



**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 VDAC E DE**  
**MEMBROS DA FAMÍLIA *BCL-2* EM ADENOMAS**  
**PITUITÁRIOS**

**ALEXANDRE NOGUEIRA FACUNDO**

**São Luis**  
**2024**

**ALEXANDRE NOGUEIRA FACUNDO**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *VDAC* E DE  
MEMBROS DA FAMÍLIA *BCL-2* EM ADENOMAS  
PITUITÁRIOS**

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: Prof. Dr. Manuel dos Santos Faria

Co-orientador: Dr. Marcelo Magalhaes Silva

Coordenador: Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade.

São Luís  
2024

Nogueira Facundo, Alexandre.

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VDAC E DE MEMBROS DA FAMÍLIA BCL-2 EM ADENOMAS PITUITÁRIOS / Alexandre Nogueira Facundo. - 2024.

67 p.

Coorientador(a) 1: Marcelo Magalhaes Silva.

Orientador(a): Manuel dos Santos Faria.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2024.

1. Adenoma Pituitário. 2. Apoptose. 3. BAK. 4. BAX. 5. VDAC. I. dos Santos Faria, Manuel. II. Magalhaes Silva, Marcelo. III. Título.

**ALEXANDRE NOGUEIRA FACUNDO**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VDAC E DE  
MEMBROS DA FAMÍLIA BCL-2 EM ADENOMAS  
PITUITÁRIOS**

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: 27 /03 / 2024.

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade (Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Gilvan Cortês Nascimento (Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Rossana Santiago de Sousa Azulay (Suplente)  
Universidade Federal do Maranhão

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família e minha esposa Sarah pelo apoio incondicional, pelo suporte que permitiu minha caminhada até aqui, inclusive nos momentos em que não estive presente.

Ao meu orientador, prof. Manuel Faria, pela participação fundamental em minha formação profissional, por aceitar o desafio da condução desse trabalho e por despertar em mim o interesse pela pesquisa.

Ao meu co-orientador, dr. Marcelo Magalhães, que contribuiu enormemente para a realização deste trabalho e da minha formação como pesquisador.

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

Ao Serviço de Endocrinologia do HUUFMA, local onde tive minha formação profissional e encontrei parceiros fundamentais para a condução deste trabalho.

A todo o time do CEPEC, em especial Wellyandra Santos, pela parceria que permitiu a realização deste trabalho.

Ao serviço de Patologia do HUUFMA, que contribuiu para a avaliação histopatológica e imuno-histoquímica.

Aos colegas radiologistas, Leandro de Assis e Ramon Moura que contribuíram com análise de exames de imagem.

Ao Programa de Pós-Graduação Saúde do Adulto — PPGSAD, pelo mestrado ofertado, e aos professores pelas disciplinas ministradas.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho

## RESUMO

**Introdução:** Os adenomas pituitários (AP) representam a terceira principal causa de neoplasias intracranianas e cursam com elevada morbidade, associada ao seu eventual comportamento agressivo. As proteínas VDAC1, VDAC2, BAK1 e BAX têm papel fundamental na regulação da apoptose e sua expressão tem-se demonstrada aumentada em tumores de esôfago, mama e endométrio, com possível correlação com o prognóstico destas lesões e de sua resposta à terapia quimioterápica. A tumorigênese dos AP não é completamente compreendida e o estudo de componentes fundamentais à apoptose pode contribuir para a melhor compreensão deste processo, em nível biomolecular.

**Objetivo:** avaliar a expressão gênica de *VDAC1*, *VDAC2*, *BAK* e *BAX* e relacioná-las a características clínicas e imagenológicas de AP. **Métodos:**

Foram analisadas 117 amostras tumorais de pacientes submetidos a hipofisectomia no HUUFMA em São Luís-MA. Dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos de prontuários e a invasividade tumoral foi avaliada através da escala de Knosp atualizada. A partir do tecido tumoral, foi realizada extração de RNA total e sua conversão em cDNA por RT-PCR. A expressão gênica foi examinada por qPCR em tempo real. Usou-se tecido de hipófise normal como calibrador, e o *GAPDH* foi utilizado gene de referência. O método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi utilizado para análise da expressão. **Resultados:** A amostra foi composta por 48 homens e 69 mulheres, com média de idade  $48,5 \pm 13,2$  anos. A maioria representava macrotumores (65,8%), sendo o Adenoma Não Funcionante o mais prevalente (62,4%), seguido de Acromegalia (20,5%) e Doença de Cushing (17,1%). Os tumores menos invasivos foram os mais frequentes na amostra (62,4%). Houve uma redução significativa da expressão de *VDAC1* nos grupos Acromegalia e Tumor não funcionante. A expressão de *BAX* apresentou redução significativa nas três apresentações clínicas investigadas. Verificou-se, ainda hiperexpressão de *VDAC2* em tumores com crescimento pós cirurgia.

**Conclusão:** A subexpressão de *VDAC1* e *BAX* nos tumores avaliados neste estudo pode ser um mecanismo de resistência à apoptose dos APs. A hiperexpressão de *VDAC2* em tumores com crescimento pós cirurgia pode sugerir um papel anti apoptótico desse gene nos APs.

**Palavras-chave:** Adenoma Pituitário, *VDAC*, *BAX*, *BAK*, Apoptose

## ABSTRACT

**Introduction:** Pituitary adenomas (PA) represent the third main cause of intracranial neoplasms and present high morbidity, associated with their eventual aggressive behavior. The proteins VDAC1, VDAC2, BAK1 and BAX play a fundamental role in the regulation of apoptosis and their expression has been shown to be increased in esophageal, breast and endometrial tumors, with a possible correlation with the prognosis of these lesions and their response to chemotherapy. PA tumorigenesis is not completely understood and the study of fundamental components of apoptosis can contribute to a better understanding of this process, at a biomolecular level. Objective: to evaluate the gene expression of *VDAC1*, *VDAC2*, *BAK* and *BAX* and relate them to clinical and imaging characteristics of AP. Methods: 117 tumor samples from patients undergoing hypophysectomy at HUUFMA in São Luís-MA were analyzed. Epidemiological and clinical data were obtained from medical records and tumor invasiveness was assessed using the updated Knosp scale. Total RNA was extracted from the tumor tissue and converted into cDNA by RT-PCR. Gene expression was examined by real-time qPCR. Normal pituitary tissue was used as a calibrator, and GAPDH was used as a reference gene. The  $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$  method was used for expression analysis. Results: The sample consisted of 48 men and 69 women, with a mean age of  $48.5 \pm 13.2$  years. The majority represented macrotumors (65.8%), with Non-Functioning Adenoma being the most prevalent (62.4%), followed by Acromegaly (20.5%) and Cushing's Disease (17.1%). Less invasive tumors were the most common in the sample (62.4%). There was a significant reduction in VDAC1 expression in the Acromegaly and Non-functioning tumor groups. BAX expression showed a significant reduction in the three clinical presentations investigated. Overexpression of VDAC2 was also found in tumors that grew after surgery. Conclusion: The underexpression of *VDAC1* and *BAX* in the tumors evaluated in this study may be a mechanism of resistance to AP apoptosis. The overexpression of *VDAC2* in tumors growing after surgery may suggest a anti-apoptotic role of this gene in PAs.

**Keywords:** Pituitary Adenoma, *VDAC*, *BAX*, *BAK*, Apoptosis

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Hormônios hipofisários, peso molecular, glândula- alvo e suas principais ações características.....	15
Quadro 2 - Classificação dos Tumores Hipofisários .....	17
Tabela 1 (Artigo) - Caracterização demográfica e clínica dos pacientes com Adenoma Pituitário.....	39
Tabela 2 (Artigo) - Distribuição das variáveis relacionadas à agressividade e invasividade dos Adenomas Pituitários.....	40
Tabela 3 (Artigo) - Distribuição das características de agressividade e invasividade de acordo com o tipo de adenoma pituitário.....	41
Tabela 4 (Artigo)- Expressão diferencial dos genes <i>VDAC1</i> , <i>VDAC2</i> , <i>BAX</i> e <i>BAK</i> de acordo com o tamanho e invasividade do adenoma pituitário.....	44
Tabela 5 (Artigo) - Comparação da expressão dos genes <i>VDAC1</i> , <i>VDAC2</i> , <i>BAX</i> e <i>BAK</i> entre as categorias da características clínicas e terapêuticas de acordo com o tipo de adenoma pituitário.....	45



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Anatomia da Hipófise .....	14
Figura 2 - Classificação de Knosp modificada, em representação gráfica, imagenológica.....	20
Figura 3 - Vias intrínseca e extrínseca da Apoptose .....	21
Figura 4 - Representação das três isoformas de VDAC.....	24
Figura 1 (Artigo) - Mediana e intervalo interquartilico da expressão gênica diferencial de VDAC1(A), VDAC2(B), BAX(C) e BAK1(D) de acordo com o tipo de adenoma pituitário.....	42
Figura 2 (Artigo) - Matriz mostra os coeficientes de correlação de Spearman entre as quantificações relativas da expressão gênica de VDAC1, VDAC2, BAX, BAK1, idade e tempo de diagnóstico do adenoma pituitário nos grupos acromegalia (A), doença de Cushing (B) e tumores não funcionantes (C).....	43

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP	Adenoma Pituitário
ATP	Adenosina Trifosfato
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
BAK	Antagonista/killer homólogo a BCL-2
BAX	Proteína X associada a BCL2
BCL-2	Linfoma de células B 2
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GH	Hormônio do Crescimento
HUUFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
LH	Hormônio Luteinizante
MEM	Membrana Externa da Mitocôndria
PRL	Prolactina
TSH	Hormônio Estimulante da Tireóide
VDAC	Canal iônico dependente de voltagem

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
1. Glândula Pituitária .....	14
1.1 Anatomia e embriogênese .....	14
1.2 Fisiologia .....	15
1.3 Adenomas Pituitários .....	15
1.3.1 Definição e Classificação .....	15
1.3.2 Abordagem Terapêutica .....	16
1.3.3 Agressividade e Invasividade .....	17
2. Apoptose .....	20
2.1 Membros da família BCL-2 .....	21
2.1.1 BAX ( proteína X associada a BCL2) .....	22
2.1.2 BAK (antagonista/killer homólogo a BCL-2) .....	22
2.2 Canal de Ânion Dependente de Voltagem (VDAC) .....	23
<b>OBJETIVOS</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
<b>ARTIGO</b> .....	33
<b>ANEXO A - NORMAS REVISTA</b> .....	58

## INTRODUÇÃO

Os adenomas pituitários (AP) são os tumores neuroendócrinos mais comuns da hipófise e a terceira principal etiologia de tumores intracranianos, com prevalência estimada em 89,1 casos por 100 mil habitantes(1). Atualmente, os AP são classificados de acordo com o tamanho em micro (<1cm), macroadenomas (≥1cm) ou tumores gigantes (≥4cm); e de acordo com a fenótipo clínico gerado pela secreção hormonal, em: Corticotróficos, Somatotróficos, Gonadotróficos, Tireotróficos, Lactotróficos ou Clinicamente Não funcionantes (2).

Apesar de sua natureza majoritariamente benigna, os AP apresentam elevada morbidade, associada à hipersecreção hormonal e/ou aos sintomas compressivos, que incluem sintomas visuais, cefaleia e hipopituitarismo (3).

Inúmeros sistemas de classificação foram propostos para tentar prever o comportamento clínico dos AP, que podem apresentar características de maior agressividade, como alta capacidade de invasão de estruturas adjacentes (invasividade) , crescimento acentuado e/ou acelerado, tendência a recorrência frequente e falha aos tratamentos convencionais (4,5).

A Classificação de Knosp modificada é a mais amplamente utilizada para quantificar a invasividade dos AP , variando do grau 0 , com ausência de invasão, ao grau 4, com envolvimento completo da artéria carótida intracavernosa (6). Cerca de 35% dos AP são considerados invasivos, e podem ter difícil ressecção cirúrgica, com ou sem curso agressivo(7).

Classicamente, marcadores como Ki-67 e p53 têm sido associados a maior malignidade e agressividade dos AP. Contudo, publicações recentes demonstram que não é reconhecido marcador molecular com papel bem estabelecido na patogênese da agressividade do AP (8,9).

O tratamento dos AP pode incluir ressecção cirúrgica, medicação e/ou radioterapia e deve ser individualizado de acordo com fatores clínicos, como idade e sexo, subtipo tumoral, características de imagem, histológicas e imuno-histoquímicas, além da avaliação de marcadores moleculares (10,11).

O conhecimento crescente do papel da resistência à apoptose na tumorigênese tem levantado interesse na descoberta de novos alvos terapêuticos que atuem como indutores de apoptose e diminuam os mecanismos

de escape desenvolvidos pelas células tumorais (12).

Os canais iônicos dependentes de voltagem (VDAC) são proteínas localizadas nas membrana externa da mitocôndria (MEM) que participam da regulação da apoptose mediada por proteínas pró apoptóticas da família Bcl2, BAX e BAK, e se expressam de maneira mais importante em células tumorais (13). A mitocôndria tem papel fundamental na morte celular, controlada por proteínas por BAX e BAK, que formam poros na MEM e são alvos de muitos agentes quimioterápicos (14).

Existem 3 isoformas de VDAC, estruturalmente semelhantes, encontradas nas células de mamífero, que controlam o fluxo de metabólitos através da MEM, além de participar no controle de vias essenciais para o metabolismo celular como a glicólise e a liberação de espécies reativas de oxigênio (15).

VDAC1 foi identificado em maior número de células, tem maior capacidade de transporte molecular e tem papel essencialmente pró-apoptótico (13). Em diversos tumores, a hiperexpressão de VDAC1 já foi demonstrada, com repercussões importantes no seu curso clínico (7,16).

VDAC2 atua recrutando as proteínas BAK e BAX para a MEM e inibindo a apoptose mediada por BAK, ao formar complexos com sua forma inativa (17). Estudos tem demonstrado que a interação com VDAC2 é essencial para induzir apoptose mediada por BAX, mas pode ser dispensável para a apoptose mediada por BAK.(18,19) A expressão de VDAC2 também se demonstrou aumentada em alguns tumores e seu silenciamento levou à maior sensibilidade à quimioterapia (20).

A isoforma menos abundante é VDAC3, que tem maior expressão em espermatozoides e seu papel na gênese de diversas patologias, incluindo câncer, parece estar relacionado à via de sinalização de Espécies Reativas de Oxigênio (21).

A identificação de marcadores associados à agressividade dos AP permanece um grande desafio da ciência atual. O desenvolvimento de drogas, que tenham como alvo estes possíveis marcadores, surge como alternativa promissora no arsenal terapêutico dos AP, assim como ocorre em outras neoplasias.

Diante deste cenário, e notadamente em tumores agressivos, a análise da

expressão gênica de componentes fundamentais da apoptose, como *VDAC*, *BAX* e *BAK*, pode auxiliar a compreensão da tumorigênese pituitária e ensejar novos alvos terapêuticos para os AP, contribuindo assim, para o tratamento destas patologias.

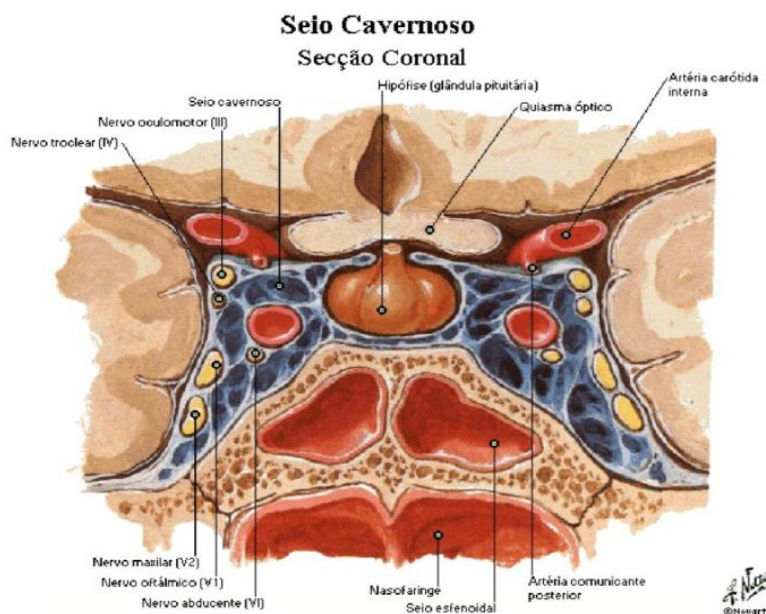
Até a presente data, não evidenciamos estudos que avaliem de maneira específica a relação entre a expressão de *VDACs*, membros da família *BCL-2* e seu impacto clínico em AP.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1. Glândula Pituitária

#### 1.1 Anatomia e embriogênese

A Glândula Pituitária é a principal glândula endócrina do corpo humano, com peso estimado em 500mg e 1,2 cm de tamanho em seu maior diâmetro, está localizada na sela túrcica, na fossa hipofisial do osso esfenóide, e é composta por 2 lobos com origem embrionária distinta: anterior ou adeno-hipófise, e posterior (neuro-hipófise) (22).



**Figura 1.** Anatomia da Hipófise (Netter, 2011)

A adeno-hipófise tem origem epitelial, no ectoderma oral e seu desenvolvimento se inicia na 4ª semana da organogênese fetal e envolve 3 principais etapas: a formação da bolsa de Rathke, evaginação da bolsa de Rathke e proliferação celular e, finalmente, a diferenciação celular, controlada por diversos fatores de transcrição, que por fim gerarão 5 tipos de células endócrinas especializadas, responsáveis pela produção hormonal da glândula: gonadotrofos, corticotrofos, tireotrofos, somatotrofos e lactotrofos. A Neuro-hipófise é formada por prolongamentos axonais de neurônios produtores de Arginina-Vasopressina e Oxitocina, localizados nos núcleos Supraoptico e

Paraventriculares do hipotálamo (23,24).

Em sua topografia, a Hipófise está em contato próximo a importantes estruturas da base do crânio: superiormente, o espaço supresselar contem o quiasma óptico; lateralmente, os seios cavernosos contém as porções intracavernosas da artéria carótida interna; e inferiormente, o assoalho selar é formado pelo osso esenoide e seios esfenoidais(25).

## 1.2 Fisiologia

A secreção de hormônios hipofisários é controlada por neuropeptídeos adeno-hipofisiotróficos produzidos pelo Hipotálamo e conduzidos sistema porta-hipotalâmico à Hipófise anterior, onde se ligam a receptores de superfície desta glândula (26). Participam também deste controle vias de sinalização parácrinas e autócrinas, além do feedback exercido pelas glândulas-alvo, capaz de gerar um complexo e integrado sistema de regulação hormonal em todo o organismo (27).

Os hormônios produzidos na adeno-hipófise e sua ação nas glândulas-alvo estão descritos na Tabela 1.

### Quadro 1. Hormônios hipofisários, peso molecular, glândula- alvo e suas principais ações / características.

	Hormônios hipofisários				
	LH/FSH	TSH	PRL	GH	ACTH
Glândulas – alvo	Ovário, Testículo	Tireoide	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.

### **1.3 Adenomas Pituitários**

#### **1.3.1 Definição e Classificação**

Os AP, atualmente também denominados PitNets, são os tumores mais frequentes da Hipófise e são provavelmente originários da expansão clonal de células secundária a mutações somáticas ou anormalidades cromossômicas e afetam as células neuroendócrinas da Hipófise Anterior (1) .

De acordo com o tamanho, podem ser classificados em micro (<1cm), macroadenomas ( $\geq 1$  cm) ou adenomas gigantes ( $\geq 4$ cm). Estes últimos representam os tumores clinicamente mais relevantes e , geralmente, manifestam-se por sintomas compressivos, como cefaleia, alterações visuais, paralisia de nervos cranianos e até hidrocefalia (11).

Clinicamente, os AP podem ser classificados de acordo com a presença ou não de hipersecreção hormonal e o fenótipo resultante em 6 categorias: Adenomas Somatotróficos (produtores de GH), Corticotróficos (produtor de ACTH), Gonadotróficos (produtores de FSH/LH), Tireotróficos (produtores de TSH), Prolactinomas (produtores de Prolactina). Os adenomas clinicamente Não Funcionantes (NF) são, em maioria, gonadotrofinomas sem expressão clínica, ou ainda, tumores pluri-hormonais silenciosos e mais raramente tumores null-cell, a depender da avaliação imuno-histoquímica (28). Cerca de 1 a 2% dos AP podem, ainda, apresentar mais de uma secreção hormonal (11).

A OMS modificou a classificação dos AP em 2022, incluindo a avaliação de fatores de transcrição, avaliação imuno-histoquímica e o subtipo histológico (29).

## Quadro 2. Classificação dos Tumores Hipofisários (Adaptado de OMS,2022)

Tipo	Subtipo	Fatores de transcrição	Hormônios
<b>Linhagem PIT-1</b>			
Tumor Somatotrópico	Densamente granulado	PIT-1	GH, subunidade $\alpha$
	Esparsamente granulado	PIT-1	GH
Tumor Lactotrópico	Densamente granulado	PIT-1, ER $\alpha$	Prolactina
	Esparsamente granulado	PIT-1, ER $\alpha$	Prolactina
Tumor mamossomatotrófico		PIT-1, ER $\alpha$	GH (predominante), Prolactina, subunidade $\alpha$
Tumor tireotrófico		PIT-1, GATA3	Subunidade $\alpha$ , beta-TSH
Tumor maduro pluri-hormonal da linhagem PIT1		PIT-1, ER $\alpha$ , GATA3	GH (predominante) Outros hormônios da linhagem PIT1
Tumor imaturo da linhagem PIT1		PIT-1, (ER $\alpha$ , GATA3)	Nenhum, ou $\geq 1$ hormônio da linhagem PIT1
Tumor de células tronco acidófilas		PIT-1, ER $\alpha$	Células monomórficas produtoras de PRL (predominante) e GH (variável)
Tumor somatotrófico e lactotrófico		PIT-1, ER $\alpha$	GH, PRL (populações de células morfológicamente distintas)
<b>Linhagem T-PIT</b>			
Tumor corticotrófico	Densamente granulado	T-PIT	ACTH, outros derivados da POMC
	Esparsamente granulado	T-PIT	ACTH, outros derivados da POMC
<b>Linhagem SF-1</b>			
Tumor Gonadotrófico		SF-1, ER $\alpha$ , GATA3	Subunidade $\alpha$ , LH, FSH ou nenhum
<b>Tumores sem linhagem distinta</b>			
Tumor pluri-hormonal		Múltiplas combinações	Múltiplas combinações em uma população monomórfica
Tumor "null-cell"		Nenhum	Nenhum

Legenda: PIT-1: Fator de transcrição pituitário-específico; T-PIT: Fator de transcrição T-box; GH: hormônio do crescimento; TSH: hormônio tireoestimulante; PRL: Prolactina; ER $\alpha$ : Receptor de estrogênio alfa; SF1- Fator esteroidogênico 1; GATA-3: Fator de transcrição GATA tipo-3; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico; POMC: Pró-opiomelanocortina; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio folículo-estimulante

### 1.3.2 Abordagem Terapêutica

Os objetivos do tratamento dos AP são a redução tumoral, com consequente redução dos sintomas compressivos associados, e controle da hipersecreção hormonal e suas consequências clínicas (10,30).

Para a maioria dos tumores, o tratamento de primeira linha, eficaz para ambos os objetivos, é a ressecção cirúrgica trans esfenoidal. Os prolactinomas configuram exceção por apresentarem boa resposta bioquímica e tumoral ao

tratamento medicamentoso com agonistas dopaminérgicos e raramente necessitam de abordagem cirúrgica. (31) A cirurgia transcraniana representa, atualmente, apenas 5% das cirurgias hipofisárias e é indicada em alguns casos com extensão intracraniana importante ou coexistência de doença vascular (32).

Em tumores secretores de GH, além do tratamento cirúrgico, o tratamento medicamentoso com análogos de somatostatina (ex.: octreotida e lanreotida) e cabergolina pode ser realizado de maneira complementar ou em alternativa ao tratamento cirúrgico, quando contra indicado.(33) O Pegvisomant é um antagonista do receptor de GH, sendo indicado como segunda linha da terapia medicamentosa, especialmente indicado para tumores resistentes às medicações de primeira linha (34). O tratamento medicamentoso também é uma opção para o controle bioquímico na doença de Cushing e inclui inibidores da esteroidogênese, antagonistas de receptor glicocorticoide, cabergolina, pasireotida, entre outros (35,36).

A radioterapia (RT) é outra modalidade terapêutica que tem ganhado espaço no tratamento de AP agressivos, com o avanço tecnológico dos últimos anos e a escolha da técnica radioterápica deve levar consideração o tamanho, proximidade a estruturas adjacentes e a infra-estrutura disponível. (37) A radiocirurgia estereotáxica é uma alternativa à RT convencional e permite a administração de altas doses de radiação de maneira mais direcionada e tem demonstrado taxas de controle tumoral acima de 90% em 5 anos (38).

Frequentemente, a RT resulta em destruição de tecido normal da hipófise, levando a hipopituitarismo, além de risco de neuropatia óptica, distúrbios neurológicos secundários e neoplasias (39).

A Temozolomida é um agente quimioterápico que tem demonstrado bons resultados no controle bioquímico e tumoral, com baixa toxicidade e boa tolerabilidade, e ganha espaço terapia complementar de AP agressivos e carcinomas pituitários. (40,41)

### **1.3.3 Agressividade e Invasividade**

Comumente, os AP são considerados tumores benignos, pois, diferentemente dos carcinomas, não apresentam metástase à distância. Contudo, até 10% dos AP podem ter curso clínico agressivo, pela capacidade de crescimento e refratariedade às terapias convencionais (3).

Em 2004, a OMS classificou como agressivos os AP com alto potencial de proliferação, quantificada pela presença de índice Ki-67 >3%, elevado índice mitótico e p53 positivo. (42) Troillas, em 2013, propôs uma classificação clinicopatológica e adicionou o conceito de invasividade, avaliado pela presença de evidencia imagenológica ou histológica de invasão local e graduou os tumores em: 1<sup>a</sup> – não invasivo; 1b- não invasivo e proliferativo; 2<sup>a</sup>- invasivo; 2b invasivo e proliferativo; 3 – metastático. (43) As características clínicas foram incorporadas à avaliação de agressividade dos AP pela classificação de Dai,2016, que define AP refratários pela capacidade de proliferação, recorrência clínica e resistência à terapia, sem presença de metástases. (44)

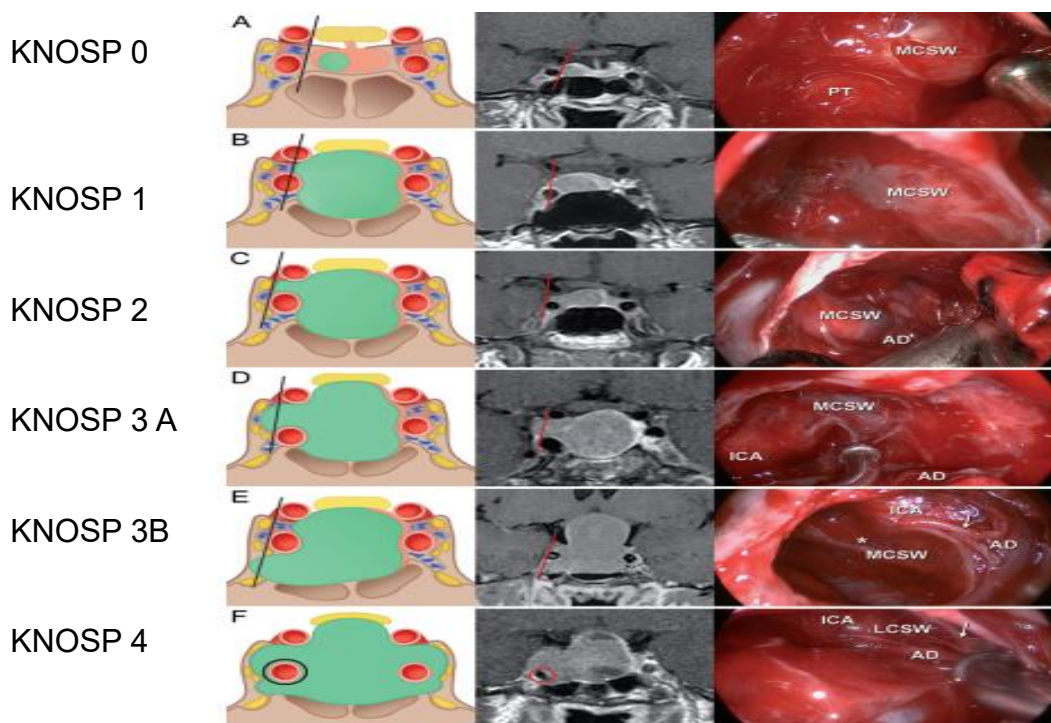
A mais recente classificação da OMS (2022) não apresenta um sistema novo para graduação de agressividade dos AP, mas define subtipos classicamente associados a pior curso clínico, com o Tumor de Células de Crooke, variante agressiva dos adenomas corticotróficos. (29) Já a classificação de 2017 da OMS considera adenomas de alto risco, os tumores com alta capacidade de proliferação e invasividade radiológica. (45)

O conceito de invasividade se refere à presença de invasão a estruturas adjacentes à sela túrcica, como os seios esfenoideais e/ou cavernoso, e se correlaciona à viabilidade de ressecção cirúrgica do tumor, podendo ou não estar relacionado a um comportamento agressivo (5). Os tumores da hipófise que apresentam maior dissociação entre estes conceitos são os AP secretores de ACTH, que, em geral, são microtumores, portanto, pouco invasivos, mas apresentam maior agressividade em seu curso clínico e apresentam elevada taxa de recorrência pós operatória (46,47).

A classificação de Knosp foi criada em 1993 para avaliar o grau de invasão tumoral aos seios cavernosos, utilizando como pontos de referência linhas imaginárias na artéria carótida interna (ACI) visualizadas à ressonância de sela túrcica (48).

A mais recente revisão desta classificação, publicada em 2015, estabelece 5 categorias: grau 0 (sem invasão ao seio cavernoso); grau 1 (tumor não ultrapassa a linha intercarotídea); grau 2 (tumor não ultrapassa linha tangente lateral das ACI); grau 3 (tumor ultrapassa a tangente lateral e invade o compartimento superior (3A) ou o compartimento inferior (3B)); e grau 4 (tumor envolve cicunferencialmente a ACI) (6). A figura 3 representa a Classificação

de Knosp (2015).



**Figura 2.** Classificação de KNOSP modificada, em representação gráfica, imagenológica (corte coronal em Ressonância Magnética). Adaptado de KNOSP, 2015.

## 2. Apoptose

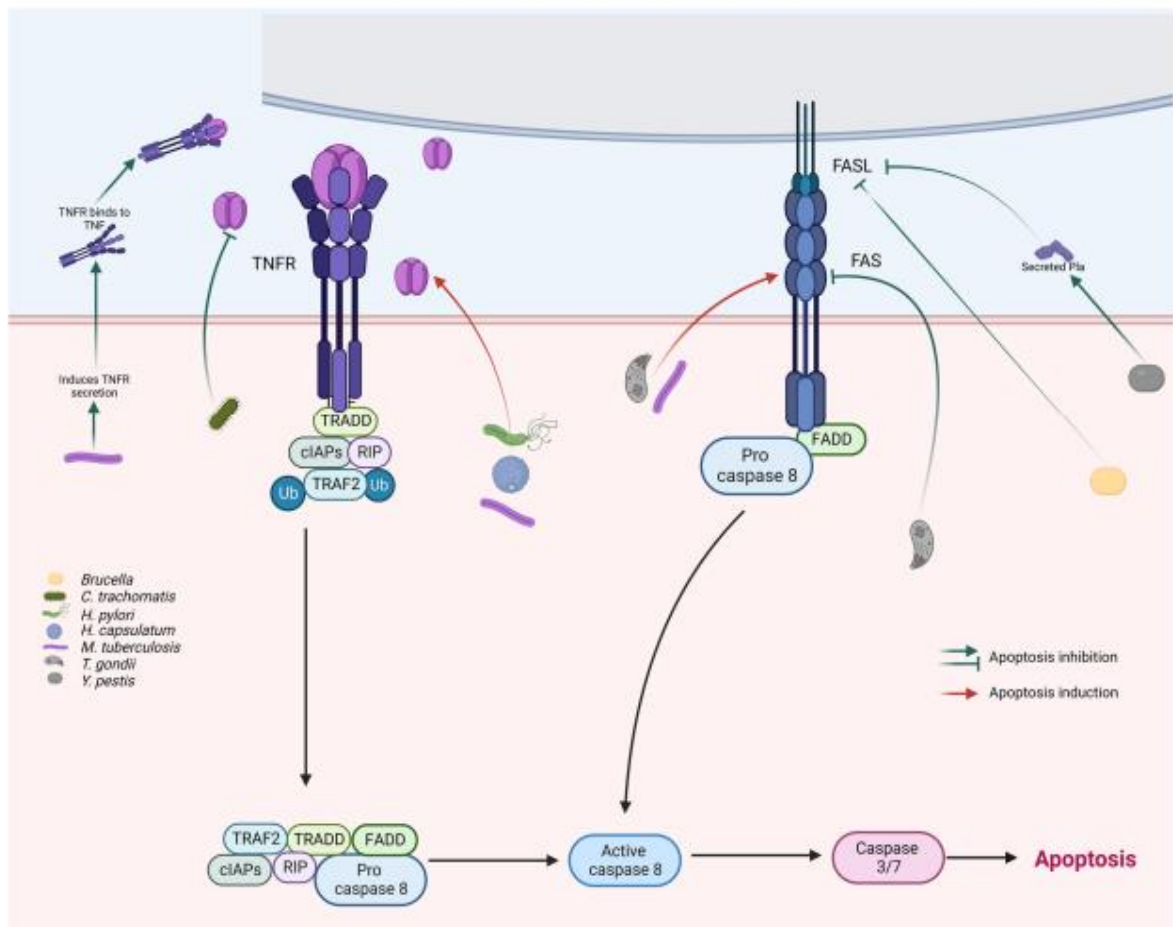
A apoptose é um tipo de morte celular programada, geneticamente controlada, com papel essencial na evolução dos seres vivos, atuando, desde o desenvolvimento embrionário, até a senescência (49,50).

Vários estímulos, intra ou extracelulares podem dar início à apoptose: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos ao DNA, choque térmico, redução de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio etc.

Estes estímulos resultam em uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos que levam à morte celular por 2 principais vias: extrínseca e intrínseca (51–53).

A via extrínseca é iniciada quando algum processo extracelular promove a ativação de receptores de membrana associados aos domínios de morte celular. Estes receptores são codificados por genes da superfamília de receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFR), sendo mais conhecido o Fas/FasL.

Na via intrínseca, a mitocôndria desempenha papel fundamental, uma vez que o estresse oxidativo e danos ao DNA promovem a permeabilização da membrana externa da mitocôndria (MEM) pela ativação das proteínas BAX e BAK, que formam poros na MEM, com consequente liberação de citocromo C e ativação da via de proteínas efetoras e formação do apoptossoma, que, em última análise, promovem a morte celular (54). Este último passo é comum a ambas as vias apoptóticas e consiste na ativação das peptidases aspartato-específicas dependentes de cisteínas (caspases), que podem ser de iniciação – 2,8,9 e 10- e caspases efetoras - 3,6 e 7. (55)



**Figura 3.** Vias intrínseca e extrínseca da Apoptose. (Rodríguez-González, Kobeh, 2023)

## 2.1 Membros da família BCL-2

Como visto anteriormente, a permeabilização da MEM é fundamental para a apoptose mediada pela mitocôndria e as proteínas da família BCL-2 são importantes reguladoras deste processo (56). Existem 20 membros de proteínas

desta família, que apresentam de 1 a 4 domínios de homologia BCL-2 (BH1,2,3 ou 4) e são classificadas em 3 diferentes subgrupos: proteínas iniciadoras (BH3-only), guardiãs (anti-apoptóticas ou pró-sobrevivência) e executoras (proteína X associada a BCL2 – BAX – e antagonista/killer homólogo a BCL-2 – BAK). (57)

Diversos estímulos intra e extracelulares já mencionados promovem a ativação de proteínas BH3-only, que inibem os membros da família BCL-2 anti-apoptóticas e ativam BAX e BAK, as quais se oligomerizam e formam poros que permeabilizam a MEM e desencadeiam a apoptose.(58) Em células tumorais, a hiperexpressão de proteínas BCL-2 pro sobrevivência e a subexpressão de proteínas pro apoptóticas já foi demonstrada e se correlaciona a resistência a resistência a diversos quimioterápicos.(59)

### **2.1.1 BAX ( proteína X associada a BCL2)**

A proteína BAX é homóloga funcionalmente a BAK e diferencia-se desta por sua localização, primariamente no citosol, onde encontra-se como um monômero inativo em solução com estrutura global,  $\alpha$ -helicoidal, com destaque para a hélice  $\alpha 9$  (60). Sob influência de fatores estressores, BAX é ativada pelas proteínas iniciadoras da apoptose (BH3-only) e recrutada para a MEM, onde ancora-se através da hélice  $\alpha 9$ , forma dímeros que resultam na formação dos poros apoptóticos, dando início à cascata de eventos da via intrínseca da apoptose (12,61).

O recrutamento e acúmulo de BAX na MEM da mitocôndria é um ponto-chave para apoptose mediada por BAX, que é, também, dependente de VDAC2 ou BAK para acontecer (18,19)

Estudos demonstraram que várias linhagens celulares tumorais apresentam mutações com aumento da expressão de dímeros de BAX em sua forma inativa no citosol, que impedem seu recrutamento e ativação na MEM, o que resulta na resistência ao tratamento antitumoral indutor apoptose (62) .

### **2.1.2 BAK (antagonista/killer homólogo a BCL-2)**

A proteína BAK está localizada na membrana externa da mitocôndria, ancorada pelo seu domínio transmembrana C-terminal hidrofóbico, e em condições normais, permanece em sua forma inativa ligada à proteína VDAC2. (63)

Assim como outras proteínas da família BCL-2, a estrutura tridimensional de BAK é globular, alfa helicoidal, sendo a hélice  $\alpha 9$  permanentemente exposta e ligada à MEM. (17)

A estrutura e função de BAK e BAX são quase completamente sobrepostas, e a interação de ambas é importante para seu funcionamento, pois o tamanho das estruturas apoptóticas de BAK demonstrou-se aumentado por BAX, cuja cinética de montagem é, por sua vez, acelerada pela presença de BAX (64).

Apesar destas interações, contudo, estudos já demonstraram que a apoptose mediada por BAK não é interrompida em células deficientes em VDAC2 ou BAX, apesar da já demonstrada redução da concentração de BAK na MEM na ausência de VDAC2 (19,65).

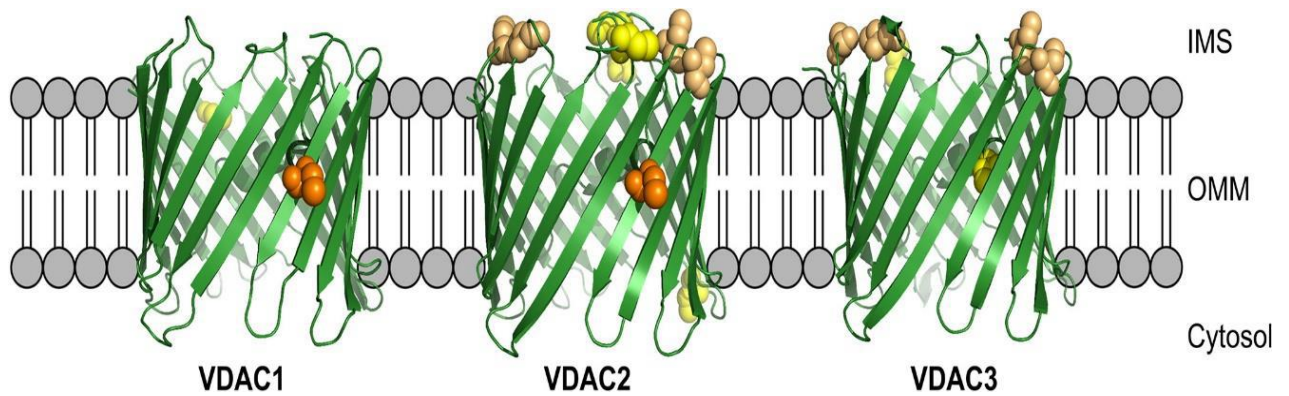
## **2.2 Canal de Ânion Dependente de Voltagem (VDAC)**

As mitocôndrias são organelas fundamentais para o metabolismo energético, presentes nas células eucariontes e, sob controle de proteínas da família BCL-2, são capazes de induzir a apoptose. (66) Este processo ocorre mediante a permeabilização da membrana mitocondrial e depende da formação dos poros de permeabilização de membrana (PTP), compostos por 2 proteínas transportados: VDAC - presente na MEM - e o translocador adenina-nucleotídeo (ANT), presente na membrana interna da mitocôndria. (67)

Os VDACs são as proteínas mais abundantes da MEM e permitem o transporte de eletrólitos e metabolitos, como ATP e NADH (68). A entrada e saída de  $\text{Ca}^{2+}$  da mitocôndria por VDAC é uma importante via de troca intracelular deste íon, bem como de ATP, entre mitocôndria e Reticulo endoplasmático (RE). (69)

Existem 3 isoformas de VDAC identificadas em células de mamíferos: VDAC1, VDAC2 e VDAC3, com aproximadamente 75 % de similaridade estrutural (Figura 5) (70,71)





**Figura 4.** Representação das três isoformas de VDAC. (Maurya&Mahalakshmi, 2016)

VDAC1 é a isoforma mais abundante nas células de mamíferos, sendo encontrada, além da mitocôndria, na membrana plasmática ou RE em diferentes tecidos: neuronal, muscular, miocárdico etc. (72) Dentre suas funções celulares, destacam-se o transporte de  $\text{Ca}^{++}$ , que controla a fosforilação oxidativa e a homeostase mitocondrial; e o transporte de colesterol, ácidos graxos e espécies reativas de Oxigênio, funcionando como sensor de lipídeos e contribuindo para a ação da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (STAR). (73,74)

Na apoptose, estudos já demonstraram o papel de VDAC1 na permeabilização da MEM, ao formar oligômeros com BAK/BAX ou como oligômeros de VDAC1 e sua hiper expressão esteve associada a aumento da apoptose em todas as células, exibindo papel pro apoptótico. (75–77)

Por outro lado, em estudos com células tumorais, VDAC1 parece estar hiperexpresso e tem papel fundamental no metabolismo energético aumentado da célula cancerosa, contribuindo para sua sobrevivência(75). A hiperexpressão de VDAC1 foi associada a maior agressividade e menor sobrevida em vários tumores, como mama, pulmão e carcinoma hepatocelular, sendo este um importante alvo terapêutico para a terapia antitumoral (78,79).

VDAC2, como já citado anteriormente, é essencial para a apoptose mediada por BAX, e atua como “localizador” para a fixação de BAX na MEM, além de controlar a distribuição de BAX e BAK em células sadias (18). Porém, estudos já demonstraram que a apoptose pode ocorrer na ausência das 3 isoformas de VDAC, por outros mecanismos. (65)

A hiperexpressão de VDAC2 foi associada à redução da apoptose mediada por BAK, uma vez que o complexo VDAC2-BAK impede a ativação de

BAK (15,80). Em contrapartida, CHIN et al., (2018) demonstraram que a interação VDAC2-BAX estimula a apoptose mediada do BAX, contribuindo para a resposta a agentes quimioterápicos(19).

VDAC3 é a isoforma menos conhecida e seu papel é menos elucidado (81). Está localizada ao longo de toda a extensão da MEM, enquanto VDAC1 e VDAC2 estão restritas a uma região da MEM. (82) Estudos tem demonstrado a função de transporte de  $Ca^{++}$  e ATP intracelular em VDAC3, e mutações inativadoras de seu gene foram atribuídas à disfunção de espermatozoides (83). Yagoda et al definiram a importância de VDAC3, assim como VDAC2, como possíveis sítios de ligação para o agente quimioterápico Erastina, que induz células tumorais à morte por estresse oxidativo, através da supressão de VDAC3 e VDAC2(21,84).

Há evidência crescente do papel das diferentes isoformas de VDAC na tumorigênese. Estudos sugerem que VDACs podem facilitar o crescimento de células tumorais, ao promover maior adaptação celular à glicólise anaeróbia e facilitar o acesso ao ATP pela interação com hexoquinases (85). Neste sentido, Mato et al. detectaram maior expressão de VDAC2 em tumores de tireoide e seu silenciamento levou a maior resposta à terapia antitumoral com sorafenibe (20). Em tumores de endométrio, a hiperexpressão gênica de todas as isoformas de VDAC também foi associada a menor sobrevida global (16). Somam-se a estes, estudos em tumores clorretais, pulmonares, gástricos e em leucemia, nos quais VDAC1 se mostrou mais expresso, com correlação positiva a pior prognóstico clínico(86–89)

Por outro lado, o tratamento quimioterápico e/ou uso de indutores de apoptose promove a hiperexpressão de VDAC1, demonstrando o seu papel na indução da apoptose, o que faz a modulação do gene promotor de VDAC1 um alvo terapêutico promissor na tumorigênese. (63)

## **OBJETIVOS**

### **2.1- Objetivo geral**

Avaliar a expressão gênica de *VDAC* e membros da família *BCL-2* em adenomas pituitários.

### **2.2- Objetivos Específicos**

Descrever o perfil clínico e de imagem dos pacientes portadores de adenomas hipofisários atendidos no estado do Maranhão;

Caracterizar a expressão dos genes *VDAC-1*, *VDAC-2*, e membros da família *BCL-2* (*BAK* e *BAK*) em adenomas pituitários.

Associar os perfis de expressão gênica das isoformas de *VDAC* e de membros da família *BCL-2* às características clínicas e imagenológicas dos adenomas pituitários;

Avaliar achados da expressão gênica das isoformas de *VDAC*, *BAX* e *BAK* como potenciais preditores do comportamento biológico dos adenomas pituitários.

## REFERÊNCIAS

1. Daly AF, Beckers A. The Epidemiology of Pituitary Adenomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* [Internet]. 2020;49(3):347–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2020.04.002>
2. Inoshita N, Nishioka H. The 2017 WHO classification of pituitary adenoma: Overview and comments. *Brain Tumor Pathol* [Internet]. 2018;35(2):51–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10014-018-0314-3>
3. Ng S, Messerer M, Engelhardt J, Bruneau M, Cornelius JF, Cavallo LM, et al. Aggressive pituitary neuroendocrine tumors: current practices, controversies, and perspectives, on behalf of the EANS skull base section. *Acta Neurochir (Wien)* [Internet]. 2021;163(11):3131–42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00701-021-04953-6>
4. Raverot G, Burman P, McCormack A, Heaney A, Petersenn S, Popovic V, et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for the management of aggressive pituitary tumours and carcinomas. *Eur J Endocrinol*. 2018;178:G1–24.
5. Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV., Cusimano MD, Kovacs K. Aggressive pituitary adenomas—diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2014;10(7):423–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2014.64>
6. Micko ASG, Wöhrer A, Wolfsberger S, Knosp E. Invasion of the cavernous sinus space in pituitary adenomas: Endoscopic verification and its correlation with an MRI-based classification. *J Neurosurg*. 2015;122(4):803–11.
7. Yang Q, Li X. Molecular network basis of invasive pituitary adenoma: A review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(JAN).
8. Raverot G, Ilie MD, Lasolle H, Amodru V, Trouillas J, Castinetti F, et al. Aggressive pituitary tumours and pituitary carcinomas. *Nat Rev Endocrinol*. 2021 Nov;17(11):671–84.
9. Petry C, Poli JHZ, de Azevedo Dossin I, Rech CGSL, Pereira Lima JFS, Ferreira NP, et al. Evaluation of the potential of the Ki67 index to predict tumor evolution in patients with pituitary adenoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12(1):320–6.
10. Mehta GU, Lonser RR. Management of hormone-secreting pituitary adenomas. *Neuro Oncol*. 2017;19(6):762–73.
11. Melmed S. Pituitary-Tumor Endocrinopathies. *N Engl J Med*. 2020;382(10):937–50.
12. Liao C, Zhang Z, Kale J, Andrews DW, Lin J, Li J. Conformational Heterogeneity of Bax Helix 9 Dimer for Apoptotic Pore Formation. *Sci Rep*. 2016;6(May):1–10.
13. Mazure NM. VDAC in cancer. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2017;1858(8):665–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.03.002>
14. Bhola PD, Letai A. Mitochondria – judges and executioners of cell death sentences. *Mol Cell*. 2017;61(5):695–704.
15. Yuan Z, Dewson G, Czabotar PE. VDAC2 and the BCL-2 family of proteins. 2021;0(November):2787–95.
16. Józwiak P, Ciesielski P, Forma E, Kozal K, Wójcik-Krowiranda K, Cwonda Ł, et al. Expression of voltage-dependent anion channels in endometrial cancer

- and its potential prognostic significance. *Tumor Biol.* 2020;42(8):1–12.
17. Flores-Romero H, Ros U, Garcia-Saez AJ. Pore formation in regulated cell death. *EMBO J.* 2020;39(23):1–18.
  18. Ma SB, Nguyen TN, Tan I, Ninnis R, Iyer S, Stroud DA, et al. Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. *Cell Death Differ.* 2014;21(12):1925–35.
  19. Chin HS, Li MX, Tan IKL, Ninnis RL, Reljic B, Scicluna K, et al. VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07309-4>
  20. Mato E, Barceló-Batlloiri 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. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2015;404:37–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.021>
  21. Reina S, Guarino F, Magrì A, De Pinto V. VDAC3 as a potential marker of mitochondrial status is involved in cancer and pathology. *Front Oncol.* 2016;6(DEC):1–11.
  22. Ilahi S, Ilahi TB. Anatomy, Adenohypophysis (Pars Anterior, Anterior Pituitary). In *Treasure Island (FL)*; 2023.
  23. Larkin S, Ansorge O. Development And Microscopic Anatomy Of The Pituitary Gland. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. South Dartmouth (MA); 2000.
  24. Alatzoglou KS, Gregory LC, Dattani MT. Development of the pituitary gland. *Compr Physiol.* 2020;10(2):389–413.
  25. Patel CR, Fernandez-Miranda JC, Wang WH, Wang EW. Skull Base Anatomy. *Otolaryngol Clin North Am* [Internet]. 2016;49(1):9–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otc.2015.09.001>
  26. Melmed S, Kaiser UB, Lopes MB, Bertherat J, Syro L V., Raverot G, et al. Clinical Biology of the Pituitary Adenoma. *Endocr Rev.* 2022;43(6):1003–37.
  27. Amar AP, Weiss MH. Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurg Clin N Am.* 2003;14(1):11–23.
  28. Trouillas J, Jaffrain-Rea ML, Vasiljevic A, Raverot G, Roncaroli F, Villa C C. How to classify the pituitary neuroendocrine tumors (PitNET)s in 2020. *Cancers (Basel).* 2020;12(2):1–17.
  29. Asa SL, Mete O, Perry A, Osamura RY. Overview of the 2022 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol* [Internet]. 2022;33(1):6–26. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-022-09703-7>
  30. Chanson P, Raverot G, Castinetti F, Cortet-Rudelli C, Galland F, Salenave S, et al. Management of clinically non-functioning pituitary adenoma. *Ann Endocrinol (Paris).* 2015;76(3):239–47.
  31. Inder WJ, Jang C. Treatment of Prolactinoma. 2022;1–17.
  32. Mortini P, Albano L, Barzaghi LR, Losa M. Pituitary Surgery. *Press Medica* [Internet]. 2021;50(4):104079. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2021.104079>
  33. Katznelson L, Laws ER, Melmed S, Molitch ME, Murad MH, Utz A, et al. Acromegaly: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(11):3933–51.
  34. Fleseriu M, Langlois F, Lim DST, Varlamov E V., Melmed S. Acromegaly:

- pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. 2022;10(11):804–26. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00244-3](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00244-3)
35. Reincke M, Fleseriu M. Cushing Syndrome: A Review. *Jama*. 2023;330(2):170–81.
  36. Gilis-Januszewska A, Bogusławska A, Rzepka E, Ziaja W, Hubalewska-Dydejczyk A. Individualized medical treatment options in Cushing disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13(December):1–14.
  37. Gupta T, Gupta T, Chatterjee A, Chatterjee A. Modern Radiation Therapy for Pituitary Adenoma: Review of Techniques and Outcomes. *Neurol India*. 2020;68(7):S113–22.
  38. Kotecha R, Sahgal A, Rubens M, De Salles A, Fariselli L, Pollock BE, et al. Stereotactic radiosurgery for non-functioning pituitary adenomas: Meta-analysis and International Stereotactic Radiosurgery Society practice opinion. *Neuro Oncol*. 2020;22(3):318–32.
  39. Lin AL, Donoghue MTA, Wardlaw SL, Yang TJ, Bodei L, Tabar V, et al. Approach to the treatment of a patient with an aggressive pituitary tumor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(12):3807–20.
  40. Gilis-Januszewska A, Wilusz M, Pantofliński J, Turek-Jabrocka R, Sokołowski G, Sowa-Staszczak A, et al. Temozolomide therapy for aggressive pituitary Crooke's cell corticotropinoma causing Cushing's Disease - a case report with literature review. *Endokrynol Pol*. 2018;69(3):306–12.
  41. Lizzul L, Lombardi G, Barbot M, Ceccato F, Gardiman MP, Regazzo D, et al. Long-course temozolomide in aggressive pituitary adenoma: real-life experience in two tertiary care centers and review of the literature. *Pituitary* [Internet]. 2020;23(4):359–66. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11102-020-01040-4>
  42. Figarella-Branger D, Trouillas J. The new WHO classification of human pituitary tumors: comments. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2006;111(1):71–2. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00401-005-1099-0>
  43. Trouillas J, Roy P, Sturm N, Dantony E, Cortet-Rudelli C, Viennet G, et al. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol*. 2013 Jul;126(1):123–35.
  44. Dai C, Feng M, Liu X, Ma S, Sun B, Bao X, et al. Refractory pituitary adenoma: A novel classification for pituitary tumors. *Oncotarget*. 2016;7(50):83657–68.
  45. Lopes MBS. The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary. *Acta Neuropathol*. 2017 Oct;134(4):521–35.
  46. Yamamoto M, Nakao T, Ogawa W, Fukuoka H. Aggressive Cushing's Disease: Molecular Pathology and Its Therapeutic Approach. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12(June):1–14.
  47. Di Ieva A, Davidson JM, Syro LV, Rotondo F, Montoya JF, Horvath E, et al. Crooke's Cell Tumors of the Pituitary. *Neurosurgery* [Internet]. 2015;76(5). Available from: [https://journals.lww.com/neurosurgery/fulltext/2015/05000/crooke\\_s\\_cell\\_tumors\\_of\\_the\\_pituitary.14.aspx](https://journals.lww.com/neurosurgery/fulltext/2015/05000/crooke_s_cell_tumors_of_the_pituitary.14.aspx)
  48. Knosp E, Steiner E, Kitz K, Matula C. Pituitary Adenomas with Invasion of the Cavernous Sinus Space: A Magnetic Resonance Imaging Classification Compared with Surgical Findings. *Neurosurgery* [Internet]. 1993;33(4). Available

from:

[https://journals.lww.com/neurosurgery/fulltext/1993/10000/pituitary\\_adenomas\\_with\\_invasion\\_of\\_the\\_cavernous.8.aspx](https://journals.lww.com/neurosurgery/fulltext/1993/10000/pituitary_adenomas_with_invasion_of_the_cavernous.8.aspx)

49. Morana O, Wood W, Gregory CD. The Apoptosis Paradox in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3).
50. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43(6):582–92.
51. Grivicich I, Regner A, Rocha AB da. Morte Celular por Apoptose. *Rev Bras Cancerol.* 2007;53(3):335–43.
52. Obeng E. Apoptosis (Programmed cell death) and its signals-a review. *Brazilian J Biol.* 2021;81(4):1133–43.
53. Kopeina GS, Zhivotovsky B. Programmed cell death: Past, present and future. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2022;633:55–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.09.022>
54. Rodríguez-González J, Gutiérrez-Kobeh L. Apoptosis and its pathways as targets for intracellular pathogens to persist in cells. *Parasitol Res* [Internet]. 2024;123(1):1–18. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00436-023-08031-x>
55. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis : controlled demolition at the cellular level. 2008;(June 2014).
56. Galluzzi L, Vitale I. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. 2018;486–541.
57. Czabotar PE, Garcia-saez AJ. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis. 2023;24(October):732–48.
58. Galluzzi L, Vanpouille-box C, Bak-dependent BAX. Spotlight BAX and BAK at the Gates of Innate Immunity. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2018;28(5):343–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.010>
59. Kaloni D, Diepstraten ST, Strasser A, Kelly GL. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis.* 2023;28(1–2):20–38.
60. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization. *Cell* [Internet]. 2000 Nov 10;103(4):645–54. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00167-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00167-7)
61. Spitz AZ, Gavathiotis E. Physiological and pharmacological modulation of BAX. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2022 Mar 1;43(3):206–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.11.001>
62. Gitego N, Agianian B, Mak OW, Kumar MV V, Cheng EH, Gavathiotis E. Chemical modulation of cytosolic BAX homodimer potentiates BAX activation and apoptosis. *Nat Commun.* 2023;14(1).
63. Shoshan-Barmatz V, Krelin Y, Shteinfer-Kuzmine A, Arif T. Voltage-dependent anion channel 1 as an emerging drug target for novel anti-cancer therapeutics. *Front Oncol.* 2017;7(JUL).
64. Cosentino K, Hertlein V, Jenner A, Dellmann T, Gojkovic M, Peña-Blanco A, et al. The interplay between BAX and BAK tunes apoptotic pore growth to control mitochondrial-DNA-mediated inflammation. *Mol Cell.* 2022 Mar;82(5):933-949.e9.
65. Shore GC. Apoptosis: It's BAK to VDAC. *EMBO Rep.* 2009;10(12):1311–3.
66. Vringer E, Tait SWG. Mitochondria and cell death-associated inflammation. *Cell Death Differ.* 2023;30(2):304–12.
67. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev*

Genet. 2009;43:95–118.

68. Naghdi S, Hajnóczky G. VDAC2-specific cellular functions and the underlying structure. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Oct;1863(10):2503–14.

69. De Pinto V, Guarino F, Guarnera A, Messina A, Reina S, Tomasello FM, et al. Characterization of human VDAC isoforms: A peculiar function for VDAC3? *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2010;1797(6–7):1268–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.01.031>

70. Flores-Romero H, Dadsena S, García-Sáez AJ. Mitochondrial pores at the crossroad between cell death and inflammatory signaling. *Mol Cell* [Internet]. 2023 Mar 16;83(6):843–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.02.021>

71. Reymann S, Florke H, Heiden M, Jakob C, Stadtmüller U, Steinacker P, et al. Further Evidence for Multitopological Localization of Mammalian Porin (VDAC) in the Plasmalemma Forming Part of a Chloride Channel Complex Affected in Cystic Fibrosis and Encephalomyopathy. *Biochem Mol Med* [Internet]. 1995;54(2):75–87. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1077315085710113>

72. Shoshan-Barmatz V, Shteinifer-Kuzmine A, Verma A. VDAC1 at the intersection of cell metabolism, apoptosis, and diseases. *Biomolecules*. 2020;10(11):1–40.

73. Rone MB, Fan J, Papadopoulos V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: Role of protein–protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2009;1791(7):646–58. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198109000717>

74. Marchi S, Patergnani S, Pinton P. The endoplasmic reticulum–mitochondria connection: One touch, multiple functions. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2014;1837(4):461–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272813001850>

75. Shoshan-Barmatz V, Mizrahi D. VDAC1: from structure to cancer therapy. *Front Oncol* [Internet]. 2012;2. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2012.00164>

76. Shoshan-Barmatz V, Nahon-Crystal E, Shteinifer-Kuzmine A, Gupta R. VDAC1, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease. *Pharmacol Res* [Internet]. 2018;131:87–101. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661818300768>

77. Ghosh T, Pandey N, Maitra A, Brahmachari SK, Pillai B. A Role for Voltage-Dependent Anion Channel Vdac1 in Polyglutamine-Mediated Neuronal Cell Death. *PLoS One* [Internet]. 2007;2(11):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001170>

78. Fang Y, Liu J, Zhang Q, She C, Zheng R, Zhang R, et al. Overexpressed VDAC1 in breast cancer as a novel prognostic biomarker and correlates with immune infiltrates. *World J Surg Oncol*. 2022 Jun;20(1):211.

79. Pittala S, Krelin Y, Shoshan-Barmatz V. Targeting Liver Cancer and Associated Pathologies in Mice with a Mitochondrial VDAC1-Based Peptide. *Neoplasia*. 2018 Jun;20(6):594–609.

80. Cheng EHY, Sheiko T V, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*. 2003 Jul;301(5632):513–7.

81. Reina S, Checchetto V. Voltage-Dependent Anion Selective Channel 3:



Unraveling Structural and Functional Features of the Least Known Porin Isoform. *Front Physiol.* 2022;12(January):1–9.

82. Neumann D, Bückers J, Kastrup L, Hell SW, Jakobs S. Two-color STED microscopy reveals different degrees of colocalization between hexokinase-I and the three human VDAC isoforms. *PMC Biophys.* 2010 Mar;3(1):4.

83. Karachitos A, Kmita H. Voltage-dependent anion channel isoform 3 as a potential male contraceptive drug target. *Future Med Chem* [Internet]. 2019;11(8):857—867. Available from: <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0328>

84. Yagoda N, Rechenberg M Von, Zaganjor E, Bauer AJ, Yang S, Fridman DJ, et al. NIH Public Access. 2011;447(7146):864–8.

85. Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V. In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J.* 2004 Jan;377(Pt 2):347–55.

86. Brahim-Horn MC, Ben-Hail D, Ilie M, Gounon P, Rouleau M, Hofman V, et al. Expression of a truncated active form of VDAC1 in lung cancer associates with hypoxic cell survival and correlates with progression to chemotherapy resistance. *Cancer Res.* 2012 Apr;72(8):2140–50.

87. Pernemalm M, De Petris L, Branca RM, Forshed J, Kanter L, Soria J-C, et al. Quantitative proteomics profiling of primary lung adenocarcinoma tumors reveals functional perturbations in tumor metabolism. *J Proteome Res.* 2013 Sep;12(9):3934–43.

88. Alfonso P, Cañamero M, Fernández-Carbonié F, Núñez A, Casal JI. Proteome analysis of membrane fractions in colorectal carcinomas by using 2D-DIGE saturation labeling. *J Proteome Res.* 2008 Oct;7(10):4247–55.

89. Gao W, Xua J, Wang F, Zhang L, Peng R, Zhu Y, et al. Mitochondrial Proteomics Approach Reveals Voltage-Dependent Anion Channel 1 (VDAC1) as a Potential Biomarker of Gastric Cancer. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2015;37(6):2339–54.

## ARTIGO

### Expressão gênica de *VDACs* e de membros da Família *Bcl-2* em Adenomas Pituitários

Alexandre Nogueira Facundo<sup>3</sup>, Marcelo Magalhaes Silva<sup>1,3</sup>, Manuel dos Santos Faria<sup>2,3</sup>

Afiliação:

Centro de Pesquisa Clínica, Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (CEPEC-HUUFMA), São Luís, MA, Brasil.

Serviço de Endocrinologia, Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA), São Luís, MA, Brasil.

Grupo de Pesquisa em Endocrinologia e Metabologia Clínica e Molecular (ENDOCLIM), São Luís, MA, Brasil.

**Autor Correspondente:** Manuel dos Santos Faria, Dr., Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA), São Luís, MA, Brasil.

**E-mail:** [mfaria1949@gmail.com](mailto:mfaria1949@gmail.com)

## RESUMO

**Introdução:** Os adenomas pituitários são tumores benignos com prevalência elevada e curso clínico eventualmente agressivo, contudo, a tumorigênese destas lesões ainda não é completamente compreendida em nível biomolecular. As proteínas BAK1 e BAX têm papel fundamental na apoptose e interagem com as proteínas VDACs, cujas expressões têm se mostrado aumentadas em tumores malignos, com impacto no seu prognóstico. **Objetivo:** avaliar a expressão gênica de *VDAC1*, *VDAC2*, *BAK1* e *BAX* e sua associação a características clínicas e imagiológicas de Adenomas Pituitários. **Métodos:** Foram analisadas 117 amostras tumorais. Dados epidemiológicos e clínicos foram coletados e a invasividade foi avaliada pela escala de Knosp. A expressão gênica foi examinada por rtPCR. O método  $2^{-(DDCt)}$  foi utilizado para análise da expressão relativa. **Resultados:** A amostra foi composta por 48 homens e 69 mulheres, classificados como Adenoma Não Funcionante (NF), Acromegalia e Doença de Cushing. Comparando-se ao tecido normal, houve uma redução significativa da expressão de *VDAC1* nos grupos Acromegalia e NF. A expressão de *BAX* foi menor nos três grupos. Não houve diferença na expressão de *VDAC2* e *BAK1* em relação à pituitária normal, contudo *VDAC2* foi hiperexpresso em tumores com recrescimento. Foi verificada, ainda, correlação fortemente negativa na expressão *BAX* e *BAK1*, nos tumores corticotróficos. **Conclusão:** A subexpressão de *VDAC1* e *BAX* pode estar relacionada à resistência à apoptose

dos APs; já a hiperexpressão de *VDAC2* em tumores com recrescimento pode sugerir um papel antiapoptótico desse gene. Mais estudos precisam ser conduzidos para melhor compreensão do papel desses genes na tumorigênese pituitária.

**Palavras-chave:** Adenoma Pituitário, *VDAC*, *BAX*, *BAK*, Apoptose.

### ABSTRACT

**Introduction:** Pituitary adenomas are benign tumors with a high prevalence and an occasionally aggressive clinical course, however, the tumorigenesis of these lesions is not yet completely understood at the biomolecular level. The *BAK1* and *BAX* proteins play a fundamental role in apoptosis and interact with the *VDACs* proteins, whose expressions have been shown to be increased in malignant tumors, with an impact on their prognosis. **Objective:** to evaluate the gene expression of *VDAC1*, *VDAC2*, *BAK1* and *BAX* and their association with clinical and imaging characteristics of Pituitary Adenomas. **Methods:** 117 tumor samples were analyzed. Epidemiological and clinical data were collected and invasiveness was assessed using the Knosp scale. Gene expression was examined by rtPCR. The  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method was used for relative expression analysis. **Results:** The sample consisted of 48 men and 69 women, classified as Non-Functioning Adenoma (NF), Acromegaly and Cushing's Disease. Comparing to normal tissue, there was a significant reduction in *VDAC1* expression in the Acromegaly and NF groups. *BAX* expression was lower in the three groups. There was no difference in the expression of *VDAC2* and *BAK1* in relation to normal pituitary glands, however *VDAC2* was overexpressed in tumors with regrowth. A strongly negative correlation was also observed in *BAX* and *BAK1* expression in corticotrophic tumors. **Conclusion:** Underexpression of *VDAC1* and *BAX* may be related to resistance to apoptosis of APs; The overexpression of *VDAC2* in regrowing tumors may suggest an antiapoptotic role of this gene. More studies need to be conducted to better understand the role of these genes in pituitary tumorigenesis

**Keywords:** Pituitary Adenoma, *VDAC*, *BAX*, *BAK*, Apoptosis.

## **Introdução:**

Os adenomas pituitários (AP) constituem um grupo heterogêneo de lesões com curso clínico majoritariamente benigno e prevalência global estimada em 89,1/100.000 (1). Apesar de apenas 0,2% destes tumores apresentarem potencial de metástase (2), um percentual considerável deles possui características de agressividade, que podem ser definidas pela presença de invasividade local, resistência ao tratamento clínico-cirúrgico, e alto potencial de crescimento (3–5).

Vários sistemas de classificação de agressividade dos APs foram propostos nos últimos 20 anos (5–7), sem consenso em relação ao papel de marcadores moleculares na tumorigênese pituitária, como o índice Ki-67 ou a expressão de p53, abandonados pela mais recente classificação da OMS, 2022, que define subtipos mais agressivos destas lesões com base nos achados histopatológicos e de fatores de transcrição (8–10). Portanto, até o momento, não há marcador bioquímico capaz de prever, confiavelmente, o comportamento clínico dos APs.

Neste cenário, despontam componentes-chave do processo de morte celular programada, cuja compreensão é fundamental no âmbito da tumorigênese. As proteínas BAX (BCL-2-associated X protein) e BAK (BCL-2 antagonist killer 1) são consideradas efetoras essenciais da apoptose, ao formar poros que permeabilizam a membrana externa da mitocôndria (MEM) e sua inibição foi identificada em cânceres de mama, pulmão e neoplasias hematológicas (11,12)

A proteína VDAC (canal iônico dependente de voltagem) compõe cerca de 10% da MEM e interage com proteínas pro apoptóticas da família BCL-2, formando poros na MEM que permitem a liberação de citocromo C e levam à apoptose (13). Existem 3 diferentes isoformas de VDAC nas células de mamíferos. VDAC1 foi identificada em maior número de células, tem maior capacidade de transporte molecular e tem papel essencialmente pró-apoptótico(13).

Em diversos tumores, a hiperexpressão de *VDAC1* já foi demonstrada, com repercussões importantes no seu curso clínico. JÓŹWIAK, P. et al verificaram maior expressão de *VDAC1* em células tumorais de endométrio, em comparação ao tecido normal (14). Já em tumores de esôfago mama, cólon e

próstata, a redução da expressão de *VDAC1* foi associada a menor proliferação celular e melhor resposta terapêutica (15). Em tumores benignos e, particularmente, em APs, dados da expressão de *VDAC1* são escassos.

*VDAC2* atua recrutando as proteínas BAK e BAX para a MEM e inibindo a apoptose mediada por BAK, ao formar complexos com sua forma inativa, possuindo, portanto, papel anti-apoptótico (16). Estudos tem demonstrado que a interação com *VDAC2* é essencial para induzir apoptose mediada por BAX, mas pode ser dispensável para a apoptose mediada por BAK1. Em tumores de tireoide, o aumento da expressão de *VDAC2* foi encontrado em todos subtipos histológicos e seu silenciamento levou à maior sensibilidade à quimioterapia (17).

A inibição da apoptose já foi associada à agressividade em outros tumores previamente e pode, razoavelmente, estar associada à agressividade dos APs (18). O papel de *VDACs* e sua possível interação com proteínas da família BCL-2 na gênese e progressão nesses tumores não foi estudado até o momento, permanecendo, ainda, um desafio a identificação de marcadores clínicos confiáveis para os APs. Adicionalmente, a maior compreensão dos papéis desses marcadores pode contribuir para possíveis novos alvos terapêuticos para os APs.

## **Metodologia**

### **2.1 Participantes e amostras**

As amostras tumorais avaliadas neste estudo foram obtidas de casos acompanhados no ambulatório de neuroendocrinologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – HUUFMA, São Luís, Maranhão, Brasil.

Foram incluídos pacientes com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos, que apresentaram diagnóstico de AP e foram submetidos à hipofisectomia pela equipe de Neurocirurgia do HUUFMA, com ampla experiência em cirurgia pituitária. Não foram incluídos pacientes menores de 18 anos ou que a análise histopatológica tenha sido incompatível com AP.

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, com CAAE nº 95176418.5.0000.5086.

## 2.2 Avaliação Clínica

O diagnóstico de AP foi estabelecido com base em um quadro clínico correspondente e exame de ressonância magnética da hipófise compatível com o diagnóstico, avaliação histopatológica, além de um painel hormonal avaliado por meio de imuno-histoquímica.

Os tumores foram classificados conforme o tipo clínico conforme as diretrizes mais recentes publicadas, sendo incluídos no estudo 3 grupos: adenomas não funcionantes (NF), corticotropinoma (doença de Cushing) e somatotrofinoma (Acromegalia) (19–21). Não foram incluídos pacientes portadores de gonadotrofinomas, tireotrofinomas e prolactinomas pela ausência de dados suficientes e análise histopatológica confirmada nesses grupos em nossa amostra.

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.

## 2.3 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 nucléicos 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 .

## 2.4 Análise da expressão gênica de *VDAC*

A avaliação da expressão gênica de *BAX*, *BAK1*, *VDAC1* e *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 os genes estudados 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; ativação da polimerase a 95°C por 2 minutos; desnaturação 95°C por 1 segundo; e extensão a 60°C por 20 segundos em 40 ciclos (17). A avaliação da expressão de *VDACs*, *BAX* e *BAK1* 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 calculada pelo método 2-DDCt utilizando tecido hipofisário normal como calibrador.

## 2.5 Análise estatística

Os dados foram processados utilizando os recursos dos softwares SPSS versão 27.0 (IBM, Chicago, IL, EUA) e GraphPad Prism versão 9.5.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A estatística descritiva incluiu medidas de frequência, média, mediana, desvio-padrão ( $\pm dp$ ) e intervalo interquartilico (IIQ). Os dados de quantificação relativa (RQ) das expressões gênicas de *VDAC1*, *VDAC2*, *BAX* e *BAK* foram estimadas em relação ao valor controle (RQ = 1).

Os testes Qui-quadrado ou exato de Fisher foram aplicados para comparar a distribuição de frequências dos dados clínicos e terapêuticos entre os grupos de diagnóstico do adenoma pituitário (acromegalia, doença de Cushing e tumor não funcionante). A normalidade da distribuição das variáveis de expressões gênicas foram avaliadas através do teste Shapiro–Wilk. Devido a verificação de distribuição não normal, teste não paramétricos foram selecionados. O teste Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test) para amostra isolada foi utilizado para comparar o RQ da categoria investigada como RQ controle. O teste Mann–Whitney foi utilizado para a análise comparativa da expressão gênica entre as categorias das variáveis clínicas e terapêuticas em cada grupo diagnóstico. Além disso, o coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) foi calculado para estimar a força de correlação entre as expressões gênicas e cada grupo de diagnóstico do adenoma pituitário.

Para todas as análises o nível de significância adotado foi de 5% ( $P < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Caracterização demográfica e clínica da amostra

Um total de 117 pacientes (48 homens e 69 mulheres) com média de idade de 48,5 ( $\pm 13,2$  anos) foram incluídos no presente estudo. O tempo médio de diagnóstico foi de  $2,5 \pm 1,9$  anos.

A apresentação clínica mais frequente foi Adenoma NF (73/117 - 62,4%), seguida por Acromegalia (24/117 - 20,5%) e Doença de Cushing (20/117 - 17,1%). A maioria apresentava, ao diagnóstico, macrotumores (77/117 - 65,8%) e quase um terço (34/117 - 29,1%), tumores gigantes (**Tabela 1**).

**TABELA 1. Caracterização demográfica e clínica dos pacientes com Adenoma Pituitário.**

Variáveis	média	$\pm dp$	N	(%)
Sexo				
Masculino			48	(41,0)
Feminino			69	(59,0)
Idade (em anos)	48,5	$\pm 13,2$		
Faixa etária				
$\leq 30$ anos			9	(7,7)
31 a 40 anos			27	(23,1)
41 a 50 anos			30	(25,6)
51 a 60 anos			27	(23,1)
61 anos ou mais			24	(20,5)
Apresentação clínica do AP				
Acromegalia			24	(20,5)
Doença de Cushing			20	(17,1)
Não funcionante			73	(62,4)
Tamanho do tumor				
Micro			6	(5,1)
Macro			77	(65,8)
Gigante			34	(29,1)

$\pm dp$  = desvio-padrão. AP = adenoma pituitário.

Sobre os dados que caracterizam agressividade dos APs, 5,1% dos pacientes realizaram radioterapia e 21,4% da amostra havia sido submetida a mais de um procedimento cirúrgico (**Tabela 2**).

Dentre os pacientes com Acromegalia e Doença de Cushing, 56,8% realizava uso de medicação para tratamento do AP e 45,5% obtiveram controle bioquímico da doença.

Além disso, observou-se que 42,7% dos pacientes apresentaram algum aumento tumoral após a cirurgia. Os tumores mais invasivos (categorias 3 e 4 de Knosp) representaram 37,6% da amostra.



**TABELA 2. Distribuição das variáveis relacionadas à agressividade e invasividade dos adenomas pituitários.**

Variáveis	n	(%)
Número de cirurgias realizadas		
1	92	(78,6)
2	19	(16,2)
3	5	(4,3)
4	1	(0,9)
Realizou radioterapia		
Sim	6	(5,1)
Não	111	(94,9)
Uso de medicamento para AP <sup>1</sup>		
Sim	25	(56,8)
Não	19	(43,2)
Controle Bioquímico <sup>1</sup>		
Sim	20	(45,5)
Não	24	(54,5)
Aumento do tumor após cirurgia		
Sem aumento	67	(57,3)
<10%	12	(10,3)
11 a 30%	10	(8,5)
31 a 50%	5	(4,3)
>50%	11	(9,4)
Sem informação	12	(10,3)
Classificação Knosp		
0-2 (menos invasivo)	73	(62,4)
3-4 (mais invasivo)	44	(37,6)

AP = adenoma pituitário. <sup>1</sup>Frequência calculada na amostra total de pacientes com Acromegalia e Doença de Cushing.

### **3.2. Distribuição das características clínicas e terapêutico por grupo diagnóstico**

A **Tabela 3** apresenta a análise comparativa das variáveis clínicas e terapêuticas entre os grupos clínicos do adenoma pituitário. Houve diferenças estatisticamente significantes na distribuição entre os grupos para as variáveis tamanho do tumor ( $P < 0,001$ ) e uso de medicação ( $P = 0,007$ ).

Destaca-se que a frequência de 1/4 de micro tumores no grupo doença de Cushing, enquanto no grupo de tumores não funcionantes, observou-se a presença apenas de macro tumores (61,6%) e tumores gigantes (38,4%). Além disso, o controle medicamentoso foi mais frequente no grupo acromegalia do que na doença de Cushing (75% versus 35%).

**TABELA 3. Distribuição das características de agressividade e invasividade de acordo com o tipo de adenoma pituitário.**

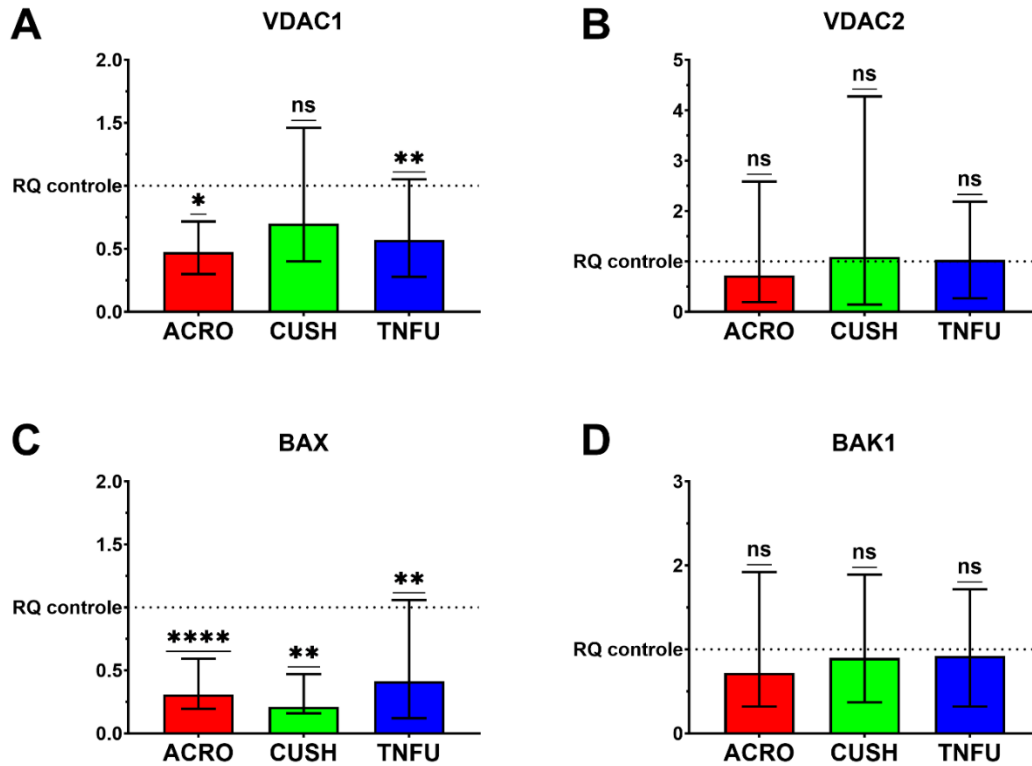
Fatores clínicos e terapêuticos	Grupo ACRO		Grupo CUSH		Grupo TNFU		P
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Tamanho do tumor							<b>&lt;0,001*</b>
Micro	1	(4,2)	5	(25,0)	0	(0)	
Macro	18	(75,0)	14	(70,0)	45	(61,6)	
Gigante	5	(20,8)	1	(5,0)	28	(38,4)	
Número de cirurgias							0,768
Uma	19	(79,2)	17	(85,0)	56	(76,7)	
Duas ou mais	5	(20,8)	3	(15,0)	17	(23,3)	
Realizou radioterapia							0,416
Sim	1	(4,2)	2	(10,0)	3	(4,1)	
Não	23	(95,8)	18	(90,0)	70	(95,9)	
Uso de medicação							<b>0,007*</b>
Sim	18	(75,0)	7	(35,0)	-	-	
Não	6	(25,0)	13	(65,0)	-	-	
Controle Bioquímico							0,245
Sim	9	(37,5)	11	(55,0)	-	-	
Não	15	(62,5)	9	(45,0)	-	-	
Crescimento pós cirurgia							0,519
Não	17	(73,9)	12	(60,0)	38	(61,3)	
Sim	6	(26,1)	8	(40,0)	24	(38,7)	
Classificação Knosp							0,092
0-2	18	(75,0)	15	(75,0)	40	(54,8)	
3-4	6	(25,0)	5	(25,0)	33	(45,2)	

ACRO = acromegalia. CUSH = doença de Cushing. TNFU = tumor não funcionante. \*P <0,05 através do teste qui-quadrado ou exato de Fisher.

### 3.3. Expressão dos genes *VDAC1*, *VDAC2*, *BAX*, *BAK1* de acordo com apresentação clínica do adenoma pituitário

A **Figura 1** apresentam a análise a expressão diferencial dos genes investigados de acordo com a apresentação clínica do AP. Os resultados mostraram que houve uma redução significativa da expressão de *VDAC1* no grupo Acromegalia (RQ mediana = 0,47; P = 0,029) e Tumor não funcionante (RQ mediana = 0,57; P = 0,002). A expressão de *BAX* apresentou redução significativa nas três apresentações clínicas investigadas: Acromegalia (RQ mediana = 0,31; P <0,001), Doença de Cushing (RQ mediana = 0,21; P = 0,007) e Tumor não funcionante (RQ mediana = 0,41; P = 0,005).

As expressões dos genes *VDAC2* e *BAK1* não apresentaram diferenças significantes em relação ao controle em nenhuma apresentação clínica dos AP avaliadas (P>0,05).



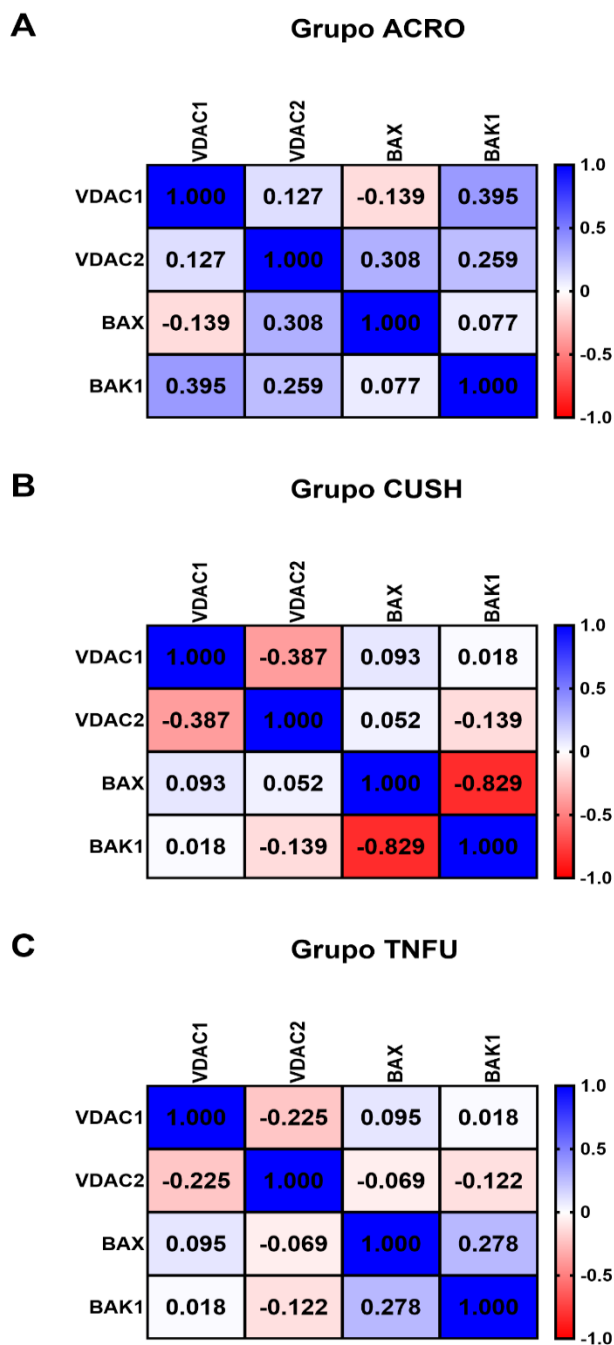
**FIGURA 1.** Mediana e intervalo interquartilico da expressão gênica diferencial de *VDAC1* (A), *VDAC2* (B), *BAX* (C) e *BAK1* (D) de acordo com o tipo de adenoma pituitário. ACRO = acromegalia. CUSH = doença de Cushing. TNFU = tumor não funcionante. Teste Wilcoxon para uma amostra: ns = não significativa, \*P <0,05, \*\*P <0,01, \*\*\*P <0,001, \*\*\*\* P <0,0001.

### 3.4. Correlação entre expressões dos genes *VDAC1*, *VDAC2*, *BAX*, *BAK1* por grupo

No grupo acromegalia não foram observadas correlações significantes entres as expressões gênicas.

No grupo Doença de Cushing, observou-se uma correlação forte inversamente proporcional entre as expressões de *BAX* e *BAK1* ( $r_s = -0,829$ ;  $P = 0,005$ ).

Já no grupo de Tumores NF, foi identificada uma correlação direta fraca entre *BAX* e *BAK1* ( $r_s = 0,278$ ;  $P = 0,048$ ) (Figura 2).



**FIGURA 2.** Matriz mostra os coeficientes de correlação de Spearman entre as quantificações relativas da expressão gênica de *VDAC1*, *VDAC2*, *BAX*, *BAK1*, idade e tempo de diagnóstico do adenoma pituitário nos grupos acromegalia (A), doença de Cushing (B) e tumores não funcionantes (C). ACRO = acromegalia. CUSH = doença de Cushing. TNFU = tumor não funcionante.

### 3.5. Expressão diferencial dos genes *VDAC1*, *VDAC2*, *BAX*, *BAK1* de acordo com o comportamento clínico do tumor

A **Tabela 4** apresenta a análise da diferença da expressão gênica em relação ao controle de acordo com o tamanho tumoral e o grau de invasividade avaliado pela escala de Knosp modificada. Observou-se uma redução significativa da expressão de *VDAC1* (RQ mediana = 0,49; P <0,001) e *BAX* (RQ mediana = 0,43; P <0,001) em macro tumores. Sub-expressão de *BAX* também foi observada nos tumores gigantes (RQ mediana = 0,18; P <0,014).

Por outro lado, foi observada um aumento significativo da expressão de *VDAC2* entre os pacientes que apresentaram aumento tumoral pós-cirúrgico (RQ mediana = 1,46; P = 0,042). Além disso, notou-se sub-expressão de *BAX* independente o grau de agressividade da classificação Knosp.

É importante destacar que a expressão de *BAK1* não apresentou relação com nenhum parâmetro de manifestação clínico ou comportamento biológico de AP incluído neste estudo.

**TABELA 4. Expressão diferencial dos genes *VDAC1*, *VDAC2*, *BAX* e *BAK1* de acordo com o tamanho e invasividade do adenoma pituitário.**

Fatores clínicos e terapêuticos	<i>VDAC1</i>		<i>VDAC2</i>		<i>BAX</i>		<i>BAK1</i>	
	RQ Med	P valor	RQ Med	P valor	RQ Med	P valor	RQ Med	P valor
Tamanho do tumor								
Micro	1,60	0,437	1,51	0,437	0,32	0,625	0,80	0,875
Macro	<b>0,49</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,03	0,149	<b>0,43</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,03	0,257
Gigante	0,74	0,467	0,73	0,835	<b>0,18</b>	<b>0,014</b>	0,53	0,465
Crescimento pós-cirurgia								
Sim	0,58	0,097	<b>1,46</b>	<b>0,042</b>	0,34	0,054	0,64	0,724
Não	<b>0,57</b>	<b>0,001</b>	0,69	0,855	<b>0,32</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,92	0,561
Classificação Knosp								
0-2	<b>0,57</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,82	0,628	<b>0,32</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,89	0,713
3-4	0,59	0,343	1,39	0,066	<b>0,36</b>	<b>0,005</b>	0,83	0,707

RQ = quantificação relativa comparada ao controle (RQ = 1). **Negrito** indica diferenças estatisticamente comparado ao controle (RQ = 1). P valor calculado através do teste Wilcoxon para amostra isolada.

### 3.6. Comparação das expressões gênicas entre as categorias dos dados clínicos e terapêutico em cada grupo diagnóstico

A **Tabela 5** expressa a análise comparativa da expressão gênica entre as variáveis clínicas/terapêuticas em cada grupo diagnóstico. Não houve diferenças estatisticamente significantes das expressões gênicas em função das variáveis clínicas/terapêuticas avaliadas no grupo Acromegalia.

No grupo doença de Cushing, houve uma expressão mais baixa de *VDAC2* entre os pacientes que realizaram 2 ou mais cirurgias (RQ mediana = 1,51 versus RQ mediana = 0,09; P 0,028). No grupo de tumor não funcionante, observou-se uma expressão mais baixa de *VDAC1* nos tumores macro comparados aos gigantes (RQ mediana = 0,45 versus RQ mediana = 0,74; P 0,049) e um expressão mais elevadas de *VDAC1* nos pacientes que realizaram radioterapia (RQ mediana = 1,56 versus RQ mediana = 0,55; P 0,042).

**TABELA 5. Comparação da expressão dos genes *VDAC1*, *VDAC2*, *BAX* e *BAK1* entre as categorias da características clínicas e terapêuticas de acordo com o tipo de adenoma pituitário.**

Fatores clínicos e terapêuticos	<i>VDAC1</i>		<i>VDAC2</i>		<i>BAX</i>		<i>BAK1</i>	
	RQ Med	P valor	RQ Med	P valor	RQ Med	P valor	RQ Med	P valor
<b>Acromegalia</b>								
Tamanho do tumor		0,873		0,205		0,108		0,923
Macro	0,47		0,88		0,33		0,72	
Gigante	0,57		0,47		0,19		1,21	
Número de cirurgias		0,490		0,176		1,000		0,231
Uma	0,47		0,88		0,30		0,59	
Duas ou mais	0,55		0,26		0,32		1,92	
Realizou radioterapia		0,563		0,118		0,224		-
Sim	0,37		0,09		0,15		-	
Não	0,50		0,73		0,32		0,720	
Uso de medicamento		0,395		0,827		0,509		0,604
Sim	0,53		0,72		0,33		0,89	
Não	0,37		1,17		0,26		0,47	
Controle Bioquímico		0,160		1,000		0,487		0,295
Sim	0,59		0,61		0,25		0,50	
Não	0,40		0,72		0,32		1,60	
Tumor aumentou pós-cirurgia		0,921		1,000		0,920		0,933

Não	0,50	0,72	0,30	0,74
Sim	0,41	1,16	0,33	1,30
Classificação Knosp	0,815	0,592	0,925	0,641
0-2	0,47	0,80	0,31	0,59
3-4	0,55	0,69	0,32	1,30
<b>Doença de Cushing</b>				
Tamanho do tumor	0,289	0,935	0,150	0,921
Macro	0,72	1,10	0,39	0,72
Gigante	0,70	0,85	0,18	0,92
Número de cirurgias	0,140	<b>0,028</b>	1,000	-
Uma	0,57	<b>1,51</b>	0,26	0,90
Duas ou mais	3,01	<b>0,09</b>	1,59	-
Realizou radioterapia	0,105	1,000	0,828	-
Sim	0,31	2,20	0,19	-
Não	0,71	1,09	0,31	0,90
Uso de medicamento	0,087	0,892	0,143	0,582
Sim	0,48	1,51	0,15	1,40
Não	0,82	0,85	0,34	0,90
Controle Bioquímico	0,840	0,722	0,832	0,630
Sim	0,55	0,77	0,21	0,90
Não	0,76	1,74	0,31	1,40
Tumor aumentou pós-cirurgia	0,432	0,929	0,874	0,776
Não	0,77	1,01	0,31	0,81
Sim	0,51	1,34	0,19	0,94
Classificação Knosp	0,893	0,080	0,952	0,776
0-2	0,64	0,66	0,26	0,92
3-4	0,70	3,16	0,27	0,52
<b>Tumor não funcionante</b>				
Tamanho do tumor	<b>0,049</b>	0,842	0,131	0,140
Macro	<b>0,45</b>	1,15	0,49	1,23
Gigante	<b>0,74</b>	0,78	0,15	0,48
Número de cirurgias	0,053	0,449	1,000	0,725
Uma	0,47	1,27	0,44	1,02
Duas ou mais	0,69	0,68	0,34	0,74
Realizou radioterapia	<b>0,042</b>	0,531	0,409	0,349
Sim	<b>1,56</b>	1,74	0,53	0,55
Não	<b>0,55</b>	1,03	0,40	1,02
Tumor aumentou pós-cirurgia	0,312	0,064	0,362	0,102
Não	0,55	0,64	0,47	1,16
Sim	0,74	1,56	0,35	0,51
Classificação Knosp	0,286	0,256	0,563	1,000
0-2	0,57	0,99	0,40	0,98
3-4	0,57	1,39	0,43	0,92

**Negrito** indica diferenças estatisticamente entre as categorias dos fatores (P <0,05). P valor calculado através do teste Mann-Whitney.

## DISCUSSÃO

Os AP são tumores benignos, com elevada frequência na população e comportamento eventualmente agressivo (4). Estudos têm demonstrado a participação de genes relacionados à replicação celular e à apoptose na patogênese de diversas neoplasias malignas, no entanto em APs, este processo ainda não é completamente compreendido (22,23). Do nosso conhecimento, este trabalho avaliou, pela primeira vez, a expressão gênica conjunta de *VDAC1*, *VDAC2*, *BAX* e *BAK1* -componentes fundamentais à apoptose - em tecido pituitário normal e em diferentes subtipos de AP.

A amostra foi composta principalmente por mulheres, com média de idade 48 anos, sendo mais frequentes os macroadenomas, de maneira análoga a outros estudos (1,24,25). Os microadenomas representaram 5,1% dos tumores avaliados e, nesse grupo, quase todos (5/6) foram adenomas corticotróficos. Estudos prévios mostram que a maioria dos casos de Doença de Cushing é composta por lesões menores que 1cm, sendo apenas 50% delas claramente distinguíveis à ressonância magnética (26). Quanto ao tipo clínico, quase dois terços da amostra foi composta por adenomas NF (62,4%). Tais achados são consistentes com outros trabalhos que mostram que esse tipo clínico é 2 a 3 vezes mais prevalente que tumores somatotróficos e corticotróficos, especialmente entre os tumores gigantes, apresentando-se frequentemente com sintomas compressivos e difícil ressecabilidade (1,27). A frequência de tumores gigantes em nosso trabalho (29,1%) foi maior que a encontrada na literatura (6-10%), o que pode ser explicado, em parte, pela dificuldade de acesso ao diagnóstico e tratamento em tempo oportuno em nosso meio (24,28).

Os adenomas NF apresentaram a maior proporção de tumores invasivos, sendo 45,2% deles classificados como Knosp 3 ou 4 ao diagnóstico, contra 25% nos grupos Cushing e Acromegalia. Hussein et al. avaliaram 379 pacientes com macroadenoma NF e a frequência de tumores Knosp 3-4 foi menor que nossos achados (29%). (29).

O grupo Acromegalia foi o segundo mais prevalente em nossa amostra (20,5%), sendo a maioria (95,8%) classificada como tumores macro ou gigantes ao diagnóstico. Outros trabalhos mostraram frequência de 66 a 70 % de macroadenomas à apresentação (30,31). Em nosso estudo, verificou-se, ainda, maior necessidade de uso de medicação para controle da doença, uma vez que 75% da amostra fazia uso de



análogos de somatostatina (AS) e/ou cabergolina. O controle bioquímico foi atingido em 37,5% dos pacientes, o que demonstra uma resistência desses tumores ao tratamento medicamentoso. Nosso resultado está em concordância com outros trabalhos, que evidenciaram a normalização do IGF-1 em 23 a 40 % dos pacientes com uso de AS (32,33); Na terapia combinada (cabergolina + AS), evidenciou-se controle bioquímico em 37-56% (35).

O grupo de adenomas corticotróficos apresentou maior frequência de microadenomas, quando comparado ao demais grupos; não obstante, obteve taxa de recrescimento comparável à de Acromegálicos e NFs, nos quais encontrou-se frequência mais elevada de tumores gigantes. Adicionalmente, no grupo da Doença de Cushing foi observado maior percentual (75%) de tumores menos invasivos (Knosp 0-2). Como já relatado, os adenomas corticotróficos frequentemente se apresentam como tumores pequenos, com percentuais de recidiva de 28 a 32%, de maneira semelhante aos nossos achados (36,37).

Nesse contexto, a presença de crescimento após terapia inicial representa um importante marcador clínico de agressividade dos APs (38). Em nossa amostra, verificamos que 32,4% dos tumores tiveram recrescimento, com taxas semelhantes entre os distintos grupos. Vários estudos demonstraram taxas de recrescimento de 20 a 50%, notadamente em algumas mutações associadas a tumores corticotróficos agressivos (29,39–41).

Este trabalho avaliou pela primeira vez a análise da expressão gênica de *VDAC1* e *VDAC2* em hipófise normal e em diferentes subtipos de APs, de acordo com nosso conhecimento. Nesse aspecto, observou-se menor expressão de *VDAC1* nos somatotropinomas e adenomas NF em relação ao tecido normal. Por outro lado, uma hiperexpressão de *VDAC1* foi observada em tumores malignos, notadamente naqueles de curso clínico mais severo, o que pode estar associado a mudanças adaptativas no metabolismo energético das células cancerosas, com aumento da glicólise aeróbica (efeito Warburg), resultando em maior resistência à morte celular (42–50).

Já em nosso estudo, uma subexpressão de *VDAC1* foi observada nos grupos de Acromegálicos e de tumores NF, detentores do maior número de tumores gigantes em nossa amostra. Este achado pode sugerir que a expressão diminuída de *VDAC1* nesses

tumores pode induzir resistência à apoptose, resultando em tumores de maior tamanho.

É possível que estas diferenças entre a expressão de *VDAC1* nos cânceres (hiperexpresso) e nos nossos achados em APs (subexpresso) possam ocorrer por ações distintas desse gene na apoptose desses tumores; entretanto, estudos da expressão de *VDAC1* em carcinomas pituitários podem contribuir para uma maior compreensão desses achados.

Quanto ao *VDAC2*, não houve diferença significativa na sua expressão em comparação ao tecido normal da hipófise nos 3 subgrupos de tumores avaliados. Estudos da expressão de *VDAC2* em tumores benignos são escassos e inexistentes em APs. Já nos cânceres, os resultados da expressão de *VDAC2* são divergentes na literatura. A hiperexpressão de *VDAC2* já foi documentada em 2 subtipos de carcinomas diferenciados de tireoide e seu silenciamento levou a melhor resposta clínica a um agente quimioterápico (17). Em contrapartida, outro estudo demonstrou que a deleção de *VDAC2* em glioblastomas e tumores colorretais de roedores resultou em inibição da apoptose mediada por *BAX* e pior resposta a agentes quimioterápicos, o que sugere que *VDAC2* pode ser essencial para ativar a apoptose mediada por *BAX*, limitando o crescimento destes tumores (51). Diferentemente dos achados em tumores malignos, nossos resultados não demonstraram correlação de *VDAC2* com *BAX* e *BAK1* em APs. (51-53)

Outro dado interessante deste trabalho foi o achado de hiperexpressão de *VDAC2* em tumores que apresentam crescimento pós cirurgia. Nesses tumores, o aumento de *VDAC2* poderia induzir um comportamento proliferativo, já que a proteína *VDAC2* pode formar complexos com *BAK*, impedindo sua ativação e reduzindo a apoptose (16,52). Em melanomas, a disjunção do complexo *VDAC2-BAK* demonstrou-se capaz de induzir a apoptose e controlar o crescimento tumoral (53). Contudo, a análise de correlação entre *BAK1* e *VDAC2*, em nossa amostra, não demonstrou associação estatisticamente significativa entre estes genes em todos os subgrupos de tumores avaliados.

Em relação a *BAX*, foi evidenciada uma subexpressão em todos os subtipos de APs avaliados neste estudo. Desta forma, presume-se que a resistência à apoptose mediada por *BAX* pode ser um dos mecanismos envolvidos na tumorigênese pituitária, posto que, este gene atua como efetor da apoptose em diversas neoplasias (46,54–56). Em APs,

Ozer et al. avaliaram a expressão imuno-histoquímica de BAX em um grupo composto majoritariamente por macroadenomas e verificaram a subexpressão de BAX nos tumores recidivantes, o que sinaliza para um importante papel dessa proteína na evasão à apoptose em APs, o que parece estar em concordância com o evidenciado em nossos achados (57).

No que concerne a *BAK1*, não encontramos, também, diferenças significantes em sua expressão nos APs, quando comparada à hipófise normal. Assim como *BAX*, *BAK1* tem papel pró-apoptótico e sua expressão se demonstrou aumentada no câncer (58), mas nossos resultados sugerem menor importância desse gene na tumorigênese pituitária.

Foi verificada, ainda, uma correlação fortemente negativa na expressão *BAX* e *BAK1*, nos tumores corticotróficos e fracamente positiva em adenomas NF. Sabe-se que *BAK1* e *BAX* são estrutural e funcionalmente semelhantes, e suas expressões sofrem influências de diversos fatores (59). É possível que o papel desses genes nos tumores acima citados seja determinado por interações entre ambos e com outros genes não estudados (55,59,60). Por outro lado, não identificamos estudos que tenham avaliado de maneira específica a interação entre *BAK1* e *BAX* em APs e as diferenças nestas relações de acordo com os subtipos clínicos encontradas não são, ainda, compreendidas.

No tocante à invasividade, quando comparados os tumores classificados como Knosp 3-4 e os tumores Knosp 0-2, não foi constatada diferença na expressão dos genes estudados. Tal achado pode sugerir baixa influência desses genes na invasividade dos APs, a qual pode estar ligada a vias não diretamente relacionadas à apoptose mediada pelos genes investigados.

As principais limitações deste trabalho relacionam-se à dificuldade de acesso dos pacientes ao tratamento em nosso meio, o que resultou em uma parcela pequena de microadenomas, além do número reduzido de pacientes submetidos à radioterapia.

Em conclusão, a subexpressão de *VDAC1* e *BAX* identificada neste trabalho pode sugerir um papel desses genes na resistência à apoptose dos APs. Já a expressão de *VDAC2* demonstrou-se aumentada nos APs que tiveram crescimento pós cirurgia, o que pode sugerir uma ação anti apoptótica de *VDAC2* nesses tumores. No entanto, estudos futuros

com maior tamanho amostral são necessários para a melhor compreensão do papel de VDACs, *BAK1* e *BAX* na tumorigênese pituitária e no seu potencial comportamento agressivo, ensejando, novos alvos terapêuticos para os APs.

## REFERÊNCIAS

1. Daly AF, Beckers A. The Epidemiology of Pituitary Adenomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* [Internet]. 2020;49(3):347–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2020.04.002>
2. Nishioka H. Aggressive pituitary tumors (PitNETs). *Endocr J*. 2023;70(3):241–8.
3. Melmed S, Kaiser UB, Lopes MB, Bertherat J, Syro L V., Raverot G, et al. Clinical Biology of the Pituitary Adenoma. *Endocr Rev*. 2022;43(6):1003–37.
4. Ng S, Messerer M, Engelhardt J, Bruneau M, Cornelius JF, Cavallo LM, et al. Aggressive pituitary neuroendocrine tumors: current practices, controversies, and perspectives, on behalf of the EANS skull base section. *Acta Neurochir (Wien)* [Internet]. 2021;163(11):3131–42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00701-021-04953-6>
5. Raverot G, Ilie MD, Lasolle H, Amodru V, Trouillas J, Castinetti F, et al. Aggressive pituitary tumours and pituitary carcinomas. *Nat Rev Endocrinol*. 2021;17(11):671–84.
6. Trouillas J, Roy P, Sturm N, Dantony E, Cortet-Rudelli C, Viennet G, et al. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol*. 2013 Jul;126(1):123–35.
7. Figarella-Branger D, Trouillas J. The new WHO classification of human pituitary tumors: comments. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2006;111(1):71–2. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00401-005-1099-0>
8. Portovedo S, Neto LV, Soares P, Carvalho DP de, Takiya CM, Miranda-Alves L. Aggressive nonfunctioning pituitary neuroendocrine tumors. *Brain Tumor Pathol* [Internet]. 2022;39(4):183–99. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10014-022-00441-6>
9. Bioletto F, Berton AM, Prencipe N, Varaldo E, Bona C, Grottoli S. Markers of Aggressiveness in Pituitary Tumors: Update and Perspectives. *J Clin Med*. 2022;11(21):2–5.
10. Asa SL, Mete O, Perry A, Osamura RY. Overview of the 2022 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol* [Internet]. 2022;33(1):6–26. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-022-09703-7>

11. Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2017;16(4):273–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.253>
12. Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV., Cusimano MD, Kovacs K. Aggressive pituitary adenomas-diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2014;10(7):423–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2014.64>
13. Mazure NM. VDAC in cancer. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2017;1858(8):665–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbambio.2017.03.002>
14. Józwiak P, Ciesielski P, Forma E, Kozal K, Wójcik-Krowiranda K, Cwonda Ł, et al. Expression of voltage-dependent anion channels in endometrial cancer and its potential prognostic significance. *Tumor Biol*. 2020;42(8):1–12.
15. Yang G, Zhou D, Li J, Wang W, Zhong W, Fan W, et al. VDAC1 is regulated by BRD4 and contributes to JQ1 resistance in breast cancer. *Oncol Lett*. 2019;18(3):2340–7.
16. Cheng EHY, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*. 2003 Jul;301(5632):513–7.
17. 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. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2015;404:37–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.021>
18. Ghadir M, Khamseh ME, Panahi-shamsabad M, Ghorbani M, Akbari H, Mehrjardi AZ, et al. Cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis in non-functional pituitary adenoma: association with tumor invasiveness. *Endocrine* [Internet]. 2020;69(3):596–603. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-020-02366-6>
19. Katznelson L, Laws ER, Melmed S, Molitch ME, Murad MH, Utz A, et al. Acromegaly: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11):3933–51.
20. Raverot G, Burman P, McCormack A, Heaney A, Petersenn S, Popovic V, et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for the management of aggressive pituitary tumours and carcinomas. *Eur J Endocrinol*. 2018;178:G1–24.
21. Tritos NA, Miller KK. Diagnosis and Management of Pituitary Adenomas: A Review. *JAMA* [Internet]. 2023;329(16):1386–98. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2023.5444>
22. Marques P, Korbonits M. Tumour microenvironment and pituitary tumour behaviour. *J Endocrinol Invest* [Internet]. 2023;46(6):1047–63. Available from:

<https://doi.org/10.1007/s40618-023-02089-1>

23. Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2011;7(5):257–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2011.40>
24. Castellanos LE, Gutierrez C, Smith T, Laws ER, Iorgulescu JB. Epidemiology of common and uncommon adult pituitary tumors in the U.S. according to the 2017 World Health Organization classification. *Pituitary*. 2022;25(1):201–9.
25. Araujo-Castro M, Berrocal VR, Pascual-Corrales E. Pituitary tumors: epidemiology and clinical presentation spectrum. *Hormones*. 2020;19(2):145–55.
26. Fleseriu M, Auchus R, Bancos I, Ben-Shlomo A, Bertherat J, Biermasz NR, et al. Consensus on diagnosis and management of Cushing's disease: a guideline update. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2021;9(12):847–75.
27. Iglesias P, Arcano K, Triviño V, García-Sancho P, Díez JJ, Villabona C, et al. Prevalence, Clinical Features, and Natural History of Incidental Clinically Non-Functioning Pituitary Adenomas. *Horm Metab Res = Horm und Stoffwechselforsch = Horm Metab*. 2017 Sep;49(9):654–9.
28. Iglesias P, Rodríguez Berrocal V, Díez JJ. Giant pituitary adenoma: histological types, clinical features and therapeutic approaches. *Endocrine* [Internet]. 2018;61(3):407–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-018-1645-x>
29. Hussein Z, Grieve J, Dorward N, Miskiel K, Kosmin M, Fersht N, et al. Non-functioning pituitary macroadenoma following surgery: long-term outcomes and development of an optimal follow-up strategy. *Front Surg* [Internet]. 2023;10(July):1–10. Available from: <https://doi.org/10.3389/fsurg.2023.1129387>
30. Fleseriu M, Langlois F, Lim DST, Varlamov E V., Melmed S. Acromegaly: pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. 2022;10(11):804–26. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00244-3](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00244-3)
31. Lavrentaki A, Paluzzi A, Wass JAH, Karavitaki N. Epidemiology of acromegaly: review of population studies. *Pituitary*. 2017;20(1):4–9.
32. Jallad RS, Musolino NRC, Salgado LR, Bronstein MD. Treatment of acromegaly with octreotide-LAR: extensive experience in a Brazilian institution. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 Aug;63(2):168–75.
33. Zhao Z, Duan L, Gao D, Yao Y, Deng K, Xing B, et al. Efficacy and adverse events of octreotide long-acting release in acromegaly: a real-world retrospective study. *Ann Transl Med*. 2022;10(13):734–734.
34. Mattar P, Alves Martins MR, Abucham J. Short-and long-term efficacy of combined cabergoline and octreotide treatment in controlling IGF-I levels in acromegaly.

Neuroendocrinology. 2010;92(2):120–7.

35. Vilar L, Azevedo MF, Naves LA, Casulari LA, Albuquerque JL, Montenegro RM, et al. Role of the addition of cabergoline to the management of acromegalic patients resistant to longterm treatment with octreotide LAR. *Pituitary*. 2011;14(2):148–56.

36. Stroud A, Dhaliwal P, Alvarado R, Winder MJ, Jonker BP, Grayson JW, et al. Outcomes of pituitary surgery for Cushing's disease: a systematic review and meta-analysis. *Pituitary* [Internet]. 2020;23(5):595–609. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11102-020-01066-8>

37. Abu Dabrh AMA, Singh Ospina NM, Al Nofal A, Farah WH, Barrionuevo P, Sarigianni M, et al. PREDICTORS OF BIOCHEMICAL REMISSION AND RECURRENCE AFTER SURGICAL AND RADIATION TREATMENTS OF CUSHING DISEASE: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol*. 2016 Apr;22(4):466–75.

38. Kasuki L, Raverot G. Definition and diagnosis of aggressive pituitary tumors. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020;21(2):203–8.

39. Dekkers OM, Karavitaki N, Pereira AM. The epidemiology of aggressive pituitary tumors (and its challenges). *Rev Endocr Metab Disord*. 2020;21(2):209–12.

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

41. Yamamoto M, Nakao T, Ogawa W, Fukuoka H. Aggressive Cushing's Disease: Molecular Pathology and Its Therapeutic Approach. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12(June):1–14.

42. Liao M, Yao D, Wu L, Luo C, Wang Z, Zhang J, et al. Targeting the Warburg effect: A revisited perspective from molecular mechanisms to traditional and innovative therapeutic strategies in cancer. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2023;(xxx). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.12.003>

43. Shoshan-Barmatz V, Shteinfer-Kuzmine A, Verma A. VDAC1 at the intersection of cell metabolism, apoptosis, and diseases. *Biomolecules*. 2020;10(11):1–40.

44. Koren I, Raviv Z, Shoshan-Barmatz V. Downregulation of voltage-dependent anion channel-1 expression by RNA interference prevents cancer cell growth in vivo. *Cancer Biol Ther*. 2010;9(12):1046–52.

45. Shoshan-Barmatz V, Nahon-Crystal E, Shteinfer-Kuzmine A, Gupta R. VDAC1, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease. *Pharmacol Res* [Internet]. 2018;131:87–101. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661818300768>

46. Liu Z, Ding Y, Ye N, Wild C, Chen H, Zhou J. Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy. *Med Res Rev* [Internet]. 2016 Mar 1;36(2):313–41. Available from: <https://doi.org/10.1002/med.21379>
47. Gay-Bellile M, Véronèse L, Combes P, Eymard-Pierre E, Kwiatkowski F, Dauplat MM, et al. TERT promoter status and gene copy number gains: Effect on TERT expression and association with prognosis in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(44):77540–51.
48. Fang Y, Liu J, Zhang Q, She C, Zheng R, Zhang R, et al. Overexpressed VDAC1 in breast cancer as a novel prognostic biomarker and correlates with immune infiltrates. *World J Surg Oncol*. 2022 Jun;20(1):211.
49. Brahim-Horn MC, Ben-Hail D, Ilie M, Gounon P, Rouleau M, Hofman V, et al. Expression of a truncated active form of VDAC1 in lung cancer associates with hypoxic cell survival and correlates with progression to chemotherapy resistance. *Cancer Res*. 2012 Apr;72(8):2140–50.
50. Zhang G, Jiang G, Wang C, Zhong K, Zhang J, Xue Q, et al. Decreased expression of microRNA-320a promotes proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells by increasing VDAC1 expression. *Oncotarget*. 2016;7(31):49470–80.
51. Chin HS, Li MX, Tan IKL, Ninnis RL, Reljic B, Scicluna K, et al. VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07309-4>
52. Yuan Z, Dewson G, Czabotar PE. VDAC2 and the BCL-2 family of proteins. 2021;0(November):2787–95.
53. Plötz M, Gillissen B, Hossini AM, Daniel PT, Eberle J. Disruption of the VDAC2Bak interaction by Bcl-xS mediates efficient induction of apoptosis in melanoma cells. *Cell Death Differ*. 2012;19(12):1928–38.
54. Jamerson MH, Johnson MD, Korsmeyer SJ, Furth PA, Dickson RB. Bax regulates c-Myc-induced mammary tumour apoptosis but not proliferation in MMTV-c-myc transgenic mice. *Br J Cancer*. 2004;91(7):1372–9.
55. Gessner C, Liebers U, Kuhn H, Stiehl P, Witt C, Schauer J, et al. BAX and p16INK4A are independent positive prognostic markers for advanced tumour stage of nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J*. 2002;19(1):134–40.
56. Ma SB, Nguyen TN, Tan I, Ninnis R, Iyer S, Stroud DA, et al. Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. *Cell Death Differ*.



2014;21(12):1925–35.

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

58. Park D, Anisuzzaman ASM, Magis AT, Chen G, Xie M, Zhang G, et al. Discovery of Small Molecule Bak Activator for Lung Cancer Therapy. *Theranostics*. 2021;11(17):8500–16.

59. Cosentino K, Hertlein V, Jenner A, Dellmann T, Gojkovic M, Peña-Blanco A, et al. The interplay between BAX and BAK tunes apoptotic pore growth to control mitochondrial-DNA-mediated inflammation. *Mol Cell*. 2022 Mar;82(5):933-949.e9.

60. Yuan Z, Dewson G, Czabotar PE, Birkinshaw RW. VDAC2 and the BCL-2 family of proteins. *Biochem Soc Trans*. 2021;49(6):2787–95.

## ANEXO A – NORMAS REVISTA JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY

### Diretrizes e lista de verificação parapreparação de manuscritos

---

Abaixo está uma lista de verificação dos requisitos básicos de formato. Para obter mais informações, consulte [Políticas editoriais](#). Se você tiver alguma dúvida, entre em contato com a equipe editorial [empublications@endocrine.org](mailto:empublications@endocrine.org).

#### Diretrizes sobre preparação geral de submissões iniciais

Leia as [Políticas Editoriais](#). NOTA: Os periódicos da Endocrine Society permitem submissões de preprints: consulte [Repositórios de pré-impressões e publicação prévia](#)

**Submissão em Formato Neutro:** Novos manuscritos podem ser submetidos em formato neutro, como um único arquivo Word, RTF ou PDF com numeração de linhas contínuas. A formatação técnica, como o layout de referência e a ordem dos componentes, não é examinada quanto à conformidade nesta fase inicial. Se as informações exigidas estiverem presentes (página de rosto completa, todas as informações do autor, resumo, texto completo, numeração de linhas, figuras e tabelas, referências, etc.) o manuscrito será avaliado exclusivamente pelo seu mérito científico. Observe que a extração de metadados funcionará apenas para manuscritos carregados como arquivos Word.

Envie artigos em inglês através do [sistema Editorial Manager](#)

**Linguagem inclusiva e que prioriza a pessoa:** Use uma linguagem inclusiva e que prioriza a pessoa nos manuscritos, descrevendo as pessoas como tendo uma condição ou doença, em vez de a condição ou doença ser sua identidade.

Por exemplo, use “pessoas com obesidade” ou “pessoa com diabetes” em vez de “pessoas obesas” ou “diabéticos”.

Recomendamos também a consulta do Manual de Estilo da AMA sobre [Termos para Pessoas com Doenças, Distúrbios ou Deficiências](#).

Use um formato de coluna única com espaçamento duplo em margens de 1 polegada.

Use numeração contínua de linhas em todo o manuscrito. Manuscritos submetidos sem numeração de linha serão devolvidos.

Paginar todo o documento.

Coloque todas as tabelas e figuras após as referências e rotule cada uma claramente.

Reúna as informações necessárias antes de iniciar o processo de submissão no Editorial Manager:

Nomes completos, instituições e endereços de e-mail de cada autor.

Os autores submetidos são obrigados a fornecer um ORCID ao enviar um manuscrito.

Informações de financiamento apropriadas para cada autor. Informações de

Nomes e endereços de e-mail de três revisores recomendados.

Número do manuscrito original se o manuscrito submetido foi previamente rejeitado pela revista para a qual está sendo enviado.

Nenhuma carta de apresentação é necessária. Um bloco de texto é fornecido durante o processo de envio de solicitações especiais.

As especificações apropriadas do arquivo de figura, conforme detalhado nas [Diretrizes de Figura](#), foram seguidas.

## Diretrizes sobre preparação geral de submissões revisadas

Na revisão, serão necessárias duas versões do seu manuscrito: (1) Uma cópia marcada para ser usada para fins de editor e revisor que indique todas as alterações feitas no texto, legendas e tabelas com destaque, texto colorido ou rastreado alterações e (2) Uma cópia limpa e sem marcas, com todas as cores e marcações removidas do texto, legendas e tabelas que serão usadas pela produção, caso seu manuscrito seja aceito. Ambas as versões do seu manuscrito devem ser preparadas e enviadas como arquivos MS Word.

Observe que, além de uma cópia mostrando cor ou marcação, as duas cópias do seu manuscrito devem incluir todas as revisões e ser idênticas. A cópia limpa deve conter todas as revisões refletidas na versão marcada, mas ter as alterações rastreadas aceitas e o texto destacado/colorido revertido para preto e branco.

Use numeração de linha contínua em todo o manuscrito marcado e no documento manuscrito limpo. Manuscritos submetidos sem numeração de linha serão devolvidos.

## Permissão para reproduzir ou adaptar figuras/tabelas

Figuras e tabelas adaptadas e reproduzidas são permitidas apenas em mini-revisões. Observe que a equipe de permissões ajudará o autor a identificar o tipo apropriado de permissão a ser obtido. Ao determinar o status de uma figura/tabela, use [estas definições](#) :

**ORIGINAL:** Se você criou uma figura ou tabela especificamente para o trabalho que está sendo submetido, esta é uma original e não é necessária nenhuma permissão.

**REPRODUZIDA:** Se uma figura ou tabela aparecer em uma nova publicação exatamente como apareceu na publicação original, ela será reproduzida. A permissão deve ser dada pelo editor e a atribuição à fonte original deve ser fornecida.

**ADAPTADO:** Se uma figura ou tabela for adaptada, sua aparência original será modificada, mas ainda se parecerá muito com o original. A permissão deve ser dada pelo editor e a atribuição à fonte original deve ser fornecida.

Se uma figura ou tabela utilizar elementos de outra fonte, ou de múltiplas fontes, os autores são responsáveis por determinar se a figura é “Adaptada” ou “Transformativa”.

### **ADAPTADO:**

Se você criar uma figura ou tabela que (1) inclua dados ou elementos ilustrativos publicados anteriormente por outra pessoa e (2) seus dados/elementos ilustrativos sejam incorporados em seu trabalho para ilustrar fatos ou conclusões semelhantes,

então sua reprodução de seus dados/elementos ilustrativos é uma obra derivada (ou “adaptação”). A permissão deve ser obtida do proprietário e uma citação do trabalho original deve ser fornecida na legenda da figura/tabela.

## TRANSFORMATIVO:

Se o seu uso de dados ou elementos ilustrativos publicados anteriormente por outra pessoa em sua própria figura ou tabela for além de simplesmente adaptar o trabalho dela conforme descrito acima, então seu uso poderá ser “transformador”. Se você acredita que o trabalho é transformador, talvez não seja necessário obter permissão, mas será necessário fornecer uma citação.

Para ser transformador, seu uso deve adicionar algo exclusivamente novo aos dados/elementos ilustrativos subjacentes ou servir a uma função, propósito ou caráter diferente do trabalho original. Um factor a considerar é se o novo trabalho será competitivo ou suplantará a procura do original. Os trabalhos transformadores geralmente não são competitivos com o trabalho original. Se você acredita que seu uso é transformador, você precisa buscar orientação de seus responsáveis institucionais apropriados para determinar o status legal das figuras e tabelas que você inclui em seu manuscrito submetido e fornecer a linguagem apropriada na legenda da figura/tabela.

Se você determinar que seu trabalho é “transformador” e não requer permissão do proprietário, você deve certificar-lo como tal e incluir a fonte na legenda da figura/tabela. Por exemplo: DeBrown J *Widgets Today*, 2018; 100(6). É importante que os casos específicos sejam claramente avaliados pelos autores e, se necessário, pela(s) instituição(ões) responsável(is) pelos trabalhos submetidos pelos autores. Os autores devem estar preparados para fornecer à redação documentação que mostre a figura ou tabela original e descreva a natureza transformadora do novo trabalho.

## Unidades de medida e abreviaturas padrão

Use o sistema internacional de unidades (SI), sempre que possível, ou outras unidades métricas. Se forem mencionadas unidades não métricas, indique o seu equivalente no SI entre parênteses.

A temperatura deve ser expressa em graus Celsius (por exemplo, 28°C) e a hora do dia usando o relógio de 24 horas (por exemplo, 08:00 h, 15:00 h).

O peso molecular não deve ter unidades (daltons).

Todas as abreviaturas não padronizadas no texto devem ser definidas imediatamente após o primeiro uso da abreviatura.

[Baixe uma planilha do MS Excel com abreviações padrão \(XLSX, 15,6 KB\)](#).

[Baixe o mesmo documento em formato MS Excel anterior a 2007 \(XLS, 45 KB\)](#).

## Padrões de nomenclatura de esteróides

As três principais classes de esteróides sexuais de mamíferos

– andrógenos, estrogênios e progestágenos (ou progestágenos ou gestágenos) – correspondem aos receptores bem definidos de andrógeno, estrogênio e

progesterona. O principal esteróide sexual bioativo e ligante natural para cada classe é

testosterona, estradiol e progesterona, respectivamente. Estrogênio(s) e

progesterona(s) são classes de esteróides. Os esteróides ou extratos sintéticos podem ser considerados membros de uma classe genérica de esteróides, mas são distintos do ligante cognato natural. Portanto, os termos andrógenos, estrogênios e progestágenos (ou progestágenos ou gestágenos) devem ser usados quando se referem à classe de hormônios, ao passo que quando um esteróide natural ou sintético específico está sendo usado ou testado, o composto específico deve ser especificado.

Além dos nomes triviais aceitos, os esteróides devem ser nomeados de acordo com a nomenclatura sistemática da convenção IUPAC sobre Nomenclatura de Esteróides (Moss et al Pure & Applied Chemistry 61:1783–1822, 1989) na

primeira menção em uma única nota de rodapé definindo todas as abreviações de letras . Subsequentemente, devem ser utilizados nomes genéricos ou triviais ou abreviaturas de letras, mas não nomes comerciais.

Os nomes triviais aceitos incluem colesterol, estrona, (17) estradiol, estriol, aldosterona, androsterona, eticolanolona, desidroepiandrosterona, (5) diidrotestosterona, testosterona, androstenediona, pregnenolona, progesterona, corticosterona, desoxicorticosterona, cortisona, cortisol.

Nomes triviais podem ser modificados por prefixos indicando substituintes (como em 17-hidroxiprogesterona para 17-hidroxi-4-pregnen-3,20-diona), ligações duplas (como em 7-desidrocolesterol para 5,7-colestadien-3-ol) e configurações epiméricas de grupos funcionais, desde que o locus de epimerização seja indicado (como em 3-epiandrosterona para 3-hidroxi-5-androstan-17-ona).

## Lista de verificação e diretrizes

### Folha de rosto

\_\_\_\_\_ O título deve ter 120 caracteres e espaços ou menos e fornecer uma declaração concisa e informativa do conteúdo do artigo. Evite títulos apresentados como perguntas e jogos de palavras ou títulos cômicos, pois geralmente não serão compreendidos globalmente.

\_\_\_\_\_ Nomes completos dos autores e instituições.

\_\_\_\_\_ Não mais do que seis palavras-chave.

\_\_\_\_\_ Informações de contato do autor correspondente.

\_\_\_\_\_ Nome e endereço do autor ao qual devem ser endereçados os pedidos de reimpressão.

\_\_\_\_\_ Quaisquer subsídios ou bolsas de apoio à redação do artigo.

\_\_\_\_\_ Resumo da divulgação.

### Abstrato

\_\_\_\_\_ Máximo de 250 palavras e preparado como [resumo estruturado](#) .

\_\_\_\_\_ Não se refere diretamente ao texto ou referências.

\_\_\_\_\_ Descreve em frases completas o objetivo, métodos, resultados e principais conclusões.

\_\_\_\_\_ Destinado ao público em geral com terminologia especializada reduzida ao mínimo.

## Introdução

\_\_\_\_\_ Uma declaração introdutória que coloca o trabalho em perspectiva histórica, explicando sua intenção e significado.

As duas seções a seguir são esperadas em um artigo de pesquisa:

## Materiais e métodos

\_\_\_\_\_ Descreve com detalhes suficientes para que outros investigadores repitam o trabalho.

\_\_\_\_\_ Faça todos os depósitos de recursos apropriados. Consulte [Depósitos de Recursos](#) para obter instruções completas.

## Resultados

\_\_\_\_\_ Os resultados devem apresentar resumidamente os dados experimentais em texto, tabelas ou figuras.

## Discussão

\_\_\_\_\_ Focar a discussão na interpretação e importância das descobertas ou informações revisadas com comentários objetivos e concisos que descrevem sua relação com outros trabalhos nessa área.

## Agradecimentos

\_\_\_\_\_ Incluir nomes de pessoas que contribuíram para o estudo, mas não atenderam aos requisitos de autoria.

## Disponibilidade de dados

\_\_\_\_\_ Opções descritas na seção [Disponibilidade de dados](#) .

## Referências

\_\_\_\_\_ Use o Guia de Estilo da AMA (American Medical Association) para referências permitidas. Liste todos os autores para a submissão inicial. Veja exemplos de referências formatadas corretamente abaixo.

\_\_\_\_\_ Listar as referências em ordem numérica consecutiva (entre parênteses) no texto, figuras e tabelas e listar na mesma ordem numérica no final do manuscrito. As referências em tabelas e figuras devem ser citadas em sequência com as do texto. A numeração deverá passar para a tabela ou figura após a primeira menção da tabela ou figura no texto. Todas as referências na tabela ou figura devem ser citadas em sequência. A numeração das citações deverá então retornar ao texto e continuar para as citações subsequentes. NOTA: Desde que a sequência seja preservada, é aceitável que uma referência

apareça apenas em uma figura ou tabela. EXEMPLO: Se a Tabela 1 contém cinco referências e a primeira citação da tabela ocorre imediatamente após a Ref. 10 no texto, então as referências numeradas na Tabela 1 deverão ser Refs. 11–15. No texto, após a primeira citação da Tabela 1, o sequenciamento das referências é retomado com a Ref. 16 e assim por diante.

\_\_\_\_\_ Os dados suplementares devem ser submetidos a um repositório e citados na bibliografia do manuscrito. Para obter mais informações, consulte [Conjuntos de dados estendidos e materiais suplementares](#).

\_\_\_\_\_ Não cite o seguinte na lista de referências:

Observações não publicadas  
Comunicações pessoais

Manuscritos enviados  
Manuscritos em preparação

Pré-impressões

\_\_\_\_\_ Manuscritos “no prelo” poderão ser incluídos na lista de referências se atenderem aos seguintes critérios:

◆ Aceito para publicação em um periódico revisado por pares, mas ainda não na forma final publicada

Pode ser citado com um DOI (Digital Object Identifier) O nome do diário é fornecido

◆ Resumos: Caso seja necessário citar um resumo por conter dados não publicados em outro lugar, ele deverá ser designado como tal no texto e na lista de referências.

\_\_\_\_\_ Exemplos de referências:

CITAÇÃO DE DIÁRIO: Binoux M, Hossenlopp P. Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e proteínas de ligação ao IGF: comparação de soro humano e linfa. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988 ;67(3):509–514.

CITAÇÃO RESUMO: MacLaughlin DT, Cigarros F, Donahoe PK. Mecanismo de ação da substância inibidora Mulleriana. Programa da 70ª Reunião Anual da Sociedade Endócrina, Nova Orleans, LA, 1988, p 19 (Resumo P1–21).

CITAÇÃO DE LIVRO: Bonneville F, Cattin F, Dietemann JL. *Tomografia computadorizada da glândula pituitária*. Heidelberg: Springer-Verlag; 1986; 15–16.

CITAÇÃO DO CAPÍTULO DO LIVRO: Burrow GN. A Tireoide: nódulos e neoplasias. In: Felig P, Baxter JD, Broadus AE, Frohman LA, eds. *Endocrinologia e metabolismo*. 2ª edição. Nova York: McGraw-Hill; 1987:473–507.

CITAÇÃO DO REPOSITÓRIO: Brown C, Jones M, Cohen M.

Dados de: Processo de regulamentação de dispositivos médicos: revisão de avisos e alertas de segurança.



Repositório Digital Dryad 2017. Depositado em 2 de janeiro de 2018.

<http://doi.org/10.9561/dryad.585t4>

## Legendas para Figuras e Tabelas

\_\_\_\_\_ Forneça todas as legendas separadamente após as referências.

\_\_\_\_\_ Apenas mini-revisões: se a figura ou tabela for reproduzida ou adaptada de fonte previamente publicada, incluir uma linha de agradecimento ao final da legenda.

\_\_\_\_\_ Descrever de forma clara e completa o conteúdo da figura ou tabela para que possa ser compreendido sem referência ao texto.

\_\_\_\_\_ Explique quaisquer símbolos ou o significado de qualquer cor que seja importante para a compreensão do conteúdo.

\_\_\_\_\_ Use descritores de cores conforme necessário.

\_\_\_\_\_ As figuras e tabelas devem ser numeradas para aparecerem sequencialmente. A Figura 1 deve ser seguida pela Figura 2 e quaisquer números subsequentes em ordem numérica, e a Tabela 1 deve ser seguida pela Tabela 2 e quaisquer tabelas subsequentes em ordem numérica.

## Tabelas

\_\_\_\_\_ Construa tabelas de forma simples e projete-as para que sejam claras sem referência ao texto.

\_\_\_\_\_ Forneça um título conciso e notas de rodapé, se necessário.

\_\_\_\_\_ Geralmente, as tabelas submetidas não devem consistirem mais de quatro ou oito páginas manuscritas (para apresentação em retrato ou paisagem, respectivamente). Isso ocorre para que as tabelas compostas sejam limitadas a duas páginas de diário (se na orientação retrato padrão) ou quatro páginas de diário (se na orientação paisagem) com tamanho de fonte normal. Se, quando compostas, as tabelas excederem os limites especificados, a produção e a publicação final serão adiadas até que os requisitos sejam atendidos.

\_\_\_\_\_ As tabelas devem ser criadas usando o recurso Inserir Tabela do Microsoft Word e carregadas como arquivos separados no formato .doc ou .docx ou colocadas no final do documento do manuscrito.

\_\_\_\_\_ As tabelas não podem incluir cores ou gráficos.

## Diretrizes de Figura

Diretrizes de integridade de imagem

\_\_\_\_\_ A Endocrine Society utiliza um processo de triagem forense de imagem para determinar se ocorreu manipulação.

\_\_\_\_\_ Nenhum recurso específico em uma imagem pode ser aprimorado, obscurecido, movido, removido ou introduzido.

\_\_\_\_\_ Ajustes de brilho, contraste ou equilíbrio de cores são aceitáveis somente se forem aplicados à imagem inteira e não obscurecerem, eliminarem ou deturparem qualquer informação presente no original.

\_\_\_\_\_ O agrupamento de imagens de diferentes partes de um mesmo gel, campo ou exposição, ou de diferentes fontes, deve ser explicitado pela disposição da figura (ex.: linhas divisórias) no texto da legenda da figura.

\_\_\_\_\_ O autor concorda em fornecer à redação os dados originais utilizados na produção da figura, caso solicitado.

Em geral

\_\_\_\_\_ Revise as [Diretrizes de Arte Digital](#) detalhadas .

\_\_\_\_\_ Se usar cores, apresente informações de forma a minimizar a dificuldade dos leitores com deficiência visual decore, por exemplo, usando símbolos e uma paleta de cores otimizada. Consulte [as Diretrizes de preparação de figuras para deficiência de visão de cores](#) .

\_\_\_\_\_ Os títulos devem ser claros e informativos. Use palavras mínimas nas figuras e limite a explicação das figuras às suas legendas.

\_\_\_\_\_ As legendas devem descrever de forma clara e completa o conteúdo apropriado.

\_\_\_\_\_ Taxas de cores serão aplicadas a todas as figuras coloridas enviadas. Estas não podem ser substituídas por versões em preto e branco após aceitação.

\_\_\_\_\_ As figuras devem ser numeradas para aparecerem sequencialmente. A Figura 1 deve ser seguida pela Figura 2 e quaisquer figuras subsequentes em ordem numérica.

Especificações

\_\_\_\_\_ Resolução:

Figuras de baixa resolução não são aceitáveis para produção.

Arte linear (monocromática): 600–1200 DPI Meio-tom (somente escala de cinza): 300 DPI

Combinação (meio-tom com tipo ou linhas) ou cor: 600 DPI

\_\_\_\_\_ Formato de arquivo:

Envie um arquivo por figura.

O formato preferido é EPS, TIFF, PPT e JPG. O formato JPEG não é preferido, mas será considerado caso a caso. Arquivos PNG, BMP e GIF não devem ser enviados. Salve as imagens das figuras como: sobrenome do autor, número da figura e extensão do formato do arquivo (por exemplo, Smith\_fig1.eps).

As fontes devem ser incorporadas ao arquivo.

\_\_\_\_\_ Nome do arquivo:

Use a seguinte convenção de nomenclatura para envio de originais: Sobrenome do autor, número da figura e extensão do formato do arquivo (por exemplo, Smith\_fig1.eps).

Use a seguinte convenção de nomenclatura para figuras revisadas: Sobrenome do autor, número do manuscrito, número da figura e extensão do formato do arquivo (por exemplo, Smith\_jc.2016-1234\_fig1.eps).

\_\_\_\_\_ Modo de cor:

O modo de cor preferido é RGB.

A densidade da cor não deve ser superior a 300%.

Todas as reproduções de arte colorida impressas resultarão em cobranças ao autor.

As figuras coloridas não são convertidas para preto e branco após aceitação.

\_\_\_\_\_ Sombreamento:

Faça com que os diferentes tons variem em pelo menos 20%, ou seja, 25%, 45%, 65%.

\_\_\_\_\_ Gráficos:

Gráficos com medidas de eixo contendo números muito grandes ou pequenos devem ser convertidos em notações de fácil leitura. Exemplo: Para um intervalo de ordenadas de valores de “contagens por minuto” de 1.000 a 20.000, o valor verdadeiro pode ser multiplicado por  $10^{-3}$  (a escala leria de 1 a 20) e o eixo de ordenadas exibiria “cpm ( $\times 10^{-3}$ ).” Da mesma forma, para um gráfico de Scatchard com valores variando de 0,1 a 2 femtomolar ( $10^{-15}$  M), a escala pode variar de 0,1 a 2 com a abcissa rotulada “M ( $\times 10^{15}$ ).

Os gráficos de barras tridimensionais não serão publicados se a informação a que se referem for apenas bidimensional.

## Dados Suplementares

\_\_\_\_\_Dados suplementares não são mais permitidos como uploads enviados com um manuscrito. Os dados suplementares devem ser submetidos a um repositório e o número de acesso fornecido na [seção Referências](#) e citado no manuscrito. Para obter mais informações, consulte [Conjuntos de dados estendidos e materiais suplementares](#).