita-se que a senescência atue como uma barreira muito eficaz contra o câncer, bloqueando a proliferação e as mutações genéticas resultantes da replicação do DNA. Como a proliferação infinita é uma característica das células malignas (Hanahan e

Weinberg, 2011), e superar a barreira da senescência pela estabilização dos telômeros é necessário na oncogênese e, na maioria dos casos, isso é alcançado por meio da ativação da telomerase (Shay e Wright, 2019, Hanahan e Weinberg, 2011).

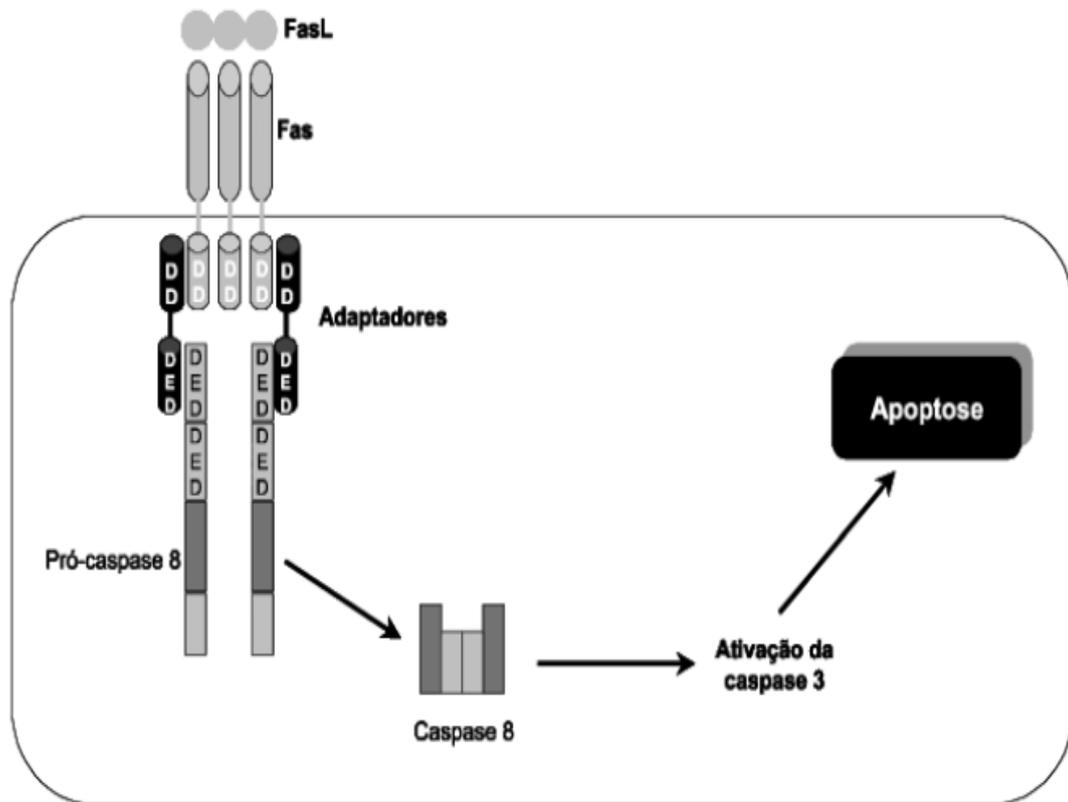
A expressão de *TERT* é suprimida em tecidos somáticos adultos normais, mas pode ser expressa em tecidos embriogênicos. A reativação da *TERT* foi detectada em aproximadamente 90% dos cânceres humanos. Assim, a atividade da telomerase em PitNETs tem sido objeto de alguns estudos que mostraram resultados contraditórios (Can et al., 2017, Bell et al., 2017).

### **2.3.3 Apoptose**

A apoptose é o processo que resulta na morte controlada da célula sem que haja derramamento de seu conteúdo no ambiente circundante (D'arcy, 2019).

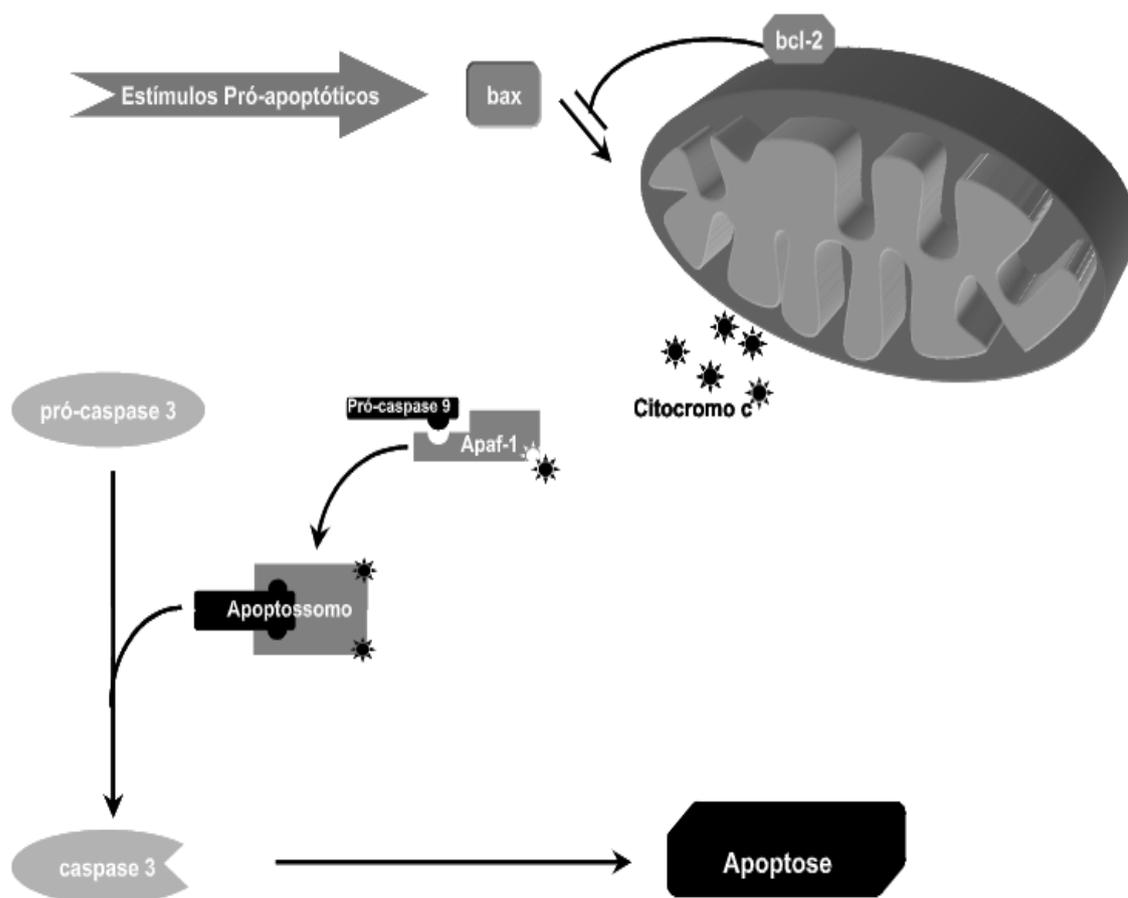
A apoptose pode ser desencadeada por vários fatores, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, deprivação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio. A morte celular programada em organismos multicelulares pode ser uma resposta a estímulos intracelulares e extracelulares (Parolin & Reason, 2001; Grivicich et al., 2007).

Existem duas vias principais para o desencadeamento da apoptose: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca (figura 7) é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (Grivicich et al., 2007).



**Figura 7.** Via extrínseca da ativação da apoptose (Morais, et al. 2014). DD=domínio de morte; DED=efetor do domínio de morte.

As proteínas atuam nas vias apoptóticas como iniciadores e como efetores da apoptose. A via intrínseca (figura 8) é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria. Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (Grivicich et al., 2007).



**Figura 8.** Via intrínseca de ativação da apoptose. (Grivicich et al., 2007)

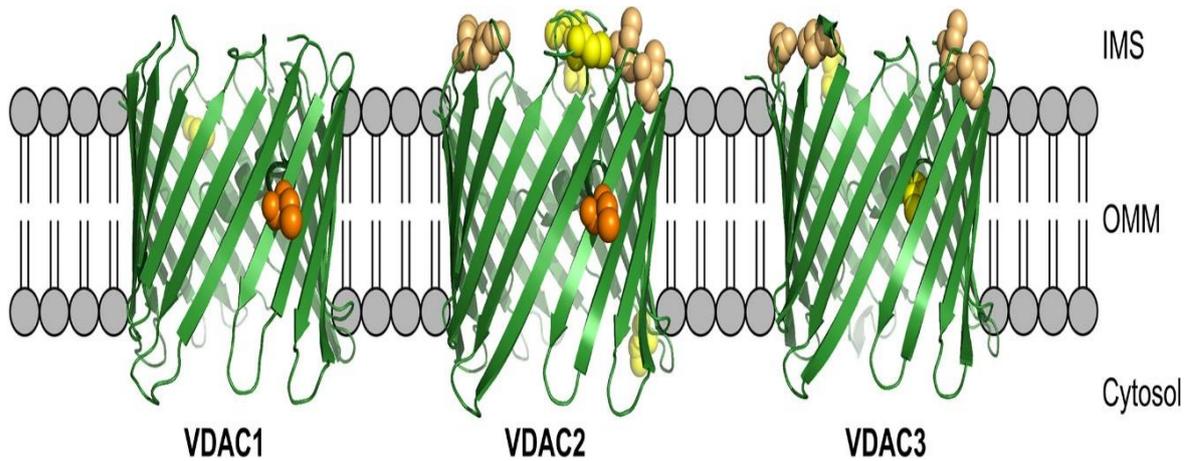
### 2.3.4 Canal de Ânion Dependente de Voltagem 2 - VDAC2

As mitocôndrias são importantes para a homeostase e sobrevivência celular, e executam a indução de apoptose oportuna e controlada em células extremamente danificadas ou envelhecidas. Análogo a outras organelas eucarióticas, as mitocôndrias são sistemas ligados por membrana dupla, com a membrana mitocondrial interna sendo mais seletiva do que a membrana externa mitocondrial (Maurya & Mahalakshmi, 2016).

Para que haja troca de solutos com o citosol, as mitocôndrias utilizam as proteínas mais abundantes da membrana externa mitocondrial denominadas de canais de ânions dependentes de voltagem (VDACs) (Naghdi e Hajnóczky, 2016).

Os VDACs, desempenham um papel importante na fisiologia mitocondrial e no metabolismo bioenergético com a entrada e saída de  $Ca^{2+}$  e metabolitos como ATP e NADH. Existem três isoformas de VDAC: VDAC1, VDAC2 e VDAC3 (Figura 9; Tabela 1) (Józwiak et al., 2020; Mato et al., 2015).

Os canais VDACs são responsáveis pelo transporte de metabólitos de baixo peso molecular através da membrana externa mitocondrial, permitindo, assim, a passagem de íons carregados positivamente e negativamente, NADH, ATP/ADP dentro e fora da mitocôndria. (Yuan et al., 2021; Chin et al., 2018; Shimizu et al., 1999).



**Figura 9.** Representação das três isoformas de VDAC. (Maurya&Mahalakshmi, 2016)

Várias funções têm sido atribuídas às isoformas VDAC, (tabela 2) entre as quais o acoplamento direto da matriz mitocondrial à manutenção energética do citosol parece ser a função mais geral. A estrutura do VDAC é de interesse por causa de evidências que ligam o VDAC à apoptose. Sugere-se que VDAC é um fator crítico na liberação de fatores apoptogênicos de mitocôndrias de células de mamíferos e, conseqüentemente, várias hipóteses descrevendo o mecanismo de apoptose mediada por mitocôndrias envolvendo VDAC foram propostas (Bayrhuber et al., 2008).

**Tabela 2.** Isoformas VDAC (1, 2, 3) e suas respectivas funções.

<b>Isoformas</b>	<b>Funções</b>
VDAC1	<ul style="list-style-type: none"><li>- Maior capacidade de transporte molecular e papel essencialmente pró-apoptótico. (Mazure, 2017)</li><li>- Associa-se com Bak e Bax e liberam rápida do citocromo c no citosol.</li><li>- Associado à menor progressão tumoral. (Yang; Li, 2019)</li></ul>
VDAC2	<ul style="list-style-type: none"><li>- Recruta as proteínas Bak e Bax para a membrana.</li><li>- Permite a liberação do citocromo c durante a apoptose.</li><li>- Induz a apoptose mediada por Bax (Chin, et al., 2018)</li><li>- Inibe a apoptose mediada por Bak. (Cheng, et al., 2003)</li></ul>
VDAC3	<ul style="list-style-type: none"><li>- Maior expressão em espermatozoides.</li><li>- Gênese de diversas patologias, incluindo o cancer.</li><li>-Relacionado à via de sinalização de Espécies Reativas de Oxigênio. (Reina, et al., 2016)</li></ul>

Legenda: VDAC= Canais de ânions dependentes de voltagem. Bak e Bax = Proteínas efetoras pró-apoptóticas.

Em particular, VDAC2 faz parte do complexo de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP) que permitia a liberação do citocromo c durante a apoptose. Esta ideia foi baseada na função de canal do VDAC2, sua abundância na membrana mitocondrial externa e suas interações com as proteínas pró-sobrevivência Bcl2 e Bcl-XL (Yuan et al. 2021).

A família de proteínas Bcl2, regula a morte celular por intermédio dos membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos, controlando a permeabilidade da membrana mitocondrial durante a apoptose. (Shimizu et al. 1999)

O complexo VDAC2-Bak parece ser interrompido quando a apoptose inicia-se e, desse modo, a superexpressão de VDAC2 parece inibir a apoptose mediada por Bak. Tem-se sugerido que VDAC2 inibe a apoptose sequestrando Bak em sua forma inativa. No entanto, o VDAC2 desempenha um papel importante tanto no recrutamento de Bak para a membrana mitocondrial externa quanto na inibição de sua ativação (Yuan et al. 2021). Embora os mecanismos moleculares que controlam a apoptose mitocondrial sejam complexos, as moléculas pró-apoptóticas multidomínio Bak1 ou Bax, são necessárias para que a via mitocondrial da apoptose seja iniciada (Mato et al. 2015).

Os VDACs participam da adaptação das células à glicólise anaeróbia por meio de sua interação com hexocinases (HK). A associação HK/VDAC dá ao HK acesso fácil ao ATP e promove a conversão do piruvato em ácido láctico, reprogramado assim o metabolismo energético e proporcionando uma vantagem de crescimento para as células cancerígenas (Józwiak et al. 2020).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a expressão gênica de *VDAC2* e *TERT* e alterações moleculares em seu promotor nos tumores neuroendócrinos da hipófise (PitNETs).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Analisar os níveis de expressão gênica de *TERT* e *VDAC2* em amostras tumorais de pacientes portadores de PitNETs atendidos no estado do Maranhão.
- Investigar a presença de mutações no promotor *TERT* e seu impacto sobre a regulação da expressão desse gene nos PitNETs.
- Verificar eventual associação entre expressão gênica de *TERT* e *VDAC2*, com o tamanho tumoral e tipos clínicos.
- Estudar a correlação a expressão gênica de *TERT* e *VDAC2* em PitNETs.

#### 4. REFERÊNCIAS

AKINCILAR, S. C, UNAL B, TERGAONKAR V. Reactivation of telomerase in cancer. *Cell Mol Life Sci* 73: 1659– 70. 2016.

ALLEN M. J., SHARMA S. Physiology, Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH). In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022. PMID: 29763207.

ALMALKI, M. H., AHMAD, M. M., BREMA, I., ALDAHMANI, K. M., PERVEZ, N., AL-DANDAN, S., ... & BESHYAH, S. A. (2020). Contemporary management of clinically non-functioning pituitary adenomas: a clinical review. *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*, 13, 1179551420932921.

AMBRÓSIO, A. L. B. Uma visão estrutural sobre componentes do processo de adaptação metabólica de tumores. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ANDRADE, G. B. Análise de plasticidade das vias de senescência celular, apoptose e estabilidade genômica – Instituto de Biociências de Botucatu – Botucatu, 2022.

ASA, S. L., METE, O., CUSIMANO, M. D., MCCUTCHEON, I. E., PERRY, A., YAMADA, S., NISHIOKA, H., ET AL., (2021). Pituitary neuroendocrine tumors: A model for neuroendocrine tumor classification. *Patologia Moderna*, 34(9), 1634-1650. <https://doi.org/10.1038/s41379-021-00820-y>

ASA, S. L., METE, O., Cytokeratin profiles in pituitary neuroendocrine tumors, *Human Pathology*, Volume 107, 2021, Pages 87-95, ISSN 0046-8177, <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2020.10.004>.

AYALA, A. R. Antagonista do hormônio liberador da corticotrofina: atualização e perspectivas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabo.* Vol. 46 n° 6. 2002)

AYDIN, S., COMUNOGLU, N., AHMEDOV, M. L., KORKMAZ, O. P., OZ, B., KADIOGLU, P., GAZIOGLU, N., TANRIOVER, N., Clinicopathologic Characteristics and Surgical Treatment of Plurihormonal Pituitary Adenomas, *World Neurosurgery*, Vol.130, 2019, Pages e765-e774, ISSN 1878-8750, <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.06.217>.

BAYRHUBER, M., MEINS, T., HABECK, M., BECKER, S., GILLER, K., VILLINGER, S., VONRHEIN, C., GRIESINGER, C., ZWECKSTETTER, M., & ZETH, K. (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15370–15375. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808115105>

BELL, R. J. A., RUBE, H. T., XAVIER-MAGALHÃES, A., COSTA, B. M., MANCINI, A., SONG, J. S., AND COSTELLO, J. F., Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality *Mol Cancer Res* April 1 2016 (14) (4) 315-323; DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0003

BEM-SHLOMO, A., MELMED, SHLOMO. Hypothalamic Regulation of Anterior Pituitary Funcion. In: Melmed, Sholomo(org). The pituitary. Fourth ed. London: Academic Press, 2016. P. 23-46. E-book

BERNARD, V., YOUNG, J. & BINART, N. Prolactin — a pleiotropic factor in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 15, 356–365 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0194-6>

BORESOWICZ J, KOBER P, RUSSETSKA N, MAKSYMOWICZ M, GORYCA K, KUNICKIJ, ET AL. Telomere length and TERT abnormalities in pituitary adenomas. *Neuro Endocrinol Lett* 39: 49-55. 2018.

BROWN, D.W., LIN, S. H., LOH, P. R., CHANOCK, S. J., SAVAGE, S. A., MACHIELA, M. J., (2020) Genetically predicted telomere length is associated with clonal somatic copy number alterations in peripheral leukocytes. *Plos Genet* 16(10): e1009078. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009078>

CABRERA-REYES, E. A., VANOYE–CARLO, A., RODRÍGUEZ-DORANTES, M. et al. Transcriptomic analysis reveals new hippocampal gene networks induced by prolactin. *Sci Rep* 9, 13765 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50228-7>

CAMACHO, C. P., FURLANETTO, R. P., Hipertireoidismo. In: Chacra, A. B. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP-EPM – Endocrinologia. Editora Manole Ltda. Ano de publicação: 2009. Pág. 77 – 97.

CAN, N. CELIK, M., BULBUL, B.Y., SUT, N., OZYILMAZ, F., AYTURK, S., et al. TERT Expression in Pituitary Adenomas. *Turk Patoloji Derg* 33:103-11. 2017.

CANO, M. I. N., A vida nas “pontas” dos cromossomos. *Ciência hoje*. Vol. 39. Nº 229. Pág. 16-23. 2006.

CARVALHO, C. R. O., Mecanismos de ação hormonal. In: CURI, R., PROCOPIO, J., *Fisiologia Básica*. Editora: Guanabara Koogan. 2ª edição. Ano de publicação: 2017. Pág. 647-671.

CECENARRO, L. A., MOYANO CRESPO, G. D., & MUKDSI, J. H. (2021). Actualización sobre mecanismos de tumorigénesis hipofisaria [Update on mechanisms of pituitary tumorigenesis.]. *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas (Cordoba, Argentina)*, 78(4), 423–429. <https://doi.org/10.31053/1853.0605.v78.n4.29189>

CHAPMAN, P. R., SINGHAL A., GADDAMANUGU, S., PRATTIPATI, V., *Neuroimaging of the Pituitary Gland: Practical Anatomy and Pathology, Radiologic Clinics of North America*, Volume 58, Issue 6, 2020, Pages 1115-1133, ISSN 0033-8389, ISBN 9780323720724, <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2020.07.009>.

CHENG, E. H., SHEIKO, T. V., FISHER, J. K., CRAIGEN, W. J., & KORSMEYER, S. J. (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5632), 513–517. <https://doi.org/10.1126/science.1083995>

CHENG, S., XIE, W., MIAO, Y., et al. Identification of key genes in invasive clinically non-functioning pituitary adenoma by integrating analysis of DNA methylation and mRNA expression profiles. *J Transl Med* 17, 407 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02148-3>

CHICO-SARDO, L., CÓRDOVA-ORIZ, I., POLONIO, A. M., S-MELLADO, L. S., MEDRANO, M., GARCÍA-VELADO, J. A., VARELA. E., Reproductive aging and telomeres: Are women and men equally affected? *Mechanisms of Ageing and Development* Vol. 198, 111541. 2021

CHIN, H. S.; LI, M. X.; TAN, I. K. L. et al. VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development. *Nat Commun* **9**, 4976 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07309-4>

CHIN, S. O. Epidemiology of Functioning Pituitary Adenomas *Endocrinology and Metabolism* 2020; 35(2): 237-242. Published online: 30 June 2020 DOI: <https://doi.org/10.3803/EnM.2020.35.2.237>

CONG, Y. S.; WEN J.; BACCHETTI S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Human Molecular Genetics* **8**: 137–142. 1999.

COHEN, S. B.; GRAHAM, M. E.; LOVRECZ, G. O.; BACHE, N.; ROBINSON, P. J.; REDDEL, R. R. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*. Vol 315 Pag. 1850-1853. 2007.

D'ARCY, M.S. (2019), Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, **43**: 582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>

DAVEY, M. G.; HYNES, S. O.; KERIN, M. J.; MILLER, N.; LOWERY, A. J. Ki-67 as a Prognostic Biomarker in Invasive Breast Cancer. *Cancers* 2021, **13**, 4455. <https://doi.org/10.3390/cancers13174455>

DEMASTERS, B. K.; MARKHAM, N.; LILLEHEI, K. O.; SHROYER, K. R. Differential telomerase expression in human primary intracranial tumors. *Am J Clin Pathol* **107**:548-54.1997.

DONEHOWER, L. A., SOUSSI, T., KORKUT, A., LIU, Y., SCHULTZ, A., CARDENAS, M., et al., (2019). Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. *Cell reports*, **28**(5), 1370–1384.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.001>

DRATWA M., WYSOCZAŃSKA B., ŁACINA, P., KUBIK T., BOGUNIA-KUBIK K., TERT—Regulation and Roles in Cancer Formation *Journal Frontiers in Immunology* Volume 11, 2020. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.589929> DOI=10.3389/fimmu.2020.589929

DRUMMOND, J. B., MARTINS, J. C. T., SOARES, M. M. S., DIAS, E. P., Alterações da haste hipofisária e suas implicações clínicas. *Arq. Bras. Endocrinologia Metab.* 2003 Vol. 47 N° 4 Pág 458 – 466.

ELIAS, L. L. K., RODRIGUES, J. A., CASTRO, M. Fisiologia e avaliação laboratorial. In: SAAD, M. J.A., MACIEL, R. M. B., MENDONÇA, B. B. *Endocrinologia*. Editora Atheneu. Ano de publicação: 2007. Pág. 3 – 34.

ENGELAND, K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ* 29, 946–960 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>

FERRER, D. M. P., SOUSA, E. B., MOURÃO L. C., NEIVA A. R. L. F., Contribuição dos telômeros e da telomerase no surgimento de neoplasias e no processo de envelhecimento *Rev. Interd. Ciên. Saúde*, v. 4, n.2, p. 89-99, 2017.

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

FUKUOKA, H., SHICHI, H., YAMAMOTO, M., TAKAHASHI, Y., The Mechanisms Underlying Autonomous Adrenocorticotrophic Hormone Secretion in Cushing's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 9132. <https://doi.org/10.3390/ijms21239132>

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

GERLACH, C.; SAKKAB, DY; SCHOLZEN, T.; DASSLER, R.; ALISON, MR; GERDES, J. Expressão de Ki-67 durante a regeneração hepática de ratos após hepatectomia parcial. *Hepatology* 1997, 26, 573-578.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. DA. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia, [S. l.]*, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2007v53n3.1801. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/1801>.

GUTIERREZ-RODRIGUES, F., SANTANA-LEMOS, B. A, SCHEUCHER, P.S, ALVES-PAIVA, R. M, CALADO RT (2014) Direct comparison of Flow-FISH and qPCR as Diagnostic Tests for Telomere Length Measurement in Humans. *PLoS ONE* 9(11): e113747. doi: 10.1371/journal.pone.0113747

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, vol. 144, Issue 5, p. 646-674, 2011. DOI: [doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013)

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*, v30, n.3, p: 215-219, 2003.

JÓZWIAK, P., CIESIELSKI, P., FORMA, E., KOZAL, K., WÓJCIK-KROWIRANDA, K., CWONDA, Ł., BIEŃKIEWICZ, A., BRYŚ, M., & KRZEŚLAK, A. (2020). Expression of voltage-dependent anion channels in endometrial cancer and its potential prognostic significance. *Tumor Biology*. <https://doi.org/10.1177/1010428320951057>

KOELSCHE, C., SAHM, F., CAPPER, D. et al. Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol* 126, 907–915 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1195-5>

LECHAN R. M., TONI, R. Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary. [Updated 2016 Nov 28]. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279126/>

LI, J.; WEN, S.; LI, B.; LI, N.; ZHAN, X. Phosphorylation-Mediated Molecular Pathway Changes in Human Pituitary Neuroendocrine Tumors Identified by Quantitative Phosphoproteomics. *Cells* 2021, *10*, 2225. <https://doi.org/10.3390/cells10092225>

LU L, ZHANG C, ZHU G, IRWIN M, RISCH H, MENATO G, et al. Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. *Breast Cancer Res* 13: R56. 2011.

LU, L., WAN, X., XU, Y., CHEN, J., SHU, K., & LEI, T. (2022). Classifying Pituitary Adenoma Invasiveness Based on Radiological, Surgical and Histological Features: A Retrospective Assessment of 903 Cases. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(9), 2464. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/jcm11092464>

LORBEER, F. K., HOCKEMEYER, D., TERT promoter mutations and telomeres during tumorigenesis, *Current Opinion in Genetics & Development*, Vol. 60, 2020, Pag. 56-62, ISSN 0959-437X, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.02.001>

MACHADO, L. F., ELIAS, P. C. L., MOREIRA, A. C., SANTOS, A. C. DOS, JUNIOR, L. O. M., MRI radiomics for the prediction of recurrence in patients with clinically non-functioning pituitary macroadenomas, *Computers in Biology and Medicine*, Volume 124, (2020), 103966, ISSN 0010-4825, <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2020.103966>.

MATO, E., BARCELÓ-BATLLORI, S., ORERA, I., SELVA, L., CORRA, M., GONZÁLEZ, C. et al. The proteomic 2D-DIGE approach reveals the protein voltage-dependent anion channel 2 as a potential therapeutic target in epithelial thyroid tumours, *Molecular and Cellular Endocrinology*, Volume 404, 2015, Pages 37-45, ISSN 0303-7207, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.021>.

MAREI, H. E., ALTHANI, A., AFIFI, N. *et al.* p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell Int* **21**, 703 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02396-8>

MARTINS, C. S., SANTANA-LEMOS B. A., SAGGIORO, F. P., NEDER, L., MACHADO, H. R., MOREIRA, A. C., et al. Telomere length and telomerase expression in pituitary tumors. *J Endocrinol Invest* 38:1243-6. 2015.

MAURYA, S. R., MAHALAKSHMI, R., Mitochondrial VDAC2 and cell homeostasis: highlighting hidden structural features and unique functionalities. *Biological Reviews* Volume 92, Issue 4 p. 1843-1858 2016 <https://doi.org/10.1111/brv.12311>

MELMED, S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 May;7(5):257-66. doi: 10.1038/nrendo.2011.40. Epub 2011 Mar 22. Erratum in: *Nat Rev Endocrinol*. 2011 May;7(5): following 266. PMID: 21423242.

METE, O., EZZAT, S. & ASA, S. L., (2012). Biomarkers of aggressive pituitary adenomas, *Journal of Molecular Endocrinology*, 49(2), R69-R78. Retrieved Oct1, 2022, from <https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/49/2/R69.xml>

MOLINA, P. E. Fisiologia endócrina (recurso eletrônico) /tradução: André Garcia Islabão, Patricia Lydie Josephine Voeux; revisão técnica: Giovanna A. Balarini Lima, Giselle Taboada. – 5ª Ed. – Porto Alegre AMGH, 2021. ISBN 978-65-5804-007-1

MORAIS, E., MARTINS, E., BOELONE, J., GOMES, D. (2014). Immunization with Recombinant Pb27 Protein Reduces the Levels of Pulmonary Fibrosis Caused by the Inflammatory Response Against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*. 179. 10.1007/s11046-014-9815-8.

MOURA, E. G., MOURA, C. C. P., Regulação da síntese e secreção de tireotrofina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* Vol. 48, nº 1, 2004.)

MOYZIS, R. K., BUCKINGHAM, J. M., CRAM, L. S., DANI, M., DEAVEN, L. L., JONES, M. D., MEYNE J, RATLIFF, R. L., WU, J. R., A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG) n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Sep;85(18):6622-6. Doi: 10.1073/pnas.85.18.6622. PMID: 3413114; PMCID: PMC282029.

NAGHDI, S., & HAJNÓCZKY, G., (2016). VDAC2-specific cellular functions and the underlying structure. *Biochimica et biophysica acta*, 1863(10), 2503–2514. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.020>

NEDRESKY, D., SINGH. G., Physiology, Luteinizing Hormone. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022. PMID: 30969514.

NELSON, C. P., CODD, V., Genetic determinants of telomere length and cancer risk, *Current Opinion in Genetics & Development*, Volume 60, 2020, Pag. 63-68, ISSN 0959-437X, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.02.007>.

NISHIOKA, H., INOSHITA, N., METE, O. et al. The Complementary Role of Transcription Factors in the Accurate Diagnosis of Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *Endocr Pathol* 26, 349–355 (2015). <https://doi.org/10.1007/s12022-015-9398-z>

OGINO, L. L., LAMBACK, E. B., GUTERRES, A. *et al.* Telomerase expression in clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endocrine* 72, 208–215 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02524-w>

PACINI F, CANTARA S, CAPEZZONE M, MARCHISOTTA S. Telomerase and the endocrine system. *Nat Rev Endocrinol* 7: 420-30. 2011.

PAREEK, S., JAIN, U., BALAYAN, S., CHAUHAN, N. Ultra-sensitive nano-molecular imprinting polymer-based electrochemical sensor for Follicle-Stimulating Hormone (FSH) detection, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 180, 2022, 108329, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108329>.

PAROLIN, M. B., & REASON, I. J. M., (2001). Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arquivos de Gastroenterologia*, 38(Arq. Gastroenterol., 2001n38(2)), 138-144. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032001000200011>

PARSONS, H. A. Telômeros, telomerase e cancer, *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, V. 5, N.1, p. 54-59, 2003.

PEI, Z., FANG, Y., MU, S., LI, J., FENG, T., LIN, K., & WANG, S. (2022). Perioperative fluctuation and overall evaluation of adenohipophyseal hormone secretion in patients with nonfunctioning pituitary adenoma, *Neurosurgical Focus*, 53(6), E10. from <https://thejns.org/focus/view/journals/neurosurg-focus/53/6/article-pE10.xml>

PENN, D. L., BURKE, W. T., & LAWS, E. R. (2018). Management of non-functioning pituitary adenomas: surgery. *Pituitary*, 21(2), 145–153. <https://doi.org/10.1007/s11102-017-0854-2>

PICÓ, A., ARANDA-LÓPEZ, I., SESMILO, G., TOLDOS-GONZÁLEZ, Ó., JAPÓN, M. A., LUQUE, R. M., PUIG-DOMINGO, M. Recommendations on the pathological report of pituitary tumors. A consensus of experts of the Spanish Society of Endocrinology and Nutrition and the Spanish Society of Pathology, *Endocrinología, Diabetes y Nutrición* (English ed.) Vol. 68. Issue 3. Pages 196-207 (March 2021) DOI: 10.1016/j.endien.2020.10.007

RANGEL. E. M. L. Avaliação do Ambiente Virtual de Aprendizagem no Ensino de Fisiologia em um Curso de Enfermagem. 2009. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP

RAZVI, S., BHANA, S., MRABETI, S. Challenges in Interpreting Thyroid Stimulating Hormone Results in the Diagnosis of Thyroid Dysfunction. *Journal of Thyroid Research* Volume 2019, Article ID 4106816. <https://doi.org/10.1155/2019/4106816>

REINA, S. et al., VDAC3 as a potential marker of mitochondrial status is involved in cancer and pathology. *Frontiers in Oncology*, v. 6, n. DEC, p. 1–11, 2016.

RIBEIRO, M. C. M. Genética molecular. Florianópolis: UFSC, 2009.

RIBEIRO, B. B., ROCHA, M. A. B., ALMEIDA, G. A. e., & ROCHA, R. T. B. (2014). Macroadenoma hipofisário: alterações campimétricas visuais. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, 73 (Rev. Bras. Oftalmol., 2014 73(2)). <https://doi.org/10.5935/0034-7280.20140027>

SALGADO, B. L., FARIA, M. S., Fisiologia do hipotálamo e da hipófise. In: Bandeira, F. *Endocrinologia e diabetes*. Editora MEDSI. Ano de publicação: 2003. Pág 57 – 80.

SANTORO, L. L., LABREA, V. N., GALLICCHIO, B. D., PIETA, M. P., MAMAN, R. DE, NETO, E. B. P., TONDO, L. P., & CARVALHO, L. R. DEL A. T. (2022). Caso de Macroadenoma hipofisário com melhora da campimetria visual sem regressão tumoral: Macroadenoma hipofisário com campimetria visual melhorada sem regressão tumoral: relato de caso e revisão. *Brazilian Journal of Health Review*, 5 (5), 21020–21027. <https://doi.org/10.34119/bjhrv5n5-256>

SANTOS FONTANEZ S.E, DE JESUS O., Neurohypophysis. [Atualizado em 11 de julho de 2022]. In: StatPearls [Internet]. Ilha do Tesouro (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan- Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560733/>

SARAIVA, M.V. A., MATOS, M. H. T., FAUSTINO, L. R., CELESTINO, J. J. H., SILVA, J. R. V., FIGUEIREDO, J. R. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese, Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, Vol. 34. Nº4. Pág. 206-221, Out/Dez. 2010

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

SELUANOV, A., GLADYSHEV, V. N., VIJG, J., & GORBUNOVA, V. (2018). Mechanisms of cancer resistance in long-lived mammals. *Nature reviews. Cancer*, 18(7), 433–441. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0004-9>

SERIOLI, S., DOGLIETTO, F., FIORINDI, A., BIROLI, A., MATTAVELLI, D., BUFFOLI, B., FERRARI, M., et al. (2019). Pituitary Adenomas and Invasiveness from Anatomico-Surgical, Radiological, and Histological Perspectives: A Systematic Literature Review. *Cancers*, 11(12), 1936. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11121936>

SHAY, J. W, WRIGHT, W. E., Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nat Rev Genet* 20, 299–309 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0099-1>

SHIMIZU, S., NARITA, M., TSUJIMOTO, Y. et al. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483–487 (1999). <https://doi.org/10.1038/20959>

SILVA, L. D. G., CUNHA, D. O., CORDEIRO, J. A. B. L., PASSOS, X. S., ATAIDES, F. S., COSTA, C. A. S. T. V., A inibição da telomerase em oncócitos: o fim da imortalidade celular. *Revista Brasileira Militar de Ciências*, Vol. 5. Nº 12. 2019 ISSN 2447-9071doi 10.36414/rbmc.v5i12.12

SILVA, M. R. D., FURLANETTO, R. P., Hipotireoidismo. In: Chacra, A. B. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP-EPM – Endocrinologia. Editora Manole Ltda. Ano de publicação: 2009. Pág. 99 – 116.

SMOGORZEWSKA A, DE LANGE T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 73: 177-208 Annual Review of Biochemistry 2004 DOI: 10.1146/annurev.biochem.73.071403.160049

STOUPA, A., KARIYAWASAM, D., POLAK, M., & CARRÉ, A., (2022). Genetics of congenital hypothyroidism: Modern concepts. *Pediatric investigation*, 6(2), 123–134. <https://doi.org/10.1002/ped4.12324>

TAVARES, M. R., FRAZAO, R., & DONATO, J., JR., (2023). Understanding the role of growth hormone in situations of metabolic stress, *Journal of Endocrinology*, 256(1), 220159. Retrieved Feb 6, 2023, from <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/256/1/JOE-22-0159.xml>

TELLA JR, O. I. DE., HERCULANO, M. A., DELCELLO, R., & AGUIAR, P. H.. (2002). PitNETs não secretantes: Estudo de 36 casos. *Arquivos De Neuro-psiquiatria*, 60(Arq. Neuro-Psiquiatr., 2002 60(1)). <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2002000100021>

TRIVELLIN, G., & KORBONITS, M. (2011). AIP and its interacting partners, *Journal of Endocrinology*, 210(2), 137-155. DOI: 10.1530/joe-11-0054. PMID: 21454441.

TROUILLAS, J, JAFFRAIN-REA, M-L, VASILJEVIC, A., RAVEROT, G., RONCAROLI, F, VILLA C. How to Classify Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNET)s in 2020. *Cancers*. 2020; 12(2):514. <https://doi.org/10.3390/cancers12020514>

VASILEV, V., DALY, A. F., TRIVELLIN, G., STRATAKIS, C. A., ZACHARIEVA, S., & BECKERS, A. (2020). Hereditary endocrine tumours: current state-of-the-art and research opportunities: The roles of AIP and GPR101 in familial isolated pituitary adenomas (FIPA), *Endocrine-Related Cancer*, 27(8), T77-T86. <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/27/8/ERC-20-0015.xml>

VARLAMOV, E. V., MCCARTNEY, S., & FLESERIU, M. (2019). Functioning Pituitary Adenomas - Current Treatment Options and Emerging Medical Therapies. *European endocrinology*, 15(1), 30–40. <https://doi.org/10.17925/EE.2019.15.1.30>

WANG, X., LI, M., JIANG, X., WANG, F., LING, S., NIU, C., Prediction of Higher Ki-67 Index in Pituitary Adenomas by Pre- and Intra-Operative Clinical Characteristics. *Brain Sciences*. 2022, Vol. 12. Issue 8. 1002; <https://doi.org/10.3390/brainsci12081002>

YOSHINO, A., KATAYAMA, Y., FUKUSHIMA, T., WATANABE, T., KOMINE, C., YOKOYAMA, T., et al. Telomerase activity in pituitary adenomas: significance of telomerase expression in predicting pituitary adenoma recurrence. *J Neurooncol* 63:155-62. 2003.

YUHAN L., ZHIQUN W., TIAN JIHUI & PAN RENLONG, (2021) Ki-67 labeling index and Knosp classification of pituitary adenomas, *British Journal of Neurosurgery*, DOI:10.1080/02688697.2021.1884186

YUAN Z., DEWSON G., CZABOTAR, P. E., BIRKINSHAW, R. W.; *VDAC2* and the *BCL-2* family of proteins. *Biochem Soc Trans* 17 December 2021; 49 (6): 2787–2795. doi: <https://doi.org/10.1042/BST20210753>

ZAHA, A., FERREIRA, H. B., PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia molecular básica*, 5ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2014.

ZHANG, C., LIU, J., XU, D., ZHANG, T., HU, W., FENG, Z., Gain-of-function mutant p53 in cancer progress and therapy, *Journal of Molecular Cell Biology*, Volume 12, Edição 9, setembro de 2020, páginas 674–687, <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa040>

ZHOU, W., BRUMPTON, B., KABIL, O. *et al.* GWAS of thyroid stimulating hormone highlights pleiotropic effects and inverse association with thyroid cancer. *Nat Commun* 11, 3981 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17718-z>

## ARTIGO

### Avaliação da expressão gênica de *VDAC2* e *TERT* e alterações moleculares em seu promotor nos tumores neuroendócrinos da hipófise.

Wellyandra Costa dos Santos<sup>3</sup>, Dr. Manuel dos Santos Faria<sup>2,3</sup>, Dr. Marcelo Magalhaes Silva<sup>1,3</sup>

Afiliação:

1. Centro de Pesquisa Clínica, Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (CEPEC-HUUFMA), São Luís, MA, Brasil.
2. Serviço de Endocrinologia, Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA), São Luís, MA, Brasil.
3. Grupo de Pesquisa em Endocrinologia e Metabologia Clínica e Molecular (ENDOCLIM), São Luís, MA, Brasil.

**Autor Correspondente:** Marcelo Magalhães Silva, Dr., Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA), São Luís, MA, Brasil.

**E-mail:** magalhaes\_ms@yahoo.com.br

## RESUMO

**Introdução:** Os tumores neuroendócrinos da hipófise (PitNETs) são neoplasias originárias da adenohipófise e correspondem a cerca de 10 a 15% dos tumores intracranianos. Tais tumores podem ser classificados em funcionantes e não funcionantes, de acordo com a produção de hormônios em quantidade suficiente para induzir manifestações clínicas. Recentemente, alterações nos níveis de expressão dos genes *TERT* e *VDAC2* têm sugerido um importante papel desses genes no desenvolvimento de neoplasias endócrinas, podendo também estar envolvidos na oncogênese dos PitNETs. A patogênese molecular dos PitNETs ainda é pouco compreendida e, portanto, faz-se necessário um maior estudo sobre esse tema em diferentes populações. **Objetivo:** avaliar a expressão gênica de *VDAC2* e *TERT* e alterações moleculares em seu promotor em portadores de PitNETs atendidos no estado do Maranhão. **Metodologia:** foram analisadas 89 amostras de PitNETs de pacientes submetidos à cirurgia no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – HUUFMA. Realizou-se a extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA a partir do material biológico coletado e, posteriormente, foi feita a PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica de *TERT* e *VDAC2*. Para a análise de mutações no promotor *TERT* (posições C228T e C250T), foi realizado sequenciamento de DNA. **Resultados:** a maioria dos casos corresponderam ao sexo feminino (59/89 - 66,3%) e apresentavam entre 51 e 60 anos (25/89 - 28,1%). Considerando as características tumorais, 64 casos (71,9%) foram classificados como não funcionantes e 83 tumores (93,3%) apresentaram-se como macrotumores. Em relação às análises moleculares, embora os pacientes acromegálicos tenham apresentado maior índice de expressão (IE) de *TERT* (IE=1,67), não foram observadas diferenças significativas dessa variável entre tipos tumorais. Além disso, também não foram detectadas mutações nas posições C228T e C250T do promotor *TERT*. Em relação ao *VDAC2*, comparando-se com tecido hipofisário normal, verificou-se um aumento de expressão desse gene em portadores de Doença de Cushing (6,83 vezes), Acromegalia (3,08 vezes), tumores não funcionantes (3,01 vezes). Foi constatada também em nossa amostra, uma significativa correlação entre as expressões de *TERT* e *VDAC2* (rs= 0,278; p=0,01). **Conclusão:** No presente estudo, a maior expressão de *VDAC2* nas amostras tumorais sugere uma possível participação desse gene na oncogênese dos PitNETs. Em adição, a correlação entre *VDAC2* e *TERT* pode apontar para uma atuação conjunta de ambas as vias de sinalização, ensejando a possibilidade de novos alvos terapêuticos.

**Palavras-chave:** Tumores hipofisários, Telomerase, Apoptose, Biomarcadores.

## ABSTRACT

**Introduction:** Pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs) are neoplasms originating from the adenohypophysis and correspond to approximately 10 to 15% of intracranial tumors. Such tumors can be classified into functioning and non-functioning, according to the production of hormones in sufficient quantity to induce clinical manifestations. Recently, alterations in the expression levels of the TERT and VDAC2 genes have suggested an important role for these genes in the development of endocrine neoplasms, and may also be involved in the oncogenesis of PitNETs. The molecular pathogenesis of PitNETs is still poorly understood and, therefore, further study on this topic in different populations is needed. **Objective:** to evaluate the gene expression of VDAC2 and TERT and molecular alterations in its promoter in PitNET carriers assisted in the state of Maranhão. **Methodology:** 89 samples of PitNETs from patients undergoing surgery at the University Hospital of the Federal University of Maranhão – HUUFMA were analyzed. Nucleic acid extraction and cDNA synthesis were performed from the biological material collected and, subsequently, real-time PCR was performed to evaluate TERT and VDAC2 gene expression. For the analysis of mutations in the TERT promoter (positions C228T and C250T), DNA sequencing was performed. **Results:** most cases were female (59/89 - 66.3%) and aged between 51 and 60 years (25/89 - 28.1%). Considering tumor characteristics, 64 cases (71.9%) were classified as non-functioning and 83 tumors (93.3%) presented as macrotumors. Regarding molecular analyses, although acromegalic patients had a higher TERT expression index (IE=1.67), no significant differences were observed for this variable between tumor types. Furthermore, no mutations were detected at positions C228T and C250T of the TERT promoter. Regarding VDAC2, when compared to normal pituitary tissue, there was an increase in expression of this gene in patients with Cushing's disease (6.83 times), Acromegaly (3.08 times), non-functioning tumors (3.01 times). A significant correlation was also found in our sample between TERT and VDAC2 expressions ( $r_s = 0.278$ ;  $p = 0.01$ ). **Conclusion:** In the present study, the greater expression of VDAC2 in tumor samples suggests a possible participation of this gene in the oncogenesis of PitNETs. In addition, the correlation between VDAC2 and TERT may point to a joint action of both signaling pathways, giving rise to the possibility of new therapeutic targets.

**Keywords:** Pituitary tumors, Telomerase, Apoptosis, Biomarkers.

## INTRODUÇÃO

Os tumores neuroendócrinos da hipófise (PitNETs) são neoplasias com crescente incidência devido à evolução dos métodos imagenológicos e dos testes hormonais para detecção. Os PitNETs podem ser classificados de acordo com o tamanho, em microtumores (<10 mm), macrotumores ( $\geq 10$  mm) e também em funcionantes e clinicamente não funcionantes segundo as manifestações clínicas devido à secreção inapropriada de hormônios (NF-PitNETs) [1, 2, 3].

Apesar da maioria dos PitNETs comportarem-se como neoplasias benignas, esforços têm sido feitos para estabelecer o comportamento clínico de tumores individuais, com ênfase em prever aqueles que podem se comportar de forma mais agressiva [4]. Para tanto, o entendimento da patogênese molecular desses tumores, ainda pouco compreendida, é de extrema importância. Alguns estudos têm evidenciado que o desenvolvimento dos PitNETs seja um processo multifatorial, incluindo alterações genéticas e epigenéticas em genes relacionados à replicação celular e apoptose [5].

Concernente ao processo de tumorigênese, o encurtamento dos telômeros e a ativação da telomerase têm sido relacionados à transformação celular [6, 7]. Fisiologicamente, os telômeros conferem estabilidade aos cromossomos, evitam a fusão e degradação do DNA [8]. Tais estruturas são compostas de repetições 'TTAGGG' na extremidade dos cromossomos, sendo a manutenção do seu comprimento crítica no desenvolvimento de várias doenças humanas, incluindo o câncer. O comprimento dos telômeros é regulado pela telomerase, a grande transcriptase reversa multicomponente que reconhece, liga e alonga as extremidades dos telômeros usando seu molde de RNA intrínseco [9].

A atividade da telomerase é predominantemente regulada pelo domínio transcriptase reversa da telomerase (TERT) [10]. Em humanos, essa importante subunidade catalítica é codificada pelo gene *TERT* localizado no braço curto do cromossomo 5 (5p15.33). Em células somáticas, o nível de expressão de *TERT* é baixo ou ausente [11]. Por outro lado, em algumas neoplasias, tem sido observado significativo aumento da expressão desse gene e consequente ativação da telomerase [12]. Tais achados indicam que a expressão de *TERT* possa desempenhar um papel crucial na imortalização celular e agressividade tumoral [13].

Embora seja importante manter o comprimento adequado dos telômeros para a estabilidade do genoma, o alongamento desregulado dessas estruturas cromossômicas torna as células imortais, o que é uma característica das células cancerígenas. O aumento da

atividade da telomerase durante a carcinogênese impede que as células neoplásicas entrem em senescência ou apoptose [13, 14].

A apoptose é um mecanismo de morte celular importante para eliminação de células que perderam a função no organismo, sendo, portanto, um mecanismo natural de defesa antineoplásica [18, 4, 30]. Atuando nesse processo, as proteínas VDACs, particularmente VDAC2, podem interagir com membros da família Bcl-2 proporcionando a liberação do citocromo c para o citoplasma, evento crucial para desencadeamento da apoptose [31].

O crescente conhecimento do papel da resistência à morte celular programada na tumorigênese tem levantado interesse no uso de moduladores da apoptose como alvo terapêutico da terapia antitumoral [15]. Recentemente uma proteína localizada na membrana externa da mitocôndria, VDAC (*voltage-dependent anion channel*), parece desempenhar um papel importante na regulação da apoptose, estando envolvida na oncogênese de alguns tumores [16]. Essa proteína apresenta três isoformas distintas (VDAC 1, 2 e 3), com níveis diferentes de expressão celular [4,17]. Estudos tem demonstrado que VDAC2 é essencial para induzir apoptose mediada por BAX [18]. Em tumores de tireoide, o aumento da expressão de VDAC2 foi encontrado em todos os subtipos histológicos e seu silenciamento levou à maior sensibilidade à quimioterapia [19]. Em câncer de endométrio a sobrevida global significativamente mais curta foi observada em pacientes com alto nível de expressão de VDAC1 ou VDAC2 em comparação com o paciente com baixa expressão dessas duas porinas [32]. Entretanto, até o momento nenhum estudo foi realizado para avaliação do papel de VDAC2 na tumorigênese dos PitNETs.

Assim, para uma maior compreensão na patogênese dos PitNETs, avaliamos a expressão gênica de *TERT*, envolvidos no processo de imortalização celular, e de VDAC2, relacionado à resistência à apoptose.

## **METODOLOGIA**

### **Participantes e amostras**

Para avaliar a expressão gênica de *VDAC2* e *TERT* em PitNETs, foram incluídas amostras tumorais obtidas de casos acompanhados no ambulatório de neuroendocrinologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – HUUFMA, São Luís, Maranhão, Brasil.

Foram incluídos no estudo pacientes com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos, que apresentaram diagnóstico de PitNETs. Não foram incluídos pacientes menores de idade (menores de 18 anos) ou que a análise histopatológica tenha sido incompatível com tumor hipofisário. Os voluntários dispostos a participarem desta pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão sob o parecer nº 2.908.868.

### **Avaliação Clínica**

O diagnóstico de PitNET foi estabelecido com base em um quadro clínico correspondente e exame de ressonância magnética da hipófise compatível com o diagnóstico, além de um painel hormonal do tumor hipofisário avaliado por meio de imunohistoquímica, quando apropriado. Os PitNETs clinicamente não funcionantes, bem como os prolactinomas, doença de Cushing e acromegalia, foram definidos de acordo com as diretrizes publicadas [20-23] .

Os dados clínicos foram coletados no Serviço de Endocrinologia do HUUFMA, e os dados referentes às análises histopatológicas foram coletados no Serviço de Anatomia patológica do HUUFMA.

### **Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA**

O DNA do tecido neoplásico foi extraído utilizando o BIOPUR Kit de Extração Mini Spin Plus (Mobius, PR, Brasil), enquanto que o RNA desse material foi isolado por meio do *RNeasy mini Kit* - QIAGEN seguindo as recomendações dos fabricantes. Os ácidos nucleicos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific). Para a síntese do cDNA, 1 µg de RNA foi submetido a reação de transcrição reversa (RT-PCR) utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) seguindo as recomendações do fabricante .

### **Avaliação da expressão gênica de *TERT***

A análise da expressão genica de *TERT* foi realizada pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos para *TERT* e para o gene de referência *GAPDH* (Lu et al., 2011). As reações de PCR tiveram o volume final de 20 µL e foram compostas por 100 ng de cDNA molde, 10 µL de 2X Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e 100 nM de iniciadores. A PCR em tempo real foi realizada em equipamento Light Cycler® Nano SW 1.0, as seguintes condições de amplificação foram utilizadas: incubação inicial a 50°C por 2 minutos, desnaturação a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a PCR, curvas de dissociação (melting) foram geradas para avaliar a especificidade da reação. Todas as amostras foram analisadas em duplicata para cada gene testado. O tecido hipofisário normal foi usado como calibrador.

Um índice de expressão (IE) foi calculado para expressão de *TERT* usando a seguinte equação  $1.000 \times 2^{-\Delta Ct}$ , onde  $\Delta Ct = Ct(TERT) - Ct(GAPDH)$  [14]. Considerando-se a média do Índice de Expressão (IE) de *TERT*, os pacientes foram classificados como “baixa telomerase” (IE < média geral das amostras analisadas) e foram classificados como “alta telomerase” (IE > média geral das amostras analisadas).

### **Análise da expressão gênica de *VDAC2***

A avaliação da expressão gênica de *VDAC2*, foi realizada pela técnica de PCR quantitativa em tempo real – (qPCR). Utilizou-se (TaqMan® and Custom TaqMan® Gene Expression Assays) oligonucleotídeos iniciadores, previamente descritos para *VDAC2*, e para o gene de referência *GAPDH*. Todas as reações foram realizadas com 100 ng de cDNA em um volume total de 50 µl, TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e o conjunto de primer/sonda pré-concebido e marcado (Assays-on-Demand™ Gene Expression assay, Applied Biosystems ). As amostras foram analisadas em duplicata, controles negativos foram incluídos e os produtos de PCR foram verificados usando análise de curva de dissociação imediatamente após RT-PCR. A reação de PCR seguiu as seguintes etapas: Incubação inicial a 50°C por 2 minutos, a ativação da polimerase a 95°C por 2 minutos, desnaturação 95°C por 1 segundo e a extensão a 60°C por 20 segundos em 40 ciclos [19]. A avaliação da expressão de *VDAC2* foi realizada no aparelho Rotor gene Q da Qiagen. Todas as amostras foram analisadas em duplicata para cada gene testado. A quantificação relativa da expressão gênica foi calculado pelo método 2-DDCt utilizando tecido hipofisário normal como calibrador.

## **Análise de mutações no promotor *TERT***

As PCR para identificação de mutações na região promotora de *TERT* serão compostas por Tampão10X (Tris-HCl 200 M PH 8,4 e KCl 500 mM), 2,4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,24 mM de cada dNTP, 0,15 μM de ambos iniciadores senso e anti-senso, uma unidade de Taq DNA polimerase e 50ng de DNA genômico. As reações de amplificação ocorreram em termociclador GeneAmp®PCR System 9700 com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 20 segundos a 92°C (desnaturação), 20 segundos a 53°C (anelamento) e 45 segundos a 68°C (extensão). A extensão final foi realizada a 68°C durante 5 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, purificados com o kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) e posteriormente sequenciados pelo método de terminação de cadeia dideoxi.

Os eletroferogramas obtidos pelo sequenciamento realizado no *SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific)* foram editados utilizando os programas BioEdit 7.0.9.0 e ChromasPro 2.33 e as sequências consensos dos contigs foram alinhadas utilizando a ferramenta de bioinformática Clustal X.

## **Análise estatística**

A análise de dados foi realizada utilizando os recursos dos softwares GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) e SPSS versão 27.0 (IBM, Chicago, IL, USA). Inicialmente, a estatística descritiva foi realizada utilizando medidas de frequência absoluta, relativa, média, desvio-padrão ( $\pm$  dp). A normalidade da distribuição amostral foi aferida através do teste Shapiro–Wilk. Os testes T de Student independente e ANOVA one-way foram utilizados para dados com distribuição normal e os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para dados não paramétricos. Modelos de regressão linear múltipla foram utilizados para verificar a relação das expressões de *VDAC2* e *TERT* com a presença de comorbidades, eixo afetado e perfil hormonal. O nível de significância adotado foi de 5% ( $P < 0,05$ ). Os resultados foram apresentados por meio de tabelas e gráficos de barras.

## RESULTADOS

### Dados clínicos e demográficos

Um total de 89 amostras foram incluídas no presente estudo. A descrição das variáveis clínicas e demográficas está apresentada na tabela 1. Destaca-se que a maioria da amostra foi formada por mulheres, correspondendo a 66,3% (n=59) dos casos. Quanto a faixa etária, 28,1% estão entre 51 a 60 anos. A idade média ao diagnóstico foi de 51,3 anos  $\pm$  13,1. Em relação ao tipo tumoral, os diagnósticos mais frequentes foram NF-PitNETs com 71,9% (n=64), acromegalia com 16,9% (n=15) e Doença de Cushing com 9,0% (n=8) (Tabela 1).

No tocante ao tamanho do tumor, 93,3% (n=83) dos casos apresentavam-se como macrotumores.

**Tabela 1.** Distribuição das variáveis de caracterização geral da amostra de pacientes com PitNETs (n=89).

Variáveis	Média	$\pm$ dp	n	(%)
<b>Sexo</b>				
Masculino			30	(33,7)
Feminino			59	(66,3)
<b>Idade (em anos)</b>	51,3	$\pm$ 13,1		
<b>Faixa etária</b>				
20 a 30 anos			6	(6,7)
31 a 40 anos			13	(14,6)
41 a 50 anos			22	(24,7)
51 a 60 anos			25	(28,1)
61 a 70 anos			18	(20,2)
Mais que 70 anos			5	(5,6)
<b>Diagnóstico</b>				
Não funcionante			64	(71,9)
Acromegalia			15	(16,9)
Doença de Cushing			8	(9,0)
Prolactinoma			1	(1,1)
Gonadotrofinoma			1	(1,1)

Continuação da tabela 1

Variáveis	Média	±dp	n	(%)
Tamanho do tumor hipofisário (em cm)	3,1	±1,6		
Microtumor			6	(6,7)
Macrotumor			83	(93,3)

±dp - desvio padrão; PitNETs - Tumores neuroendócrinos da hipófise; cm - centímetros.

### Expressão gênica de *TERT* e sua influência sobre os parâmetros clínicos e demográficos

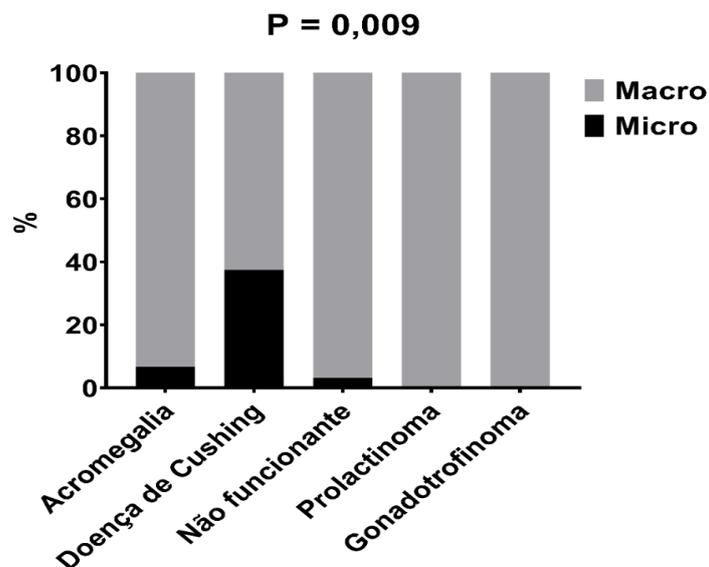
O índice de expressão médio de *TERT* na amostra estudada foi de  $1,12 \pm 1,93$ , sendo que 25,8% (n=23) casos possuíam alta expressão desse gene (Tabela 2).

**Tabela 2.** Expressão do gene *TERT* em pacientes com PitNETs (n=89).

Variáveis	média	±dp	n	(%)
Índice de expressão <i>TERT</i>	1,12	±1,93		
Categoria de expressão <i>TERT</i>				
Alta			23	(25,8)
Baixa			66	(74,2)

PitNETs - Tumores neuroendócrinos da hipófise; *TERT* - Transcriptase Reversa da Telomerase; ±dp - desvio padrão.

A Figura 1 mostra que a distribuição do tamanho do tumor apresentou diferenças significantes de acordo com o diagnóstico da lesão ( $P = 0.009$ ). Os microtumores foram mais frequentes na categoria doença de Cushing (3 de 8, 37,5%) quando comparado as categorias acromegalia (3,1%) e não funcionante (6,7%).



**Figura 1.** Análise comparativa da distribuição do tamanho do tumor de acordo com o tipo histopatológico. Micro: microtumores. Macro: Macrotumores

Conforme mostrado na Tabela 3, os indivíduos com idade 20 a 30 anos, apresentaram maior expressão de *TERT* comparada às outras faixas etárias.

**Tabela 3.** Distribuição da expressão do gene *TERT* de acordo com as variáveis demográficas e clínicas.

Variáveis	Expressão de <i>TERT</i>		P
	média	±dp	
Sexo			0,585
Masculino	1,28	1,98	
Feminino	1,03	1,91	
Faixa etária			0,083
20 a 30 anos	2,95	3,03	
31 a 40 anos	0,83	1,37	
41 a 50 anos	1,13	1,47	
51 a 60 anos	0,54	0,91	
61 a 70 anos	1,70	2,99	
Mais que 70 anos	0,36	0,82	
Diagnóstico			0,608
Acromegalia	1,67	3,21	
Doença de Cushing	1,02	1,01	
Não funcionante	1,01	1,64	
Prolactinoma	0,20	-	
Gonadotrofinoma	1,50	-	
Tamanho do tumor hipofisário			0,815
Micro	0,68	0,84	
Macro	1,15	1,98	

*TERT* – Transcriptase Reversa da Telomerase; ±dp – desvio padrão; P- P valor nível de significância; Micro- Microtumores; Macro- Macrotumores

Em relação a mutação, não foi observada a presença de mutação nos *hotspot* C228T e C250T do promotor do gene *TERT* nas amostras analisadas.

### **Expressão gênica de *VDAC2* e seu impacto sobre características clínicas e demográficas**

Conforme observado na tabela 4, não foram observadas diferenças na expressão de *VDAC2* nas variáveis sexo, faixa etária, tamanho tumoral. Em relação a expressão de *VDAC2* nos diferentes tipos tumorais, quando comparado com a amostra normal, verificou-se uma elevação da expressão desse gene em pacientes com Doença de Cushing (6,83 vezes), Acromegalia (3,08 vezes) e NF (3,01 vezes).

**Tabela 4.** Distribuição da expressão gênica de *VDAC2* de acordo com as variáveis demográficas e clínicas.

Variáveis	Expressão de <i>VDAC2</i>		P
	média	±dp	
Sexo			0,507
Masculino	4,02	5,19	
Feminino	2,98	4,50	
Faixa etária			0,568
20 a 30 anos	6,50	6,24	
31 a 40 anos	3,58	5,01	
41 a 50 anos	3,49	5,40	
51 a 60 anos	3,04	4,62	
61 a 70 anos	2,06	3,04	
Mais que 70 anos	4,01	5,30	
Diagnóstico			0,625
Acromegalia	3,08	3,33	
Doença de Cushing	6,83	6,76	
Não funcionante	3,01	4,65	
Prolactinoma	0,36	-	
Gonadotrofinoma	0,96	-	
Tamanho do tumor hipofisário			0,909
Micro	5,68	8,03	
Macro	3,21	4,56	

*VDAC2* – Canais de ânion dependente de voltagem 2; ±dp – desvio padrão; P- P valor nível de significância; Micro- Microtumores; Macro- Macrotumores

### Análise de fatores associados ao tamanho tumoral

A avaliação de variáveis clínicas e moleculares associadas ao tamanho dos PitNETs, foi realizada por meio de análise multivariada (Tabela 5). Os dados revelaram que a Doença de Cushing foi associada à presença de microtumores quando comparado a tumores não funcionantes, mesmo após ajustado para fatores de confusão (Coeficiente = -1.828, IC95% = -2.548 a -1.110, P <0.001).

**Tabela 5.** Regressão múltipla dos fatores clínicos em relação ao tamanho tumoral.

Preditor	Coeficiente padronizado	Intervalo de confiança a 95%		T	P
		Limite inferior	Limite superior		
Expressão de genes					
<i>TERT</i>	0.018	-0.181	0.220	0.187	0.852
<i>VDAC2</i>	0.009	-0.200	0.219	0.086	0.932
Fatores clínicos					
Tempo de diagnóstico	0.047	-0.159	0.255	0.459	0.647
Sexo feminino (ref. masculino)	0.343	-0.081	0.768	1.609	0.112
Idade	-0.093	-0.296	0.110	-0.915	0.363
Diagnóstico do tumor (ref. Não funcionante)					
Acromegalia	0.065	-0.474	0.606	0.241	0.810
Doença de Cushing	-1.828	-2.548	-1.110	-5.066	<0.001*
Prolactinoma	-0.050	-1.859	1.758	-0.056	0.955
Gonadotrofinoma	-0.104	-1.931	1.723	-0.114	0.910

Medidas de ajuste do modelo: R<sup>2</sup> = 0,284. RMSE = 0,179. Ref. = categoria de referência (comparação); \*Coeficiente significante (P <0,05); *TERT* – Transcriptase Reversa da Telomerase; *VDAC2* – Canais de Ânions Dependente de Voltagem 2; P- P valor nível de significância.

Modelos de regressão multivariado também foram estimados para analisar os fatores associados a expressão de *VDAC2* e *TERT* (Tabela 6). A Doença de Cushing foi associada ao incremento da expressão de *VDAC2* quando comparado a tumores não funcionantes (Coeficiente = 0.817, IC95% = 0.057 a 1.578, P = 0.035).

**Tabela 6. Modelos de regressão múltipla dos diversos subtipos tumorais, sexo e faixa etária das expressões gênicas de *VDAC2*.**

Preditores do modelo	Modelo 1 (Desfecho <i>VDAC2</i> )				
	Coeficiente padronizado	Intervalo de confiança a 95%		t	P
		Limite inferior	Limite superior		
<b>Diagnóstico</b> (ref. não funcionante)					
Acromegalia	-0.045	-0.667	0.576	-0.145	0.885
Doença de Cushing	0.817	0.057	1.578	2.144	0.035*
Prolactinoma	-0.563	-2.608	1.482	-0.549	0.585
Gonadotrofinoma	-0.300	-2.350	1.750	-0.292	0.771
<b>Sexo</b> (ref. masculino)					
Feminino	-0.234	-0.737	0.270	-0.926	0.358
<b>Faixa etária</b> (ref. 20 a 30 anos)					
31 a 40 anos	-0.375	-1.431	0.682	-0.707	0.482
41 a 50 anos	-0.410	-1.397	0.577	-0.828	0.411
51 a 60 anos	-0.546	-1.492	0.399	-1.152	0.253
61 anos ou mais	-0.672	-1.621	0.276	-1.413	0.162

Medidas de ajuste do modelo 1:  $R^2 = 0,130$ ,  $RMSE=1.79$ . Ref.= categoria de referência (comparação). \* Coeficiente significante ( $P<0,005$ ). *VDAC2* - Canal de Ânion Dependente de Voltagem 2; P- P valor nível de significância.

Modelos de regressão multivariado também foram estimados para analisar os fatores associados a expressão de *TERT* (Tabela 7). As faixas etárias de 31 a 40 anos e de 51 a 60 anos foi identificada a redução na expressão de *TERT* quando comparado a faixa etária mais jovens (20 a 30 anos).

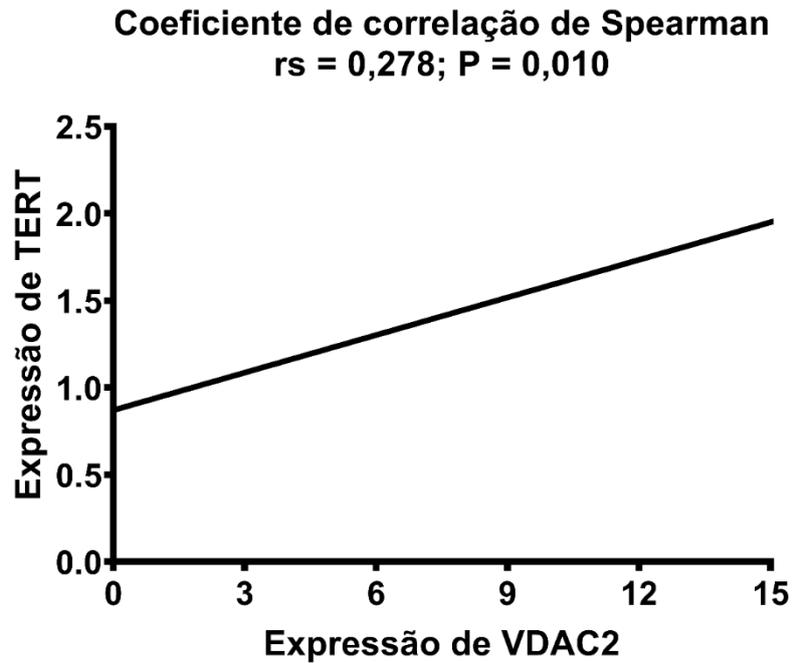
**Tabela 7. Modelos de regressão múltipla dos diversos subtipos tumorais, sexo e faixa etária das expressões gênica de *TERT*.**

Preditores do modelo	Modelo 2 (Desfecho <i>TERT</i> )				t	P
	Coeficiente padronizado	Intervalo de confiança a 95%				
		Limite inferior	Limite superior			
<b>Diagnóstico</b>						
(ref. não funcionante)						
Acromegalia	0.460	-0.124	1.0451	1.5672	0.121	
Doença de Cushing	-0.047	-0.796	0.7001	-0.1273	0.899	
Prolactinoma	-0.468	-2.479	1.5423	-0.4636	0.644	
Gonadotrofinoma	0.597	-1.421	2.6152	0.5891	0.557	
<b>Sexo</b>						
(ref. masculino)						
Feminino	0.022	-0.462	0.5067	0.091	0.928	
<b>Faixa etária</b>						
(ref. 20 a 30 anos)						
31 a 40 anos	-1.219	-2.255	-0.1829	-2.3417	0.022*	
41 a 50 anos	-0.910	-1.874	0.0541	-1.8787	0.064	
51 a 60 anos	-1.300	-2.218	-0.3833	-2.8222	0.006*	
61 anos ou mais	0.774	-1.714	0.1543	-1.6617	0.101	

Medidas de ajuste do modelo 2:  $R^2 = 0,110$ , RMSE = 4,44. Ref.= categoria de referência (comparação). \* Coeficiente significativo ( $P < 0,005$ ). *TERT*- Transcriptase Reversa da Telomerase; P- P valor nível de significância.

### Correlação entre a expressão gênica de *VDAC2* e *TERT*

A avaliação da correlação da expressão dos genes *VDAC2* e *TERT* demonstrou uma correlação positiva (fraca) diretamente proporcional entre a expressão de ambos os genes ( $r_s = 0,278$ ,  $P = 0,010$ ; figura 2).



**Figura 2.** Análise de correlação entre a expressão gênica de *VDAC2* e *TERT* em PitNETs.

## DISCUSSÃO

Os PitNETs são neoplasias relativamente comuns onde aqueles clinicamente relevantes ocorrem em 1/1000 da população e correspondem a cerca de 10 a 15% dos tumores intracranianos. Apesar da maioria dessas neoplasias apresentarem, em geral, comportamento benigno, esforços têm sido feitos para predizer aqueles que podem apresentar um maior nível de agressividade [4]. Apesar de alguns estudos evidenciarem que o desenvolvimento dessas neoplasias seja multifatorial, incluindo alterações genéticas e epigenéticas em genes relacionados à replicação celular e apoptose, a patogênese molecular dos PitNETs é ainda um processo pouco compreendido[5]. Desta forma, o presente estudo, de acordo com os nossos conhecimentos, avaliou pela primeira vez a expressões gênicas de *VDAC2* em amostras de 89 pacientes com diagnóstico de PitNETs. Em adição, também foi investigado nesse grupo de pacientes o papel do gene *TERT* no desenvolvimento de tais tumores.

A observação de maior frequência de pacientes do sexo feminino em nossa amostra, está em concordância com outros estudos [1, 24]. Em um trabalho com pacientes portadores de PitNETs que foram submetidos ao tratamento cirúrgico, observou-se também que 74,8% dos casos eram do sexo feminino, resultado que consolida nossos achados [32]. Em outra pesquisa onde foi realizada a análise de 231 pacientes com diagnóstico de PitNETs, foi observado que 62,78% eram de participantes do sexo feminino[33]. Esses estudos sugerem uma predileção do sexo feminino.

De maneira similar, a média de idade ao diagnóstico verificada em nosso grupo de pacientes ( $51,3 \pm 13,1$  anos) foi similar à descrita para PitNETs na população da Turquia. [1]. Em um outro trabalho observou que os PitNETs ocorrem em todas as faixas etárias, porém, há uma maior incidência entre a terceira e a sexta década de vida o que corrobora com nossa pesquisa [33].

No presente estudo, 71,9% (n=64/89) dos casos foram classificados como NF-PitNETs. Em um trabalho com 70 amostras de PitNETs, 84% das amostras eram correspondentes a PitNETs não funcionantes o que reforça a nossa pesquisa [28]. Em uma outra pesquisa o tipo tumoral mais frequente foi o somatotropinoma [1].

No tocante ao tamanho tumoral, em outros estudos os macrotumores representaram entre 83,3 e 91,9% [1, 24]. A maior presença de macrotumores em nossa amostra (93,3%)

está em concordância com esses trabalhos. De maneira geral, tal característica parece estar associada a um maior grau de invasão [25].

A expressão gênica de *TERT* nesta pesquisa foi associada com a idade. Na faixa etária de 20 a 30 anos, sugere-se que a expressão de *TERT* nos mais jovens esteja relacionado à tumores mais agressivos.

No presente trabalho, não foi observada a presença de mutação nos *hotspot* C228T e C250T do promotor do gene *TERT*, o que pode sinalizar que tal mecanismo parece não ser o principal evento responsável pela regulação da expressão desse gene em PitNETs. Referido achado está em concordância com outros autores que têm demonstrado uma rara frequência dessas alterações em portadores de PitNETs em populações caucasianas e asiáticas [26, 27]. Achados similares também foram observados em tumores de mama, onde também não foram detectadas mutações nessa região genômica [28]. Distintos fenômenos, incluindo epigenéticos, seriam responsáveis pela regulação da expressão de *TERT* e, portanto, tais mecanismos poderiam estar envolvidos na regulação da expressão desse gene em nosso conjunto de amostras [29].

O presente estudo avaliou de forma pioneira a expressão de *VDAC2* em PitNETs e seus subtipos. Nossos resultados mostraram, de forma inédita, uma regulação positiva e crescente desse gene nos tipos: Não funcionantes, Acromegalia e Doença de Cushing, o que pode sugerir um papel desse gene na tumorigênese dessa glândula, assim como postulado previamente em neoplasias tireoidiana e uterina [19, 31].

Em estudo realizado anteriormente, em portadores de neoplasias de endométrio, foi identificada associação entre maiores níveis de expressão de *VDAC2*, progressão da doença e consequente menor sobrevida [31]. Corroborando esses dados, observou-se uma regulação positiva da expressão gênica de *VDAC2* em linhagens celulares de tumores epiteliais da tireoide (4,2 vezes). Esses autores também observaram aumento de expressão de *VDAC2* em diferentes subtipos de carcinomas tireoidianos [19]. Um outro estudo da expressão gênica das isoformas *VDAC* confirmou a que essas isoformas são expressas de forma ubíqua nos tecidos mesmo que tenham especificidades diferentes [34]. Esses achados reforçam a possibilidade de um papel importante dessa proteína na carcinogênese em diferentes tipos de câncer.

Adicionalmente, a verificação de uma correlação entre as expressões de *TERT* e *VDAC2* apontam para uma participação conjunta de ambas as vias de sinalização na

oncogênese dos PitNETs, suscitando a possibilidade de novas terapias, tendo esses genes e seus produtos como potenciais alvos.

## CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos pela presente pesquisa, pode-se preliminarmente concluir:

Nas amostras tumorais obtidas de portadores de PitNETs houve maior expressão de *VDAC2* em comparação ao tecido hipofisário normal, sendo que nos portadores de Doença de Cushing, Acromegalia e tumores NF essa expressão foi mais acentuada.

Em relação à expressão de *TERT*, a mesma não apresentou variação estatística nos diferentes subtipos de PitNETs. Além disso, a ausência de mutação na região promotora de *TERT* sugere que, nos pacientes avaliados, esse não seria o principal mecanismo de regulação da expressão desse gene.

Considerando o tamanho tumoral, não foram observadas associações entre a expressão *VDAC2* e *TERT* e volume do tumor. Por outro lado, a correlação positiva na expressão desses genes pode apontar uma ação sinérgica dos mesmos na oncogênese hipofisária. Assim, mais estudos são necessários para uma maior compreensão desses achados visando o desenvolvimento novos alvos terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

1. Can, N., Celik, M., Bulbul, B. Y., Sut, N., Ozyilmaz, F., Ayturk, S., et al. TERT Expression in Pituitary Adenomas. *Turk Patoloji Derg* 33:103-11. 2017.
2. Asa, S. L., Mete, O., Cusimano, M. D., McCutcheon, I. E., Perry, A., Yamada, S., Nishioka, H., et al., (2021). Pituitary neuroendocrine tumors: A model for neuroendocrine tumor classification. *Patologia Moderna*, 34(9), 1634-1650. <https://doi.org/10.1038/s41379-021-00820-y>
3. Li, J., Wen, S., Li, B., Li, N., Zhan, X. Phosphorylation-Mediated Molecular Pathway Changes in Human Pituitary Neuroendocrine Tumors Identified by Quantitative Phosphoproteomics. *Cells* 2021, 10, 2225. <https://doi.org/10.3390/cells10092225>
4. Yuan, Z., Dewson, G., Czabotar, P. E., Birkinshaw, R. W.; VDAC2 and the BCL-2 family of proteins. *Biochem Soc Trans* 17 December 2021; 49 (6): 2787–2795. doi: <https://doi.org/10.1042/BST20210753>
5. Melmed, S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 May;7(5):257-66. doi: 10.1038/nrendo.2011.40. Epub 2011 Mar 22. Erratum in: *Nat Rev Endocrinol*. 2011 May;7(5): following 266. PMID: 21423242.
6. Gutierrez-Rodrigues, F., Santana-Lemos, B. A., Scheucher, P. S., Alves-Paiva, R. M., Calado, R. T. (2014) Comparação direta de Flow-FISH e qPCR como testes diagnósticos para medição do comprimento dos telômeros em humanos. *PLoS ONE* 9(11): e113747. doi:10.1371/journal.pone.0113747
7. Martins, C. S., Santana-Lemos, B. A., Saggiaro F. P., Neder L., Machado, H. R., Moreira A. C, et al. Telomere length and telomerase expression in pituitary tumors. *J Endocrinol Invest* 38:1243-6. 2015.
8. Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., Wu, J. R. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Sep;85(18):6622-6. Doi: 10.1073/pnas.85.18.6622. PMID: 3413114; PMCID: PMC282029
9. Bell, R. J. A., Rube, T. H., Magalhães, A. X., Costa, B. M., Mancini, A., Song, J. S., and Costello, J. F., Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality *Mol Cancer Res* April 1 2016 (14) (4) 315-323; DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0003
10. Akincilar, S. C, Unal, B., Tergaonkar, V., Reactivation of telomerase in cancer. *Cell Mol Life Sci* 73: 1659– 70. 2016.

11. Cong, Y. S., Wen, J., Bacchetti, S., The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Human Molecular Genetics* 8: 137–142. 1999.
12. DeMasters, B. K., Markham, N., Lillehei, K. O., Shroyer, K. R., Differential telomerase expression in human primary intracranial tumors. *Am J Clin Pathol* 107:548-54.1997.
13. Gaspar, T. B., Sá, A., Lopes, J. M., Simões, M. S., Soares, P., & Vinagre, J. (2018). Telomere Maintenance Mechanisms in Cancer. *Genes*, 9(5), 241. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/genes9050241>
14. Lu, L., Zhang, C., Zhu, G., Irwin, M., Risch, H., Menato, G., et al. Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. *Breast Cancer Res* 13: R56. 2011.
15. Carneiro, B. A., El-Deiry, W. S., Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 17, 395–417 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
16. Shoshan-Barmatz, V., Shteinfer-Kuzmine, A., & Verma, A. (2020). VDAC1 at the Intersection of Cell Metabolism, Apoptosis, and Diseases. *Biomolecules*, 10(11), 1485. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/biom10111485>
17. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. and Adams, J.M. (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 49–63 <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
18. Chin, H. S.; Li, M. X.; Tan, I. K. L. et al. VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development. *Nat Commun* 9, 4976 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07309-4>
19. Mato, E., Barceló-Batllori, S., Orera, I., Selva, L., Corra, M., González, C. et al. The proteomic 2D-DIGE approach reveals the protein voltage-dependent anion channel 2 as a potential therapeutic target in epithelial thyroid tumours, *Molecular and Cellular Endocrinology*, Volume 404, 2015, Pages 37-45, ISSN 0303-7207, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.021>.
20. Chanson, P., Raverot, G., Castinetti, F., Cortet-Rudelli, C., Galland, F., Salenave, S. (2015) Management of clinically non-functioning pituitary adenoma. *Ann Endocrinol (Paris)* 76:239–247. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2015.04.002>
21. Melmed, S., Casanueva, F. F., Hoffman, A. R., Kleinberg, D. L., Montori, V. M., Schlechte, J. A., Wass, J. A. (2011) Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96:273–288. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1692>
22. Nieman, L. K., Biller, B. M., Findling, J. W., Newell-Price, J., Savage, M. O., Stewart, P. M., Montori, V. M. (2008) The diagnosis of Cushing’s syndrome: an endocrine

- society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1526–1540. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0125>
23. Katznelson, L., Laws, E. R., Melmed, S., Molitch, M. E., Murad, M. H., Utz, A., Wass, J. A. (2014) Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 99:3933–3951. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2700>
  24. Garcia-Martinez, A., Sottile, J., Sánchez-Tejada, L., Fajardo, C., Cámara, R., Lamas, C., et al., DNA Methylation of Tumor Suppressor Genes in Pituitary Neuroendocrine Tumors, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *Volume* 104, Edição 4, abril de 2019, páginas 1272–1282, <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01856>
  25. Trouillas, J., Jaffrain-Rea, M-L., Vasiljevic, A., Raverot, G., Roncaroli, F, Villa C. How to Classify Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNET)s in 2020. *Cancers*. 2020; 12(2):514. <https://doi.org/10.3390/cancers12020514>
  26. Boresowicz, J., Kober, P., Rusetska, N., Maksymowicz, M., Goryca, K., Kunicki, J., Bonicki, W., & Bujko, M. (2018). Telomere length and TERT abnormalities in pituitary adenomas. *Neuro endocrinology letters*, 39(1), 49–55.
  27. Miyake, Y., Adachi, Ji., Suzuki, T. et al. *TERT* promoter methylation is significantly associated with TERT upregulation and disease progression in pituitary adenomas. *J Neurooncol* 141, 131–138 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11060-018-03016-8>
  28. Gay-Bellile, M., Véronèse, L., Combes, P., Eymard-Pierre, E., Kwiatkowski, F., Dauplat, M. M, et al. TERT promoter status and gene copy number gains: effect on TERT expression and association with prognosis in breast cancer. *Oncotarget* (2017) 8:77540–51. doi: 10.18632/oncotarget.20560
  29. Dratwa, M., Wysoczańska, B., Łacina, P., Kubik, T., Bogunia-Kubik, K. TERT—Regulation and Roles in Cancer Formation. *Frontiers in Immunology*, volume 11, (2020), <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.589929> ISSN:1664-3224 doi=10.3389/fimmu.2020.589929
  30. Grivicich, I., Regner, A., & Rocha, A. B. da. (2007). Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira De Cancerologia*, 53(3), 335–343. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2007v53n3.1801>
  31. Józwiak, P., Ciesielski, P., Forma, E., Kozal, K., Wójcik-Krowiranda, K., Cwonda, Ł., Bieńkiewicz, A., Bryś, M., & Krześlak, A. (2020). Expression of voltage-dependent anion channels in endometrial cancer and its potential prognostic significance. *Tumor Biology*. <https://doi.org/10.1177/1010428320951057>
  32. Santos, E. A. S., Serra, M. V. F. B. V. F., Filho, W. J. S., Dumont, P. A. S., Peres, A. S., Romero, P. C., Fontoura, E. A. F., Tumores de hipófise considerações sobre 120 casos e revisão de literatura. *Arq. Bras. Neurocir.* 26(4) pág. 151 – 156, 2007

33. Cunha, M. L. V., Cunha, M. L. V., Veríssimo, D. C. A., Rehder, R., Borba, L. A. B., Boguszewski, C. L. Ocorrência de adenomas pituitários correlacionados a idade e sexo em centros de referências para tratamento neurocirúrgico de patologia selar. *Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: Brazilian Neurosurgery* 2014; 33(01): 13-16  
DOI: 10.1055/s-0038-1626193
34. Zinghirino, F., Pappalardo, X. G, Messina, A., Guarino, F., De Pinto, V. Is the Secret of VDAC Isoforms in Their Gene Regulation? Characterization of Human VDAC Genes Expression Profile, Promoter Activity, and Transcriptional Regulators. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(19):7388.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21197388>