ISABELLA PACETTI PAJARO GRANDE

**Análise da expressão gênica das sirtuínas nos somatotropinomas e
adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e sua relação
com a invasividade tumoral**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Ericka Barbosa Trarbach

SÃO PAULO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Grande, Isabella Pacetti Pajaro
Análise da expressão gênica das sirtuínas nos
somatotropinomas e adenomas hipofisários
cl clinicamente não funcionantes e sua relação com
a invasividade tumoral / Isabella Pacetti Pajaro
Grande. -- São Paulo, 2017.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Ericka Barbosa Trarbach.

Descritores: 1.Sirtuínas 2.Histona desacetilases
3.Hipófise 4.Adeno-hipófise 5.Repressão epigenética
6.Senescência celular 7.Expressão gênica
8.Neoplasias hipofisárias

USP/FM/DBD-516/17

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular-LIM/25 do Departamento de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), na Unidade de Neuroendocrinologia do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e no Instituto de Psiquiatria (IPq) do HCFMUSP.

Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Bolsa de Pós-Graduação-PROAP).

*À minha avó Therezinha, “In Memoriam”,
minha primeira professora, meu melhor
exemplo e minha maior saudade.*

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Tereza Cristina Pacetti e Vicente Massa Pajaro Grande, por terem despertado em mim o amor pelo conhecimento, por incentivarem o meu sonho de criança e me apoiarem ao longo de todo o caminho, dando todos os subsídios necessários para eu chegar até aqui. Ao meu irmão, Victor Pacetti Pajaro Grande, por me fazer questionar e crescer extraindo o melhor de mim.

Ao meu namorado, Willian Tadeu Arias Barbosa, por toda compreensão, amor e partilha e por ser o meu meio termo e meu ponto de equilíbrio durante todos esses anos. Aos meus amigos de infância, em especial a Silvia Amancio de Oliveira, por saberem me ouvir e serem a minha válvula de escape nos momentos difíceis.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ericka Barbosa Trarbach, minha maior inspiração profissional, por ter aberto as portas do laboratório e da sua casa para me receber nessa jornada, por ter acreditado na minha capacidade e por me ensinar tudo aquilo que eu sei. Por me mostrar como o ser humano pode ser humilde e ao mesmo tempo grandioso, pela amizade, pela preocupação e por todo amor dedicado à pesquisa.

Ao meu colega de pós-graduação e amigo, Paulo Vinícius Gonçalves Holanda Amorim, pela fraternidade ao longo de todos esses anos, pela sinceridade, pelo apoio incondicional e por toda ajuda prestada no desenvolvimento desse projeto. Aos também colegas de pós-graduação, Ane Caroline Thé e Rafael Loch Batista, com os quais pude dividir todo o aprendizado adquirido nesses anos.

A todos os profissionais da Unidade de Neuroendocrinologia do HCFMUSP, Dra. Raquel Jallad, Dra. Andrea Glezer, Dr. Márcio Machado, Dra. Maria Candida Fragoso, Dr. Felipe Duarte e Dr. Marcello Delano Bronstein, pelo incentivo e ajuda durante todo o Programa. Aos integrantes da Divisão de Neurocirurgia Funcional do Instituto de Psiquiatria, Dra. Nina Musolino, Dr. Malebranche Cunha Neto, Dr. Valter Cescato, Dr. Gilberto Ochman e Dr. Fabio Eduardo da Silva, pela colaboração e parceria neste projeto.

Aos integrantes do LIM-25, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular do HCFMUSP, em especial a Andrea Gomes da Silva, pelo auxílio na coleta das amostras dos pacientes e disponibilidade em me ajudar sempre que necessário.

Finalmente, agradeço aos pacientes que participaram dessa pesquisa, pela confiança e disponibilidade em contribuir para elaboração dessa tese.

Digo: o real não está na saída nem na
chegada: ele se dispõe para a gente é no
meio da travessia.

(Guimarães Rosa)

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

A ortografia da Língua Portuguesa adotada está conforme o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, assinado em Lisboa, em 16 de dezembro de 1990, por Portugal, Brasil, Angola, São Tomé e Príncipe, Cabo Verde, Guiné-Bissau, Moçambique e, posteriormente, por Timor Leste. Decreto Legislativo Brasileiro nº 54, aprovado em 18 de abril de 1995 e em vigor desde 1º de janeiro de 2009.

SUMÁRIO

LISTA DE GENES E PROTEÍNAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A hipófise	2
1.2 Os adenomas hipofisários	4
1.3 Senescência Celular	7
1.4 Regulação epigenética e as sirtuínas	12
1.4.1 A Sirtuína 1	17
1.4.2 A Sirtuína 2	19
1.4.3 A Sirtuína 3	19
1.4.4 As Sirtuínas 4 e 5	21
1.4.5 A Sirtuína 6	22
1.4.6 A Sirtuína 7	24
1.4.7 O papel das sirtuínas na hipófise	25
2. OBJETIVOS	26
2.1 Primário	27
2.2 Secundários	27
3. METODOLOGIA	28
3.1 Coorte	29
3.2 Análise clínica, laboratorial, anatomopatológica e de imagem	29

3.2.1 Análise clínica	29
3.2.2 Avaliação laboratorial	29
3.2.3 Avaliação imuno-histoquímica	30
3.2.4 Avaliação de imagem	30
3.3 PCR quantitativo em tempo real	30
3.3.1 Extração de RNA	30
3.3.2 Conversão do RNA em cDNA	32
3.3.3 Quantificação relativa do RNAm utilizando o método $\Delta\Delta Ct$	32
3.3.3.1 Avaliação da estabilidade dos genes endógenos	32
3.3.3.2 Quantificação do RNAm das <i>SIRT1-7</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>CDKN2A</i> e <i>PTTG</i>	33
3.3.3.2.1 Sistemas de detecção	33
3.3.3.2.2 Método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$	35
3.4 Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1 Caracterização dos pacientes	38
4.2 Avaliação da expressão das <i>SIRT</i> s nos adenomas hipofisários	39
4.2.1 Genes endógenos mais estáveis	39
4.2.2 Padrão de expressão das sirtuínas nos adenomas hipofisários	41
4.2.3 Expressão das sirtuínas e relação com idade diagnóstica e o fenótipo tumoral	42
4.2.4 Correlação da expressão das <i>SIRT1-7</i> com os marcadores de senescência celular <i>CDKN1A</i> e <i>CDKN2A</i>	45
4.2.5 Correlação da expressão das <i>SIRT1-7</i> com o proto-oncogene <i>PTTG</i>	47
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	54
7. ANEXOS	56
7.1 Anexo A	57
7.2 Anexo B	62
7.3 Anexo C	67
7.4 Anexo D	70
8. REFERÊNCIAS	71

LISTA DE GENES E PROTEÍNAS

ACTB	<i>Beta-actin</i>
ACSS2	<i>Acetyl-CoA synthetase-2</i>
Akt	<i>Protein kinase B (PKB)</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
ARF	<i>Auxin response factors</i>
CAPS1	<i>Calcium-dependent activator protein for secretion 1</i>
CDKN1A	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
CDKN2A	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
CDK6	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>
Cip/Kip	<i>CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein</i>
CKIs	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitors</i>
DAX-1	<i>Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1</i>
DDR	<i>Discoidin domain receptor family, member 1</i>
Dvls	<i>Dishevelled</i>
Egr1	<i>Early growth response protein 1</i>
ER	Receptor de estrogênio
E2F	<i>E2 family</i>
FoxO3	<i>Forkhead box O3</i>
GCIP	<i>Guanylyl cyclase inhibitory protein</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GATA-2	<i>GATA binding protein 2</i>
GDH	Glutamato desidrogenase
GNAS1	<i>Guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating 1</i>
GUSB	<i>Beta-glucuronidase</i>

HAT	Acetil-transferases
HDAC	Desacetilases de histonas
HIF1- α	Fator indutor de hipóxia
HPRT1	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
H1	Histona 1
H2A	Histona 2A
H2B	Histona 2B
H3	Histona 3
H4	Histona 4
IIS	<i>Insulin-IGF-1-like signaling</i>
IL-8	Interleucina 8
INK4	<i>Kinase inhibitors</i>
JUN	Fator de transcrição AP-1
MDM2	<i>Murine doble minute 2</i>
Myc	<i>Myelocytomatosis</i>
NeuroD1	<i>Neurogenic differentiation 1</i>
Nf-k β	<i>Nuclear factor kappa Beta</i>
NFxB	<i>Nuclear factor X Beta</i>
Otx1	<i>Orthodenticle homeobox 1</i>
PARP1	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>
PIP4	<i>Phosphatidylinositol 4-phosphate</i>
Pit-1	<i>Pituitary-specific POU-class homeodomain transcription factor</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
POMC	<i>Pró-opiomelanocortin</i>
PPIE	<i>Peptidylprolyl isomerase E</i>
PROP-1	<i>Homeobox protein prophet of PIT-1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTTG	<i>Pituitary tumor transforming gene</i>

p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
RAS	<i>Rat sarcoma family</i>
Rb	Proteína do retinoblastoma
SA- β -GAL	<i>Senescence-associated lysosomal β-galactosidase</i>
SF-1	Fator esteroidogênico 1
Sir2	<i>Silent information regulator 2</i>
SIRT	Sirtuína
SIRT1	Sirtuína 1
SIRT2	Sirtuína 2
SIRT3	Sirtuína 3
SIRT4	Sirtuína 4
SIRT5	Sirtuína 5
SIRT6	Sirtuína 6
SIRT7	Sirtuína 7
SIRT 1-7	Sirtuínas 1 a 7
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic</i>
SREBP1/2	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1/2</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TBP	Proteína ligadora TATA-box
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TRPM2	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily M member 2</i>
T-Pit	<i>T-box family member TBX19</i>
ULNR-IGF1	<i>Upper Limit Normal Range</i> do IGF1
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum c</i>
WRN	<i>Werner syndrome protein</i>
Wnt	<i>wingless-type</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACNF	Adenomas clinicamente não funcionantes
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BC	Câncer de mama
CAAE	Comitê de Ética em Pesquisa
CC	Câncer de colon
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
cDNA	DNA complementar
CECP	Carcinoma de células escamosas de pescoço
CIP	Calibrador inter-placa
CpG	<i>Cytosine-phosphate-guanine</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
C-	Carboxi-terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GH	Hormônio do crescimento
G0	<i>Gap 0</i>
G1	<i>Gap 1</i>
G2	<i>Gap 2</i>
G2/M	<i>Gap 2 to Mitosis-phase</i>
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HRE	Elemento de resposta hormonal
H&E	Hematoxilina e eosina

InRad	Instituto de Radiologia
IPq	Instituto de Psiquiatria
LH	Hormônio luteinizante
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LMA	Leucemia mieloide aguda
Lys	Lisina
NAD+	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NEG	Negativo
N-	Amino-terminal
PAC	Câncer de pâncreas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PRC	Câncer de próstata
PRL	Prolactina
q.s.q	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT	Transcrição Reversa
S	Síntese
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSH	Hormônio tireoestimulante

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
min	Minutos
ml	Mililitros
mg	Miligrama
ng	Nanograma
rpm	Rotação por minuto
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
°C	Graus Celsius
≥	Maior ou igual
®	Marca Registrada
β	Beta
Δ	Delta
<	Menor
>	Maior
%	Porcentagem
-/-	Dupla deleção

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Diagrama de um corte sagital representando estruturalmente a glândula hipofisária e seu entorno.....	2
Figura 2-	Representação esquemática da cascata de fatores de transcrição implicados na diferenciação das células da adenohipófise.....	3
Figura 3-	Sistema de classificação de Knosp.....	6
Figura 4-	Modelo hipotético da tumorigênese hipofisária.....	8
Figura 5-	Resumo das principais vias moleculares da senescência.....	9
Figura 6-	Representação esquemática do nucleossomo e da regulação gênica mediada pela acetilação de histonas.....	14
Figura 7-	Representação intracelular das proteínas moduladas pela <i>SIRT1</i>	18
Figura 8-	Representação da atividade moduladora de <i>SIRT3</i> na mitocôndria.....	21
Figura 9-	Representação da modulação proteica mediada pela <i>SIRT6</i>	23
Figura 10-	Modelo da montagem da placa de PCR em Tempo Real.....	35
Figura 11-	Ranqueamento dos genes mais estáveis de acordo com os programas a) GeNorm e b) NormFinder.....	40
Figura 12-	Associação entre a expressão da <i>SIRT1</i> e o tamanho tumoral dos adenomas hipofisários.....	44
Figura 13-	Associação entre a expressão da <i>SIRT3</i> e o tamanho tumoral dos adenomas hipofisários.....	44
Figura 14-	<i>Heat map</i> da expressão das <i>SIRT1-7</i> entre os adenomas hipofisários invasivos e não invasivos.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação clínico-patológica e incidência dos adenomas Hipofisários.....	6
Tabela 2-	Membros da família das sirtuínas em humanos, função e associação ao câncer.....	16
Tabela 3-	Ensaio utilizado na detecção do RNAm das sirtuínas e dos genes referência.....	34
Tabela 4-	Características clínicas dos pacientes portadores de adenomas hipofisários avaliados.....	39
Tabela 5-	Comparação das características clínicas e radiológicas entre os grupos invasivo e não-invasivo.....	38
Tabela 6 -	Estabilidade de expressão dos genes endógenos considerando a variação intra-grupos (tumores invasivos e não invasivos) e combinado.....	41
Tabela 7-	Diferença de expressão do RNAm das sirtuínas nos somatotropinomas e ACNF.....	42
Tabela 8-	Relação da expressão das SIRTs com a idade diagnóstica e o fenótipo tumoral.....	43
Tabela 9-	Correlação entre a expressão dos genes das sirtuínas e do <i>CDKN1A</i> , <i>CDKN2A</i> e <i>PTTG</i>	45

RESUMO

Grande IPP. *Análise da expressão gênica das sirtuínas nos somatotropinomas e adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e sua relação com a invasividade tumoral* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

As sirtuínas 1-7 (SIRT) constituem uma família altamente conservada de desacetilases de histonas que, de modo geral, participam da regulação da longevidade em diversos organismos, modulando a resposta celular frente ao *stress* oxidativo e promovendo mecanismo de reparo de DNA, parada do ciclo celular, estabilidade telomérica, senescência e apoptose celulares. O envolvimento das SIRTs no processo tumorigênico tem sido bastante investigado, contudo ainda não existe descrição do estudo desses genes nos adenomas hipofisários. O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão gênica das *SIRT1-7* nos somatotropinomas e adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes (ACNF) e sua relação com o tamanho e a invasividade do tumor. A expressão das sirtuínas foi ainda correlacionada à expressão dos marcadores de senescência *CDKN1A* (p21) e *CDKN2A* (p16) e do proto-oncogene *PTTG* (*pituitary tumor transforming gene*). Foram selecionados 68 pacientes, 37 somatotropinomas e 31 portadores de ACNF. Desses casos, 33 apresentavam tumores invasivos e 35 eram não invasivos. A quantificação do RNAm das *SIRT1-7*, *CDKN1A*, *CDKN2A* e *PTTG* foi realizada nas amostras tumorais pela técnica de PCR em tempo real utilizando o método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A hiperexpressão da *SIRT1* foi observada em 86,5% dos somatotropinomas *versus* 41,9% dos ACNF ($P<0.01$), não sendo observada perda de expressão desse gene. A *SIRT3* foi mais hipoexpressa nos ACNF em relação aos somatotropinomas (77,4% e 40,5%, respectivamente; $P<0.01$). A *SIRT4* foi hipo e hiperexpressa, respectivamente, em 45,2% e 12,9% dos ACNF e 16,2% e 24,3% dos somatotropinomas ($P=0.03$). A hipoexpressão da *SIRT7* também foi maior nos ACNF (67,7%) *versus* somatotropinomas (32,4%; $P=0.01$) e, para ambos os subtipos, o percentual de casos apresentando hiperexpressão desse RNAm foi baixo. O padrão de expressão das *SIRT2* e 5 não diferiu entre os subtipos tumorais e não se mostrou alterado em relação ao *pool* de hipófises normais. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão dos genes das sirtuínas entre os grupos de tumores invasivos e não invasivos. Contudo, a expressão das *SIRT1* e 3 foi relacionada ao tamanho tumoral; nos casos com hiperexpressão da *SIRT1* a média do maior diâmetro tumoral foi 2.4 ± 1.1 enquanto nos pacientes com expressão normal foi de 3.3 ± 1.3 ($P<0.01$). Já os casos com perda de expressão da *SIRT3* apresentaram tumores maiores (3.1 ± 1.2) em relação aos casos com expressão normal (2.2 ± 1.1 ; $P<0.01$). A expressão de todas as SIRTs apresentou correlação positiva moderada (*SIRT1-5,7*) ou forte (*SIRT6*) com a expressão do *CDKN1A*. Uma correlação positiva foi observada também em relação a expressão do *CDKN2A*. Contudo, essa foi fraca e presente apenas para as SIRTs 3-5. Em relação ao *PTTG*, foi observado apenas uma fraca correlação com a expressão da *SIRT1* e *SIRT3*. Em conclusão, esses resultados sugerem que a hiperexpressão de *SIRT1* e a hipoexpressão das SIRTs 3, 4 e 7 podem estar relacionadas ao processo tumorigênico nos somatotropinomas e ACNFs, respectivamente e, em especial as *SIRT1* e 3, ao controle da proliferação celular nesses adenomas.

Descritores: sirtuínas; histona desacetilases; hipófise; adeno-hipófise; repressão epigenética; senescência celular; expressão gênica; neoplasias hipofisárias.

ABSTRACT

Grande IPP. *Gene expression of sirtuins in somatotropinomas and nonfunctioning pituitary adenomas and their relationship with invasiveness* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Sirtuins 1-7 (SIRT) are a highly conserved family of histone deacetylases. In general, these proteins are involved in the regulation of longevity in several organisms, modulating the cellular response to oxidative stress. SIRTs can also regulate DNA repair, telomeric stability, cell senescence and apoptosis. Due to their functions, there is a growing interest in the role of sirtuins in tumorigenesis. However, these genes were not investigated in pituitary tumors so far. In this study, *SIRT1-7* gene expression was evaluated in somatotropinomas and nonfunctioning pituitary adenomas (NFPA) and related to tumor size and invasiveness. *SIRT1-7* expression was also correlated with cellular senescence markers *CDKN1A* (p21) e *CDKN2A* (p16) and with the proto-oncogene *PTTG* (pituitary tumor transforming gene). Sixty-eight patients were selected, 37 with somatotropinomas and 31 with NFPA. Tumor invasion was observed in 33 patients. *SIRT1-7*, *CDKN1A*, *CDKN2A* and *PTTG* mRNA levels was evaluated from pituitary tumor samples by the real-time PCR using $2^{-\Delta\Delta C_t}$ relative quantification. Pronounced differences in *SIRT1*, 3, 4 and 7 expressions were identified between somatotropinomas and NFPA. Overexpression of *SIRT1* was observed in 86.5% of somatotropinomas versus 41.9% of NFPA ($P < 0.01$) whereas underexpression was not detected. *SIRT3* was more underexpressed in NFPA than somatotropinomas (77.4% and 40.5%, respectively, $P < 0.01$). *SIRT4* was under and overexpressed, respectively, in 45.2% and 12.9% of NFPA and 16.2% and 24.3% of somatotropinomas ($P = 0.03$). *SIRT7* underexpression was also higher in NFPA (67.7%) versus somatotropinomas (32.4%; $P = 0.01$) with few cases showing overexpression. *SIRT2* and 5 expressions did not differ between tumors subtypes and was not altered in relation to the normal pituitary gland pool. No statistically significant difference was observed in the expression of these genes between invasive and non-invasive tumor groups. However, *SIRT1* and 3 expressions were related to tumor size. Mean of the largest tumor diameter was 2.4 ± 1.1 and 3.3 ± 1.3 ($P < 0.01$) in adenomas with *SIRT1* over- and normal expression, respectively. On the other hand, cases with *SIRT3* underexpression exhibited larger tumors (3.1 ± 1.2) compared to cases with *SIRT3* normal expression (2.2 ± 1.1 , $P < 0.01$). Moderated (*SIRT1-5.7*) or strong (*SIRT6*) positive correlation was observed between sirtuins and *CDKN1A* expression. A weak correlation was observed with respect to *CDKN2A* expression and *SIRTs* 3-5. Regarding *PTTG* mRNA, only a weak correlation with *SIRT1* and *SIRT3* expression was observed. In conclusion, these results suggest that overexpression of *SIRT1* and underexpression of *SIRTs* 3, 4 and 7 could be related to the tumorigenic process in somatotropinomas and NFPA, respectively. *SIRT1* and 3 could also play a role in control of pituitary adenomas cell proliferation.

Descriptors: sirtuins; histone desacetilases; pituitary gland; adenohipófisis; epigenetic repression; cellular senescence; gene expression; pituitary neoplasms.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 A hipófise

A hipófise é uma pequena glândula, de aproximadamente 1 cm de diâmetro, alojada na sela túrcica do osso esfenóide anterior ao quiasma óptico e abaixo do hipotálamo. De origem embrionária dupla, a hipófise é dividida em três lóbulos funcionalmente e anatomicamente distintos: anterior (adenohipófise), intermediário e posterior (neurohipófise) [Figura 1].

Figura 1- Diagrama de um corte sagital representando estruturalmente a glândula hipofisária e seu entorno. Adaptado de *American Cancer Society – Pituitary Tumors*. Acessado por: <http://www.cancer.org/cancer/pituitarytumors/detailedguide/pituitary-tumors-what-is-pituitary-tumor> em 02 de junho de 2016.

A adenohipófise é derivada da bolsa de Rathke, uma evaginação do ectoderma oral, cujo desenvolvimento está intimamente relacionado com uma complexa rede de fatores de transcrição que levam à diferenciação e proliferação de cinco grupos celulares distintos: os gonadotrofos, os somatotrofos, os lactotrofos, os corticotrofos e os

tireotrofos (1, 2). De forma simplificada, a diferenciação dessas células começa com o fator de transcrição PROP-1 (preditor do fator de transcrição hipofisário-1) que induz o desenvolvimento hipofisário de linhagens específicas de Pit-1 (fator de transcrição hipofisário-1) - os somatotrofos, os lactotrofos e os tirotrofos, bem como dos gonadotrofos. A alta expressão de *GATA-2* restringe a expressão de Pit-1 nos gonadotrofos, induzindo a expressão do fator esteroidogênico (SF-1) e do gene *DAX-1* (reversor sexual dose-dependente localizado no cromossomo X), fatores de transcrição típicos dessas células. Os altos níveis de expressão de receptores de estrogênio (ER) nas células contendo Pit-1 favorece o desenvolvimento do lactotrofos, enquanto a diferenciação dos corticotrofos requer o fator de transcrição T-Pit (fator de transcrição T-box) e NeuroD1 (fator de diferenciação neurogênico 1) [Figura 2] (1, 2).

Figura 2- Representação esquemática da cascata de fatores de transcrição implicados na diferenciação das células da adenohipófise. A estrutura hipofisária primordial, a bolsa de Rathke, surge do ectoderma oral, com subsequente diferenciação das células secretoras de hormônios da glândula madura. Adaptado de: Melmed, S., 2003. **FSH**= Hormônio folículo-estimulante; **LH**= Hormônio luteinizante; **GH**= Hormônio do

crescimento; **PRL**= Prolactina; **ACTH**= Hormônio adenocorticotrófico; **TSH**= Hormônio tireostimulante; **ER**= Receptor de estrogênio; **Otx1**= *Orthodenticle homeobox 1*; **Egr1**= Fator de transcrição de resposta de crescimento precoce 1; **DAX-1**= Reversor sexual dose-dependente localizado no cromossomo X; **SF-1**= Fator esteroideogênico 1; **T-pit**= Fator de Transcrição T-box relacionado a Brachyury (T); **NeuroD1**= Fator de diferenciação neurogênico 1; **Pit-1**=Fator de transcrição hipofisário específico 1; **PROP-1**= Preditor do fator de transcrição hipofisário 1 ; **GATA-2**= Fator de transcrição endotelial.

Cada um dos tipos celulares da adenohipófise é caracterizado pela síntese e secreção de um ou mais hormônios que podem ser classificados em três famílias: os glicoproteicos (hormônio de liberação da tireotrofina – TSH, hormônio folículo-estimulante – FSH e hormônio luteinizante – LH), os hormônios derivados da pró-opiomelanocortina – POMC (hormônio adrenocorticotrófico – ACTH), e os pertencentes à família do hormônio do crescimento (GH) e da prolactina (PRL) (1). Esses hormônios são secretados de maneira pulsátil, em resposta ao estímulo de fatores de liberação hipotalâmicos específicos, e são responsáveis pela regulação da função endócrina de diferentes tecidos alvos que, por sua vez, exercem um controle por retroalimentação a nível hipotalâmico e hipofisários para modular sua função (2, 3).

1.2 Os adenomas hipofisários

Os adenomas hipofisários são encontrados incidentalmente em cerca de 10% da população em geral e compreendem aproximadamente 15% dos tumores do sistema nervoso central (4-6). Esses tumores têm origem monoclonal e, em sua vasta maioria, são de natureza benigna (adenomas). Contudo, podem apresentar diversidade significativa e imprevisibilidade de comportamento biológico (5). Os adenomas hipofisários podem causar morbidade significativa devido a sua localização crítica, tamanho, extensão e produção hormonal hipofisária inadequada (2). Entre os sintomas locais compressivos, pode ocorrer cefaleia, distúrbios visuais, disfunção de nervos

cranianos e/ou alteração na síntese e secreção hormonal decorrente do comprometimento do aporte hormonal hipotalâmico (por compressão da haste hipofisária) ou de falência hipofisária secundária à compressão do tecido hipofisário normal (2).

Clinicamente, os adenomas hipofisários podem ser classificados em funcionantes e não funcionantes, dependendo da sua atividade hormonal (Tabela 1) (6, 7). Os adenomas funcionantes podem ser subdivididos em: secretores de PRL (prolactinomas), secretores de GH (somatotrofinomas), secretores de hormônio ACTH (corticotrofinomas), secretores de hormônio TSH (tireotrofinomas) e secretores de GH e LH (gonadotrofinomas), bem como bi-hormonais produtores de PRL e GH (mamosomatotrofinomas) (2, 6). Já os adenomas clinicamente não funcionantes (ACNF) não apresentam quadro clínico de hipersecreção hormonal. No entanto, a análise *in situ* desses tumores demonstra a presença de grânulos secretórios com conteúdo hormonal variado, que não são acompanhados de secreção hormonal ou essa é tão pequena que não causa elevação dos níveis hormonais circulantes, sendo esses chamados de adenomas silenciosos. Uma minoria dos ACNF não apresenta evidência de produção hormonal pela imuno-histoquímica e são classificados como adenomas *null cells* (6).

Tabela 1. Classificação clínico-patológica e frequência dos adenomas hipofisários.

Tipo Tumoral	Tipo Celular	Hormônio	Frequência
Corticotrofinoma	corticotrofos	ACTH	10-15%
Somatotrofinoma	somatotrofos	GH	10-15%
Lactotrofinoma	lactotrofos	PRL	35%
Mamosomatotrofinoma	lactotrofos/ somatotrofos	PRL/GH	5%
Tireotrofinoma	tireotrofos	TSH	2%
Gonadotrofinoma	gonadotrofos	FSH/LH	13%
Adenoma clinicamente não funcionante	corticotrofos/ somatotrofos/ lactotrofos/ tireotrofos/ gonadotrofos/ <i>null cells</i>	-	25-30%

ACTH= Hormônio adenocorticotrófico; **PRL**= Prolactina; **GH**= Hormônio do crescimento; **LH**= Hormônio luteinizante; **TSH**= Hormônio tireoestimulante; **FSH**= Hormônio folículo-estimulante.

Ainda, os adenomas hipofisários podem ser classificados de acordo com o seu tamanho em microadenomas (dimensão < 1 cm), macroadenomas (dimensão ≥ 1 cm) e adenomas gigantes (> 4 cm) (8, 9) e quanto ao grau de invasão e extensão parassellar (sistema de classificação de Knosp, Figura 3).

Figura 3- Sistema de classificação de Knosp, usado para quantificar a invasão do seio cavernoso, em que apenas os graus 3 e 4 representam invasão verdadeira do tumor para o seio cavernoso. Grau 0, sem envolvimento com o seio cavernoso; Grau 1, tumor direcionado para a parede medial do seio cavernoso, mas não ultrapassa a linha hipotética que se estende entre os centros dos dois segmentos das artérias carótidas internas; Grau 2, tumor ultrapassa o limite do grau 1, mas não se estende adiante da linha tangencial às margens laterais das artérias; Grau 3, tumor se estende lateralmente para a carótida interna dentro do seio cavernoso; Grau 4, envolvimento total da carótida interna intracavernosa. Adaptado de: Antonio Di Ieva et. al, 2014 (10) .

O grau de invasão é o principal fator determinante da eficácia terapêutica e prognóstico nos adenomas hipofisários, o que inclui a evolução pós-operatória do tumor residual, taxa de remissão/recorrência e sobrevida do paciente (11).

Apesar da maioria dos adenomas hipofisários não levar a metástases à distância, 5- 35% são invasivos, estendendo-se para tecidos locais, incluindo seio cavernoso, seio esfenoidal, órbita e clivus (12-14). As razões para essas diferenças no comportamento tumoral são pouco compreendidas, e não existem, até o momento, mecanismos confiáveis para prever a invasibilidade tumoral. Vários biomarcadores têm sido investigados, incluindo alterações cromossômicas e microRNAs, marcadores de proliferação, oncogenes, genes supressores tumorais, fatores de crescimento e seus receptores e fatores relacionados a angiogênese e adesão celular. Entretanto, ainda não foi encontrado nenhum biomarcador capaz de prever, independentemente, o comportamento agressivo nos adenomas hipofisários (15). Contudo, a caracterização molecular desse processo é crucial na compreensão do comportamento tumoral, possibilitando alterar a estratégia da cirurgia, radioterapia e terapia medicamentosa pós-operatória, e também avaliar a taxa de recorrência.

1.3 Senescência Celular

Um importante mecanismo que vem sendo proposto para o controle da progressão tumoral, incluindo dos adenomas hipofisários, é a senescência celular [Figura4] (16). Assim como os processos de ciclo celular, apoptose e diferenciação terminal, a senescência também faz parte de uma complexa rede sinalizadora, cuja estrutura ainda é desconhecida, tornando-a um potencial alvo na fronteira da pesquisa

em biologia celular e molecular, embora muitas vias de sinalização tenham sido descritas nos últimos anos (17).

Figura 4. Modelo hipotético da tumorigênese hipofisária. Adaptado de Melmed, 2011, Nat Rev Endocrinol (18).

A senescência celular é vista como um mecanismo para restringir o crescimento celular quando ele é desnecessário ou até mesmo perigoso, como, por exemplo, na formação do câncer. O ciclo celular é dividido em quatro estágios: G1 (*Gap 1*), S (síntese), G2 (*Gap 2*) e M (mitose) e, cada vez que um ciclo é completado, a célula pode sofrer um novo processo de divisão, quando exposta à estímulos mitogênicos adequados, ou entrar em uma fase não replicativa denominada G0 (*Gap 0*) (5, 16). A fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb), mediada pelas CDK4 ou CDK6 (ciclina-quinase-4 e ciclina-quinase-6, respectivamente), leva a liberação do fator de transcrição E2F (*E2 family*) dando início à fase S do ciclo celular (16).

Duas famílias homólogas de inibidores de quinases ciclina-dependentes (CKIs) são capazes de conter a fosforilação da Rb: INK4 (Inibidor de quinase ciclina-

dependente 4) (6, 16) e Cip/Kip (*CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein*) (19), levando a parada do ciclo. Os membros da família INK4, ou seja, p15, p16, p18, e p19 inibem especificamente a atividade de CDK4 e CDK6, enquanto os membros Cip/Kip, isto é, p21, p27 e p57 inibem um espectro mais amplo de complexos de ciclina-CDK [Figura 5] (20).

Figura 5- Resumo das vias moleculares da senescência. Adaptado de Muñoz-Espin, 2014 (21). **DDR**= receptor do domínio discoidina; **p53**= Proteína supressora tumoral 53; **p21**= Inibidor de ciclina quinases-dependentes 21; **p16**= Inibidor de ciclina quinases-dependentes 16; **p15**= Inibidor de ciclina quinases-dependentes 15; **p27**= Inibidor de ciclina quinases-dependentes 27; **p38**= proteína quinase 38; **RAS**= Família de proto-oncogenes; **MYC**= Pro-oncogene da *myelocytomatosis*; **PI3K**= fosfoinositídeo 3-quinase; **TGFβ**= fator de transformação do crescimento-β; **ARF**= fator 1 de ribosilação do ADP; **SMAD**= Proteína homóloga *Mothers against decapentaplegic*.

Sabe-se que células senescentes apresentam maior atividade de p53 e de p21, alvo direto da p53 (22). Além disso, o *PTTG*, cujas alterações são as mais marcantes observadas nos adenomas hipofisários, pode promover a transcrição de p53 que, por sua vez, estimula a expressão de p21 em situações de estresse celular, sendo o p21 capaz de controlar o crescimento tumoral e impedir a transformação maligna em determinados

tecidos, incluindo o hipofisário (23). Além desses marcadores, a expressão da p16 apresenta-se baixa em células jovens ou quiescentes, enquanto que em células senescentes seus níveis aparecem elevados em diferentes tipos celulares (24-27). Diversos estudos verificaram a atividade supressora tumoral da p16, evidenciando a presença de sua forma mutada em diferentes tipos de cânceres humanos tais como: câncer de pulmão, rim, cérebro, melanoma, glioma, leucemia, câncer de bexiga e ovariano (16).

Recentemente, o trabalho de Manojlovic-Gacic e colaboradores, 2106 (28), avaliou a expressão imunohistoquímica de p16 e p21 e de β -galactosidase lisossomal associada a senescência (SA- β -GAL) em 345 amostras de adenomas hipofisários, comparando-as com amostras de hipófise normal. Em geral, SA- β -GAL mostrou-se com uma expressão elevada nos adenomas hipofisários, quando comparados com amostras normais, sendo os somatotrofinomas o tipo tumoral que apresentou maior expressão. Já os níveis de expressão de p21 apresentaram-se mais baixos em todos os subtipos tumorais, exceto para os somatotrofinomas. A expressão de p16 foi significativamente menor nos adenomas hipofisários, sem diferenças relacionadas ao tipo tumoral.

Compartilhando do mesmo objetivo, Alexandraki et al., 2012 (29), comparou 41 amostras de adenomas hipofisários (6 carcinomas e 7 tecidos hipofisários normais) quanto ao nível de expressão proteica dos marcadores p16, p21 e β -galactosidase e, adicionalmente, avaliou a expressão gênica de *CDKN1A* (p21) e *CDKN2A* (p16) em outras 12 amostras de adenomas hipofisários (6 GH e 6 ACNF). Em se tratando da expressão da β -galactosidase, esta se mostrou significativamente aumentada nos

somatotropinomas ($P = 0,002$), ACNFs ($P = 0,04$), macroadenomas ($P = 0,03$) e carcinomas ($P = 0,02$) quando comparadas com o tecido hipofisário normal.

Já a expressão proteica de p16 foi significativamente menor em todos os tumores, tanto adenomas quanto carcinomas. Adicionalmente, a expressão quantitativa de *CDKN2A* nos ACNFs (5.47 ± 11.7) mostrou-se significativamente reduzida ($P=0.05$) em relação ao tecido de hipófise normal (11.1 ± 7.7), enquanto que para os somatotropinomas a diferença de expressão não atingiu significância estatística. Por fim, em termos de p21, foi observada uma menor expressão dessa proteína nos ACNFs quando comparada aos somatotropinomas. Complementarmente, a análise quantitativa mostrou que a expressão de *CDKN1A* nos ACNFs (1.32 ± 0.83) foi significativamente menor ($P=0.04$) do que no tecido de hipófise normal (4.21 ± 2.84) (29).

Esses achados sugerem fortemente alterações no mecanismo de senescência celular nos diferentes tipos de adenomas hipofisários, sendo a ativação desse processo uma possível explicação para o seu comportamento benigno, especialmente para os somatotrofinomas (28, 29).

Vários estudos têm demonstrado que as sirtuínas atuam como um sensor metabólico celular, estando envolvidas no controle da progressão do ciclo celular, na decisão de sobrevivência ou apoptose da célula, na longevidade, entre outras funções. A hiperexpressão da *SIRT1* estimula a proliferação e previne a senescência em vários tecidos, sendo que o nível de RNA mensageiro e proteico de *SIRT1* diminui gradativamente durante este processo (30). Ainda, a depleção da *SIRT6*, uma das sirtuínas que pode estar associada a regiões heterocromáticas e ao nucléolo, leva a senescência celular prematura devido à disfunção telomérica e a fusão das extremidades cromossômicas (31, 32).

1.4 Regulação epigenética e as sirtuínas

Apesar de bastante estudados, os mecanismos genéticos e moleculares da tumorigênese hipofisária ainda permanecem obscuros, principalmente nos casos de origem esporádica (6). A ocorrência de mutações nesses tumores é extremamente rara, sendo as mutações nos gene *GNAS1* (Gene de ligação guanina-subunidade- α 1), presentes em somatotrofinomas, e a hiperexpressão do gene *PTTG* (Gene transformador de tumor hipofisário), as alterações mais significativas observadas na progressão desses adenomas. Ainda, as mutações em proto-oncogenes e supressores tumorais clássicos parecem não exercer um papel importante no seu desenvolvimento. Contudo, existem evidências que sugerem fortemente que a atuação de mecanismos epigenéticos pode exercer grande influência no surgimento dos adenomas hipofisários (33).

A epigenética envolve o estudo das características dos organismos que são estáveis ao longo de diversas divisões celulares, mas que não envolvem mudanças na sequência de DNA (ácido desoxiribonucleico). A epigenética está relacionada, na maioria das vezes, com o controle da expressão gênica (gene ativo versus inativo), mas também tem papel crucial no silenciamento de sequências não codificantes, como por exemplo, retrotransposons e sequências de DNA repetitivas, garantindo a estabilidade genômica (34). Atualmente, as modificações epigenéticas descritas na literatura incluem as alterações covalentes nas bases de DNA (mais comumente a metilação das citosinas) e a modificação dos resíduos de lisina que compõem as histonas (34).

Nos adenomas hipofisários, as alterações epigenéticas mais descritas envolvem a alteração no estado de metilação das ilhas CpG (dinucleotídeo citosina-fosfatase-guanina) que levam a expressão aberrante de genes envolvidos no controle do ciclo celular, fatores de transcrição e membros de importantes vias de transdução de sinal nas

células hipofisárias (33). Os processos que envolvem modificações nas histonas ainda são pouco estudados nos adenomas hipofisários. Assim, o estudo de genes envolvidos nesse processo, como as sirtuínas, poderia ser bastante informativo, uma vez que essas proteínas também participam do processo biológico do envelhecimento e a incidência deste tipo tumoral aumenta com a idade cronológica.

As sirtuínas pertencem a família de proteínas com atividade de desacetilases de histonas (HDAC) que dependem do dinucleotídeo de nicotinamina e adenina (NAD^+) como cofator (35). As histonas são proteínas globulares geralmente classificadas em cinco tipos: histonas H1 (proteína histona 1), H2A (proteína histona 2A), H2B (proteína histona 2B), H3 (proteína histona 3) e H4 (proteína histona 4). A unidade estrutural da cromatina é o nucleossomo, composto por um octâmero de histonas, cada um contendo duas unidades das variantes H2A, H2B, H3 e H4, envolto por molécula de DNA (Figura 6), sendo a histona H1 responsável pela estabilização do nucleossomo (34). Uma gama de enzimas modificadoras de histonas são responsáveis por uma multiplicidade de alterações pós-transcricionais em aminoácidos específicos (lisinas, serinas e tirosinas) na porção amino-terminal (N-terminal) das histonas.

A acetilação, fenômeno mediado pelas acetil-transferases (HAT) e que ocorre principalmente nos resíduos de lisina, é um mecanismo epigenético que resulta na abertura da estrutura da cromatina e, conseqüentemente, permite o recrutamento de fatores de transcrição, ativando a transcrição gênica (Figura 6a). Ao contrário das acetil-transferases, as HDACs têm efeito oposto removendo grupos acetila dos resíduos de lisina dentro de promotores específicos o que leva ao silenciamento gênico (Figura 6b) (36).

Figura 6- Representação esquemática do nucleossomo e da regulação gênica mediada pela acetilação de histonas. **a)** A adição de um radical acetil pela HAT é capaz de alterar a covalência dos resíduos de lisinas localizados nas caudas das histonas removendo sua carga positiva e diminuindo a afinidade entre essas proteínas e o DNA, resultando na abertura da estrutura da cromatina o que permite o recrutamento de fatores de transcrição dando início à transcrição. **b)** Inversamente, as HDACs são capazes de remover o radical acetil adicionado à lisina, levando à condensação da cromatina e, consequentemente, ao silenciamento gênico. **HAT**= Acetilases de histonas; **HDAC**= Desacetilases de histonas.

Em mamíferos, são descritas sete proteínas sirtuínas (SIRT 1-7). As SIRTs são homólogas do "silent information regulator 2 (Sir2)" de *Saccharomyces cerevisiae*, o qual recebeu este nome pela sua capacidade de ativar a expressão gênica. As proteínas sirtuínas são altamente conservadas, tanto funcionalmente quanto estruturalmente, e estão presentes em diversos organismos desde bactérias aos seres humanos (36). Essas proteínas contêm um domínio catalítico e um domínio de ligação ao NAD altamente conservados, denominados domínio central das sirtuínas, mas diferem em sua porção N- (amino) e C- (carboxi) terminal (35, 37).

As SIRTs apresentam várias funções e são encontradas em diferentes localizações celulares: a SIRT1, 6 e 7 são predominantemente nucleares enquanto a SIRT2 está localizada principalmente no citoplasma e as SIRTs 3, 4 e 5 são mitocondriais. Algumas SIRTs podem ser realocadas em função do tipo de célula ou tecido, estágio do desenvolvimento, estado metabólico e condições de estresse, sugerindo que sua localização é um importante regulador de sua função (Tabela 2).

As sirtuínas têm sido intensivamente estudadas nos processos de envelhecimento celular e nas doenças metabólicas, sendo demonstrado que desempenham um importante papel no controle de vias de sinalização celular cruciais, tais como reparo do DNA, inflamação, apoptose e proliferação celulares (36). Ainda, um número crescente de evidências sugerem que as sirtuínas podem estar diretamente implicadas na tumorigênese agindo ou como supressor tumoral ou oncogene, dependendo do contexto celular e do tipo de tumor (36, 38) Tabela 2. De todas as sirtuínas, as SIRT1, 3 e 6 são as mais estudadas e as que se encontram melhor caracterizadas, enquanto as outras SIRTs apresentam um número menor de trabalhos realizados (36, 38).

Tabela 2 – Membros da família das sirtuínas em humanos, função e associação ao câncer.

Proteína	Localização intracelular	Atividade	Função	Associação à neoplasia
SIRT1	Núcleo e citoplasma	Desacetilase	Metabolismo de glicose, ácidos graxos e colesterol, diferenciação, secreção de insulina e neuroproteção	Leucemia mielóide aguda, câncer de cólon, tumores de pele, de bexiga, câncer de ovário e próstata e gliomas - media a função de p53
SIRT2	Citoplasma	Desacetilase	Controle do ciclo celular, desacetilação	Glioma - controle da progressão do ciclo celular
SIRT3	Mitocôndria	Desacetilase	Produção de ATP, desacetilação de proteínas mitocondriais, oxidação de ácidos-graxos	Câncer de mama - aumento dos níveis de ROS
SIRT4	Mitocôndria	ADP ribosiltransferase	Secreção de insulina	Câncer de mama - alteração no metabolismo
SIRT5	Mitocôndria	Desacetilase	Ciclo da uréia	Câncer de mama e pâncreas -alteração no metabolismo
SIRT6	Núcleo	Desacetilase/ ADP ribosiltransferase	Reparo de DNA, função telomérica	Câncer de cólon e de mama - media função de NFxB e GCIP
SIRT7	Nucléolo	Desacetilase	Transcrição via RNA polimerase I	Câncer de mama - media função da p53

ADP= Adenosina difosfato; **ATP**= Adenosina trifosfato; **DNA**= Ácido desoxiribonucleico; **GCIP**= Proteína de interação Grap2 e Ciclina D1; **LMA**= Leucemia mielóide aguda; **NFxB**= Fator Nuclear x de células β ; **RNA**= Ácido Ribonucleico; **ROS**= Espécies reativas de oxigênio; **SUP**= Atividade supressora tumoral da sirtuína; **ONCO**= Atividade oncogênica da sirtuínas.

1.4.1 A Sirtuína 1

O envolvimento da SIRT1 no processo tumorigênico tem sido bastante investigado e discutido, contudo seu papel no desenvolvimento dos tumores malignos e adenomas ainda é bastante controverso, existindo trabalhos que sugerem que SIRT1 atua como um oncogene e outros como supressor tumoral (39). A primeira evidência que sugere que a SIRT1 possa funcionar como um oncogene foi a observação de que esta proteína desacetila o resíduo de lisina 388 (Lys388) da p53 reprimindo sua atividade transcricional. A p53 é um dos mais representativos substratos para a SIRT1 e, sendo um supressor tumoral clássico, a diminuição da sua função pode induzir a tumorigênese (40, 41). A SIRT1 também desacetila os supressores tumorais PTEN (proteína fosfatase homóloga a tensina) (42) e Rb (proteína do retinoblastoma) (43), reprimindo suas funções.

A ativação da SIRT1 está também relacionada à hiperexpressão de proto-oncogenes. A desacetilação SIRT1-dependente de proteínas oncogênicas como c-Myc (*myelocytomatosis*) e Akt (*Protein kinase B*) pode aumentar sua estabilidade e promover a proliferação celular (44, 45). A SIRT1 confere ainda vantagem de sobrevivência ao tumor pela regulação positiva de proteínas envolvidas na migração celular, tais como Dvls (*dishevelled*, participa da via de sinalização da Wnt) (46) e cortactina (*F-actin binding protein*) (47). Foi demonstrado que o silenciamento da SIRT1 restaura a adesão célula-célula e reduz a invasividade em células cancerosas (39).

Como supressor tumoral, a SIRT1 inativa HIF1- α (Fator indutor de Hipóxia) inibindo a vascularização e protegendo contra a formação e o crescimento do tumor (48). A SIRT1 pode também, interagir e inibir, diretamente, a ação de agentes pró-inflamatórios que promovem a formação e a progressão do tumor, tais como o NF- κ B

(fator nuclear $\kappa\beta$), STAT3 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3) e AP-1 (proteína ativadora 1) (39). Além disso, a sirtuína nuclear está envolvida na manutenção da estabilidade genômica pela desacetilação de proteínas de reparo do DNA como a PARP1 (Poli ADP-ribose Polymerase- 1), XPC (*xeroderma pigmentosum* complementação grupo C) e WRN (proteína da síndrome de Werner) (39). Ainda, a hiperexpressão de SIRT1 no intestino de murinos reduz a incidência de câncer de cólon. Neste modelo animal, foi demonstrado que a SIRT1 desacetila a β -catenina e inibe seu acúmulo no núcleo o que leva a hiperativação da β -catenina e a formação de tumores (49). Estes dados apontam que a SIRT1 pode atuar tanto como oncogene quanto supressor tumoral. Contudo, o exato efeito molecular da SIRT1 pode variar entre os diferentes tecidos e/ou tipos de tumores.

Figura 7. Representação intracelular das proteínas moduladas por SIRT1. Adaptado de Song e Surh, 2012. **SIRT1**= Sirtuína 1; **Rb**= Proteína do retinoblastoma; **MYC**= Proto-oncogene da *myelocytomatosis*; **AP-1**= Proteína ativadora 1; **STAT3**= Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3; **XPC**= Xeroderma pigmentoso complementação grupo C; **PARP1**= Poli ADP-ribose Polymerase-1; **WRN**= Proteína da síndrome de Werner;

Nf- κ B= Fator nuclear kappa β **Akt**= Serina/treonina quinase 1; **Dvl**s= *Dishevelled*, participa da via de sinalização da Wnt; **p53**= Proteína supressora tumoral 53; **PTEN**= proteína fosfatase homóloga a tensina.

1.4.2 A Sirtuína 2

Encontrada primariamente no citoplasma, a SIRT2 está co-localizada com redes de microtúbulos e pertence à classe de enzimas que atuam na desacetilação das histonas ou na atividade da mono-ribosiltransferase. Especificamente, SIRT2 interrompe a divisão celular, impedindo o desenvolvimento da mitose. Vários estudos demonstraram que, quando hiperexpressa, SIRT2 atua como um “checkpoint” da fase G2/M, impedindo a condensação da cromatina em resposta ao estresse mitótico (36, 50-52). A perda de expressão da SIRT2 é observada nos gliomas humanos, fator que pode comprometer o “checkpoint” mitótico contribuindo para a instabilidade genômica e formação de tumores (36, 51-54). No entanto, Li et al., 2011, estudando a expressão da SIRT2 em linhagens de células tumorais observaram a indução da morte celular em massa. Assim, esses autores concluíram que a regulação negativa de SIRT2 induz a apoptose através da ativação de p38 MAPK, seguido da regulação negativa de p300 e MDM2 (Fosfoproteína Humana homóloga ao gene Murino Duplo minuto-2), ambos levando ao acúmulo de p53.

1.4.3 A Sirtuína 3

A SIRT3, primordialmente mitocondrial, teve sua primeira atuação demonstrada como uma acetilase pela interação com o substrato acetyl-CoA synthetase-2 (ACSS2). Mais tarde, confirmou-se que SIRT3 é responsável pela regulação global da acetilação das lisinas mitocondriais como a Lys 642 (36, 38).

Por ser o principal sítio para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), substâncias responsáveis pela ocorrência do estresse oxidativo, a mitocôndria é indispensável no desenvolvimento da vida saudável e no processo de envelhecimento (52), sendo a SIRT3 um importante regulador desse mecanismo (55). SIRT3 é capaz de inibir a síntese de ROS pela mitocôndria, reduzindo, assim, a ocorrência de possíveis danos ao DNA e consequente instabilidade genômica (Figura 8a), fator que sugere seu papel como importante supressor tumoral, uma vez que estes fenômenos podem influenciar diretamente na iniciação da tumorigênese. Ao suprimir a síntese de ROS, SIRT3 inibe paralelamente uma importante cascata de sinalização resultando na estabilização e ativação da proteína HIF-1 α , assim como na ativação de alvos transcricionais que promovem a glicólise aeróbica, a angiogênese e a progressão tumoral (Figura 8b) (55).

A hipótese de que SIRT3 é um potencial supressor tumoral *in vivo* é, ainda, embasada pelos resultados mostrados por Kim et al., 2010 (56), que apontaram a expressão diminuída do RNAm *SIRT3* em amostras de neoplasias maligna de mama e em vários outros tumores incluindo tumor testicular, glioblastoma, próstata, cabeça e pescoço. Recentemente, foi relatado que pelo menos uma cópia do gene *SIRT3* é eliminada em 20% de todos os tumores humanos e 40% dos cânceres de mama e ovário (53, 57). Lombard et al., 2007, demonstraram que murinos com deficiência em SIRT3 apresentaram hiperacetilação de numerosas proteínas mitocondriais, incluindo a enzima metabólica GDH (glutamato desidrogenase), fundamental para o estabelecimento da homeostasia e modulação do ciclo de Krebs (53).

Figura 8- Representação da atividade moduladora de SIRT3 na mitocôndria. Adaptado de Bell et al., 2011 (55). **ROS**= Espécies reativas de oxigênio; **SIRT3**= Sirtuína 3; **HIF**= Fator indutor da hipóxia; **HRE**= Elemento de resposta hormonal; **RNA_m**= RNA mensageiro.

1.4.4 As Sirtuínas 4 e 5

As SIRT4 e SIRT5 também são sirtuínas mitocondriais e pouco se sabe sobre seu envolvimento com a tumorigênese. Porém, assim com a SIRT3, exercem certa ação na regulação do metabolismo oxidativo e apoptose (51). A SIRT4 é encontrada em diversos tecidos, fator que sugere seu papel nas funções metabólicas e, curiosamente, sua expressão implica no aumento dos níveis proteicos de SIRT1, sugerindo, ainda, a existência de uma integração metabólica entre as sirtuínas (36). Apesar de não

apresentar relevância nas funções reguladoras da mitocôndria como a SIRT3, a SIRT4 tem maior importância no metabolismo desta organela. (58) mostraram que a inibição de SIRT4 aumenta a capacidade oxidativa de lípidos no fígado, assim como a atividade mitocondrial nos músculos. Esses resultados podem ser benéficos para o tratamento de inúmeras doenças metabólicas.

A SIRT5 tem o seu papel relatado na regulação do ciclo da ureia, através da sua interação com o substrato Carbamildifosfato Sintetase-1 (CAPS1) (36, 38). Além disso, SIRT5 foi identificada como sendo a responsável pela desacetilação e regulação do Citocromo C, componente fundamental no transporte da cadeia de elétrons pela mitocôndria e, portanto, sugere-se que SIRT5 poderia estar relacionada com a regulação da apoptose (36, 50, 51).

1.4.5 A Sirtuína 6

A SIRT6 é uma proteína que está associada à cromatina (59) e tem por função realizar a manutenção da integridade genômica das células por meio da proteção e reparo da molécula de DNA. Para isso, supõe-se que SIRT6 atrase a progressão do ciclo celular, permitindo que haja maior tempo para a ocorrência do reparo do ácido nucléico (36, 59). Os efeitos causados pela deficiência de SIRT6 foram analisados em camundongos *SIRT6* ^{-/-} sendo observado que o crescimento das linhagens celulares obtidos desses animais foi mais lento em relação às linhagens tipo selvagem e desenvolveram fenótipos agudos característicos do processo de envelhecimento celular (59). Foi descrito ainda que a SIRT6 gera depleção das estruturas cromossômicas anormais levando a um prematuro estado de senescência celular e que sua hiperexpressão foi capaz de induzir a apoptose de uma grande variedade de linhagens

celulares de câncer deixando os tecidos normais intactos (31, 32). A constatação de que a SIRT6 atua em fenômenos relevantes para o desenvolvimento de neoplasias, tais como: metabolismo, estabilidade genômica e senescência celular, levou diversos grupos a estudarem o papel da SIRT6 no câncer. Assim, um compilado de estudos demonstrou que SIRT6 desempenha um papel tanto como supressor tumoral, quanto como oncogene (Figura 9) (60), podendo ser considerada um alvo em potencial de grande importância para o tratamento de tumores e outras doenças relacionadas ao envelhecimento.

Figura 9- Representação da modulação proteica mediada pela SIRT6. Níveis reduzidos de SIRT6 foram relatados em câncer de cólon (CC), carcinoma hepatocelular (HCC), câncer de pâncreas (PAC) e carcinoma de células escamosas de pescoço (CECP). SIRT6 atua como supressor tumoral através das vias: HIF1- α e atividade da transcrição de MYC, o que diminui a glicólise e a proliferação celular; inibição do fator anti-apoptótico survivina; ativação das vias de apoptose p53 e p73. Além disso, SIRT6 reprime SREBP1 e 2 e a atividade de JUN, resultando na redução da lipogênese e *insulin-IGF-1-like signaling* (IIS), ambos processos estão ligados à proliferação celular em tumores. Por outro lado, níveis elevados de SIRT6 foram reportados em câncer de mama (BC), PAC e câncer de próstata (PRC) e também estão relacionados à resistência

medicamentosa e mau prognóstico da doença. A hiperexpressão de SIRT6 é capaz de promover a proliferação celular através da desacetilação das proteínas que controlam o ciclo celular como FoxO3- α e p53, assim como aumentar a IL-8 e as respostas inflamatórias mediadas por TNF, angiogênese e metástase. Adaptado de Zwaans et al., 2014 (60). **MYC**= Pro-oncogene da *myelocytomatosis*; **IL-8**= Interleucina-8; **TNF**= fator de necrose tumoral; **TRPM2**= Membro 2 da subfamília M de Canais Potencial receptor transiente; **p53**= Proteína supressora tumoral 53; **p73**= Proteína supressora tumoral 73; **FoxO3 α** = *Forkhead box O3- α* ; **HIF1- α** = Fator indutor de hipóxia 1; **Ac**= Grupo acetil; **SREBP1/2**= Proteína ligadora do elemento regulatório de esterol 1 e 2; **JUN**= Componente do fator de transcrição AP-1.

1.4.6 A Sirtuína 7

Entre todas as sirtuínas, a SIRT7 foi a última da família a ser estudada. Em seus estudos Ford et al., 2006 (61) demonstraram que a expressão de SIRT7 está altamente associada com a atividade do RNA, sendo, portanto, um regulador positivo do processo de transcrição. Assim, uma deficiência na SIRT7 leva a proliferação celular e desencadeia a apoptose. Vakhrusheva et al., 2008 descobriram que, *in vitro*, a SIRT7 interage desacetilando a p53, fator que corresponde a hiperacetilação da p53 *in vivo* e ao aumento das taxas de apoptose no miocárdio de camundongos *knockout* (62). Em adição, cardiomiócitos primários que apresentavam deficiência da SIRT7 mostraram um aumento de 200% dos níveis de apoptose basal juntamente com uma diminuição expressiva da resistência ao estresse oxidativo, sugerindo que a SIRT7 também desempenha um papel na regulação da oxidação (62). Em resumo, SIRT7 provavelmente permite que as células mantenham vias metabólicas críticas pela inibição da proliferação celular em resposta as situações de estresse. Entretanto, o exato mecanismo de desacetilação que envolve a SIRT7 ainda não está completamente estabelecido (36).

1.4.7 O papel das sirtuínas na hipófise

Até o momento, não existem estudos sobre as sirtuínas nos adenomas hipofisários. No entanto, foi demonstrado que a SIRT1 exerce um papel no controle do eixo endócrino central hipotálamo e hipófise. Camundongos *SIRT1*^{-/-} seletivamente inativados no cérebro exibem baixos níveis de hormônio de crescimento (GH) no soro (63). Aparentemente, o mecanismo pelo qual SIRT1 suprime a síntese de GH nos somatotrofos hipofisários inclui a inativação da cascata da via cAMP (Monofosfato de adenosina cíclico) (64). A SIRT1 também regula positivamente a secreção do TSH pela desacetilação do fosfatidilinositol 4-fostato (PIP4), que é crucial para a exocitose do TSH das células hipofisárias (65).

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Primário

- Avaliar a expressão gênica das *SIRT1-7* nos somatotropinomas e adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes (ACNF) e sua relação com a invasividade e tamanho tumoral.

2.2 Secundários

- Avaliar a correlação entre a expressão das *SIRT1-7* com a expressão dos marcadores de senescência celular *CDKN1A* (p21) e *CDKN2A* (p16);
- Avaliar a correlação entre a expressão das *SIRT1-7* com a expressão do *PTTG*.

3 METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 Coorte

Foram selecionados 68 pacientes portadores de tumor hipofisário acompanhados no serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e da divisão de Neurocirurgia Funcional/IPq (HC-FMUSP). Todos os pacientes foram submetidos à cirurgia transesfenoidal para retirada do tumor do qual foi obtida uma amostra na ocasião da cirurgia e imediatamente congelada e estocada em nitrogênio líquido. Todos os pacientes tiveram diagnóstico confirmado de adenoma hipofisário pelo exame anatomopatológico.

O presente estudo foi realizado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa (nº CAAE 55716116.2.0000.0068). Todos os participantes foram esclarecidos quanto aos objetivos e procedimentos desse estudo e assinaram Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) [Anexo A].

3.2 Análise clínica, laboratorial, anatomopatológica e de imagem

3.2.1 Análise clínica

Características como sexo e idade ao diagnóstico foram obtidas por revisão dos prontuários eletrônicos. Foram coletados também dados referentes a avaliação hormonal (GH, IGF-1, ULNR-IGF1) para os pacientes portadores de somatotropinomas no pré-operatório pelo portal de exames HCMED do HCFMUSP.

3.2.2 Avaliação laboratorial

As dosagens hormonais são exames de rotina e foram realizadas pelo Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42 do HCFMUSP.

3.2.3 Avaliação imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica para a detecção dos hormônios hipofisários GH, PRL, FSH, LH, TSH e ACTH são procedimentos de rotina e foram realizados pelo serviço de Patologia da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP.

3.2.4 Avaliação de imagem

Dados referentes às imagens radiológicas dos adenomas foram coletados pela análise das ressonâncias de sela túrcica dos pacientes realizadas de rotina no Instituto de Radiologia (InRad) do HCFMUSP. O maior diâmetro tumoral foi determinado para cada tumor e estes foram classificados em microadenomas (<1 cm) e macroadenomas (≥ 1 cm). Invasão foi considerada quando houve extensão do adenoma para o seio cavernoso, baseado na classificação de Knosp (graus 3 ou 4) (11), e/ou seio esfenoidal (evidências de erosão do assoalho selar e ou penetração tumoral para o interior do seio esfenoidal).

3.3. PCR quantitativo em tempo real

3.3.1 - Extração de RNA

De cada fragmento tumoral coletado foram obtidos cortes histológicos congelados de 6 μ m em micrótomo criostato e corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise microscópica da morfologia celular. Foram utilizadas peças com confirmação de transformação neoplásica em pelo menos 90% do tecido coletado. Para extração de RNA foi utilizado o sistema comercial de extração de ácidos nucleicos por coluna de adsorção *All Prep DNA/RNA Kit*® (Qiagen, Venlo, GER), seguindo o protocolo do fabricante. Para tal, foram utilizados cerca 20 mg de tecido tumoral aos

quais foram adicionados 600 µl de tampão de lise RLT e pulverizados em moinho de esferas *Tissue Lyzer LT*® (Qiagen, Venlo, GER) por 2 min/50 rpm.

Após homogeneização, o lisado foi centrifugado por 3 min a velocidade máxima. O sobrenadante foi transferido para a coluna de DNA *AllPrep* e centrifugado por 30 sec/10.000 rpm. A coluna de DNA *All Prep* foi reservada e ao líquido recolhido foram adicionados 600 µl de etanol 70% e, após misturada por pipetagem, a amostra foi transferida para a coluna *RNeasy* e centrifugada por 15 sec/10.000 rpm. A coluna *RNeasy* foi lavada com 700 µl de tampão RW1 e centrifugada por 15 sec/10.000 rpm. O líquido recolhido foi descartado e a coluna foi lavada com 500 µl de tampão RPE e centrifugada por 15 sec/10.000 rpm. A lavagem com tampão RPE foi repetida e a coluna *RNeasy* foi centrifugada por 2 min/10.000 rpm. A coluna *RNeasy* foi então transferida para um tubo coletor de 1.5 mL e foram adicionados 35 µl de água livre de RNase diretamente na membrana da coluna. A coluna *RNeasy* foi incubada por 1 min e centrifugado por 1 min/10.000 rpm para eluição do RNA. Todos os tampões de lise, lavagem e eluição foram fornecidos pelo fabricante.

As amostras de RNA extraídas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-100 (*NanoDrop, Thermo Fisher Scientific Inc.*) e foram consideradas de pureza satisfatória aquelas com razão 260/280 de aproximadamente 2,0. As amostras de RNA foram ainda denaturadas (15 min a 56°C) e submetidas à corrida eletroforética em gel agarose 1% a fim de verificar sua integridade pela visualização das bandas 18S e 28S ribossomais.

3.3.2 - Conversão do RNA em cDNA

O RNA extraído foi transformado em cDNA (Fita complementar do DNA) utilizando o estojo comercial *Quantitect Reverse Transcription*® (Qiagen, Venlo, GER), seguindo as instruções do fabricante. Para tal, 1 µg de RNA foi misturado com 2 uL de tampão *gDNA wipeout* e água q.s.p. 14 µl, incubado por 2 min/42°C e colocado no gelo. Um máster mix contendo 1 µl de transcriptase reversa, 4 µl de tampão RT e 1 µl de mix de oligonucleotídeos RT foi preparado no gelo ao qual foram adicionados os 14 µl de RNA molde proveniente da reação anterior. Os tubos contendo o RNA molde e o máster mix foram incubados por 15min/42°C e 3 min/95°C para inativação da transcriptase reversa. As reações foram realizadas em duplicata para cada amostra de RNA extraída.

3.3.3 - Quantificação relativa do RNAm utilizando o método $\Delta\Delta C_t$

3.3.3.1 Avaliação da estabilidade dos genes endógenos

A estabilidade dos genes endógenos *PPIE* (Peptidylprolyl isomerase E; assay ID Hs01102333_m1), o *ACTB* (beta-actina; assay Hs99999903_m1), o *TBP* Proteína ligadora TATA-box; assay ID Hs00427620_m1), *GUSB* (beta-glucuronidase; assay ID Hs00939627_m1), *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfatase-desidrogenase; assay Hs03929097_g1) e o *HPRT1* (Hipoxantina-ribosil-transferase; assay ID Hs02800695_m1) foram avaliadas em 12 amostras de adenomas hipofisários (6 invasivos e 6 não invasivos). Os resultados das expressões absolutas (valores de C_t) desses genes foram avaliados pelos programas GeNorm (66) e NormFinder (67), os quais permitem determinar a estabilidade da expressão de um gene entre diferentes amostras baseado na similaridade do seu perfil de expressão. A medida de estabilidade

do gene endógeno pelo GeNorm é definida pelo valor (M) e no NormFinder pelo valor (Q), para ambos, quanto menor esse valor, maior a estabilidade do gene testado. Além disso, o GeNorm calcula um fator de normalização para cada amostra e sugere o número ótimo de genes de referência necessários para normalização do experimento, sendo o *cut-off* 0,15 indicativo que a inclusão de um gene adicional não é necessária. A média geométrica dos genes escolhidos é então utilizada para a normalização da expressão dos genes alvo.

3.3.3.2 Quantificação do RNAm das *SIRT1-7*, *CDKN1A*, *CDKN2A* e *PTTG*

3.3.3.2.1 Sistemas de detecção

A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real foi feita para a determinação do Ct utilizando o estojo comercial *QuantiTect SYBR® Green PCR* (Qiagen, Venlo, GER) e ensaios específicos para os genes das sirtuínas1,2,4-7, *CDKN1A* e *CDKN2A* (Tabela 3). O Ct (*cycle threshold* - ciclo limiar) é definido como o número de ciclos requerido para que a fluorescência da reação atinja níveis superiores à fluorescência basal da reação dentro de uma curva exponencial. As reações foram preparadas com 2 µl de cDNA (diluído para uma concentração de 25ng/µl) 2,5 µl de 10X *QuantiTect* Primer, 12,5 µl de *SYBR GREEN* e água q.s.q 25 µl, em placas ópticas. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50 °C por 2 min, seguida pela ativação da *Taq Gold* a 95 °C por 10 min e 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg intercalados com anelamento e extensão a 60 °C por min.

Para a *sirtuína 3*, *PPIE*, *TBP* e *PTTG*, a PCR em tempo real foi realizado utilizando sondas TaqMan (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA) (Tabela 3). As reações foram também preparadas em placas ópticas com 50 ng de RNA em um volume

final de 25 µl, contendo 12,5 µl de *Taqman Universal mastermix* 2x, 1,25 µl de cada *Assay* (primers e sonda) 20 x - (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA). As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50 °C por 2 min, seguida pela ativação da *Taq Gold* a 95 °C por 10 min e 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg intercalados com anelamento e extensão a 60 °C por min.

Todas as reações foram preparadas em duplicatas técnicas e de transcrição reversa (A e B) no termociclador *Step One Plus PCR Real Time* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Como controle de qualidade das reações, o coeficiente de variação máximo permitido nas duplicatas foi de 2%, caso contrário os experimentos foram repetidos. Os experimentos foram realizados maximizando o número de amostras por placa. Assim, foram necessárias correr três placas para cada gene, sendo repetido em cada placa 3 calibradores inter-corrída (Figura 10).

Tabela 3- Ensaios utilizados na detecção do RNAm das sirtuínas, *CDKN1A*, *CDKN2A* e *PTTG*.

Gene	Anotação	Ensaio	Catálogo	Sistema
SIRT1	Sirtuína 1	Hs_SIRT1_1_SG	QT00051261	SYBR
SIRT2	Sirtuína 2	Hs_SIRT2_1_SG	QT00069531	SYBR
SIRT3	Sirtuína 3	Hs00953477_m	4331182	TAQMAN
SIRT4	Sirtuína 4	Hs_SIRT4_1_SG	QT00202503	SYBR
SIRT5	Sirtuína 5	Hs_SIRT5_1_SG	QT00047537	SYBR
SIRT6	Sirtuína 6	Hs_SIRT6_1_SG	QT00056812	SYBR
SIRT7	Sirtuína 7	Hs_SIRT7_1_SG	QT01020663	SYBR
CDKN1A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A	Hs_CDKN1A	QT02588621	SYBR
CDKN2A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A	Hs_CDKN2A	QT00998452	SYBR
PTTG	Gene transformador de tumor hipofisários	Hs00869689_s1	4351372	TAQMAN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1A	S1A	S5A	S5A	S9A	S9A	S13A	S13A	S17A	S17A	S21A	S21A
B	S1B	S1B	S5B	S5B	S9B	S9B	S13B	S13B	S17B	S17B	S21B	S21B
C	S2A	S2A	S6A	S6A	S10A	S10A	S14A	S14A	S18A	S18A	S22A	S22A
D	S2B	S2B	S6B	S6B	S10B	S10B	S14B	S14B	S18B	S18B	S22B	S22B
E	S3A	S3A	S7A	S7A	S11A	S11A	S15A	S15A	S19A	S19A	NEG	NEG
F	S3B	S3B	S7B	S7B	S11B	S11B	S15B	S15B	S19B	S19B	CIP1	CIP1
G	S4A	S4A	S8A	S8A	S12A	S12A	S16A	S16A	S20A	S20A	CIP2	CIP2
H	S4B	S4B	S8B	S8B	S12B	S12B	S16B	S16B	S20B	S20B	CIP3	CIP3

Figura 10: Modelo da montagem da placa de PCR em tempo real. **S**= *sample*/amostra; **CIP**= calibrador inter-placa; **NEG**= negativo.

3.3.3.2 Método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$

A determinação da expressão dos genes alvo foi feita utilizando o método de quantificação relativa do Ct comparativo, o $2^{-\Delta\Delta CT}$, descrito por Livak e colaboradores (68). A expressão gênica relativa é determinada a partir da normalização da do gene-alvo com um ou mais genes endógenos (ou referência) e sua comparação com uma amostra calibradora (ou controle). No experimento realizado nessa tese os genes endógenos utilizados foram o *PPIE* e o *TBP* e a amostra calibradora foi um *pool* comercial de hipófises normais de 20 adultos *Pituitary Human Gland Poly A + RNA* (Clontech, Mountain View, CA, USA).

Primeiramente, é calculado o índice ΔCT que é a relação entre a média dos Cts do gene endógeno e a média dos Cts do gene-alvo em todas as amostras estudadas. Depois é calculado o $\Delta\Delta CT$, que é a subtração do ΔCT das amostras pelo ΔCT da amostra calibradora. Em seguida, é obtido o valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ calculado no logaritmo de base 2 que indica quantas vezes a expressão do gene alvo se dá na amostra teste em relação a amostra calibradora, sendo considerada uma diferença significativa a partir de duas vezes. Assim, a hiperexpressão de um gene foi definida por um valor de expressão maior ou igual a 2 e a hipoexpressão por um valor menor ou igual a 0.5. As análises

desses dados foram realizadas utilizando a versão teste do programa GenEx 6.1 (<http://www.biomcc.com/genex-software.html>).

3.4 Análise estatística

Os dados categóricos foram representados por frequência absoluta (n) e avaliados por frequência e intervalo de confiança. O teste qui-quadrado de Pearson, ou teste exato de Fisher, foi empregado conforme apropriado. Os dados quantitativos foram avaliados por mediana, média, desvio-padrão e intervalo de variação utilizando testes paramétricos (Anova) e não paramétricos (Kruskal-wallis) conforme distribuição normal ou não normal, respectivamente. Os testes foram realizados utilizando o programa Stata SE 14 (Stata Corp LLC, Lakeway, Texas, USA) e Rcmdr (<http://www.rcommander.com/>) e o nível de significância foi fixo em 5%.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos pacientes

Neste estudo foram avaliados 37 pacientes portadores de somatotropinomas (24 mulheres e 13 homens) e 31 ACNF (16 mulheres e 15 homens). A mediana de idade dos pacientes ao diagnóstico foi de 48 anos (min= 17 e máx= 84). A mediana do maior diâmetro tumoral das lesões foi de 2.5 cm (min= 0.6 e máx= 6.0). Apenas 5 somatotropinomas eram microadenomas e todos os ACNF foram classificados como macroadenomas.

A tabela 4 mostra as características clínicas de acordo com o subtipo de tumor. O anexo C apresenta os dados individualizados de todos os pacientes, incluindo os resultados das análises moleculares realizadas. O anexo D apresenta os dados individualizados referentes às dosagens hormonais dos pacientes com somatotropinomas.

Do total de 68 casos, 40 adenomas eram invasivos e 28 não invasivos, com mediana do maior diâmetro tumoral maior no primeiro grupo (2.9: 2.3-4.0 *versus* 1.6: 1.1-2.5, respectivamente; $P < 0.001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos invasivo e não-invasivo em relação ao sexo ou à idade ao diagnóstico (Tabela 5).

Tabela 5- Comparação das características clínicas e radiológicas entre os grupos invasivo e não-invasivo.

	Invasivo (n=40)	Não-invasivo (n=28)	P
Sexo (feminino: masculino)	27:13	14:14	0.62
Idade ao diagnóstico (anos)	48.2 ±16.0	46.3±13.4	0.62
Subtipo tumoral			
GH:ACNF	18:22	15:13	0.91
Maior diâmetro do tumor (cm)	2.9 (2.3-4.0)	1.6 (1.1-2.5)	<0.001

*Dados descritos em média ±desvio padrão ou mediana (25 - 75 percentis).

Tabela 4. Caracterização clínico-patológica dos pacientes avaliados de acordo com o subtipo de tumor hipofisário.

	Somatotropinomas (n=37)	ACNF (n=31)
Sexo (feminino:masculino)	24:13	16:15
Idade ao diagnóstico (anos)	43.4 ± 11.8	56.2 ± 16.8
Avaliação hormonal pré-operatório		
GH	14.7 (5.7-42.8)	NA
IGF1	1030.5 (788-1108)	NA
ULNR IGF1	261.3 ± 49.8	NA
Remissão hormonal (sim:não)	6:31	NA
Tamanho tumoral		
Maior diâmetro (cm)	2.0 (1.3-2.5)	3.0 (2.5-4.0)
Micro:Macro	4:33	0:31
Invasão (sim:não)		
Seio cavernoso e/ou esfenoidal	22:15	18:13

ULNR: *uper limit normal range*. Média ± desvio padrão. Mediana (25 e 75 percentis). **NA:** não se aplica. Variáveis nominais são apresentadas como números absolutos e variáveis contínuas como média ± desvio padrão ou mediana (25 - 75 percentis), conforme a presença de distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente.

4.2 - Avaliação da expressão das SIRTs nos adenomas hipofisários

4.2.1 Genes endógenos mais estáveis

Entre os seis genes endógenos avaliados, os genes *TBP* e *PPIE* estiveram entre os mais estáveis de acordo com o GeNorm e o NormFinder, sendo demonstrado que o uso de dois genes endógenos já seria o suficiente para a normalização dos experimentos (Figura 11). Quando as amostras foram analisadas considerando-se os grupos de acordo com a invasividade tumoral pelo programa NormFinder, o ranqueamento da estabilidade dos genes endógenos foi mantido, sendo também o *TBP* e o *PPIE* os que apresentaram maior estabilidade entre os subgrupos (Tabela 6).

Figura 11 – Ranqueamento dos genes mais estáveis de acordo com os programas **a)** GeNorm e **b)** NormFinder, mostrando que os genes *TBP* e *PPIE* apresentam os mais baixos índices de estabilidade em ambos os algoritmos. **c)** Gráfico do número ótimo de genes endógenos para a normalização de acordo como GeNorm, mostrando que o uso de dois genes é suficiente para normalização dos dados. **Acc SD:** desvio padrão acumulado.

Tabela 6 – Estabilidade de expressão dos genes endógenos considerando a variação intra-grupos (adenomas invasivos e não invasivos) e combinado.

Genes*/Grupos	Valor (q)		
	Invasivo	Não-invasivos	Combinado
ACTB	5.5890	0.6943	2.0796
GAPDH	0.7908	0.5109	0.9612
GUSB	0.3827	0.3996	0.6372
HPRT1	0.0281	0.1682	0.1899
PIP2	0.0163	0.0279	0.1258
TBP	0.0163	0.0156	0.1258

*Os genes são mostrados em ordem decrescente de estabilidade.

4.2.2 Padrão de expressão das sirtuínas nos adenomas hipofisários

A tabela 7 mostra o padrão de expressão das sirtuínas nos somatotropinas e ACNF. A diferença de expressão nas *SIRT1*, 3, 4 e 7 foi bastante pronunciada entre os dois subtipos tumorais. A hiperexpressão da *SIRT1* foi observada em 86,5% dos somatotropinomas *versus* 41,9% dos ACNF ($P < 0.01$), não sendo observada perda de expressão desse gene. A *SIRT3* foi mais hipoexpressa nos ACNF em relação aos somatotropinomas (77,4% e 40,5%, respectivamente; $P < 0.01$). A *SIRT4* foi hipo e hiperexpressa, respectivamente, em 45,2% e 12,9% dos ACNF e 16,2% e 24,3% dos somatotropinomas ($P = 0.03$). A hipoexpressão da *SIRT7* também foi maior nos ACNF (67,7%) *versus* somatotropinomas (32,4%; $P = 0.01$) e, para ambos os subtipos, o percentual de casos apresentando hiperexpressão desse RNAm foi baixo. O padrão de expressão das *SIRT2* e 5 não diferiu entre os subtipos tumorais e não se mostrou alterado em relação ao *pool* de hipófises normais.

Tabela 7. Diferença nos grupos de hipo-, hiper e expressão normal do RNAm das sirtuínas nos somatotropinomas e ACNF.

	Nível de expressão GH*			Nível de expressão ACNF*			P
	Hipo	Normal	Hiper	Hipo	Normal	Hiper	
<i>SIRT1</i>	0 (0.0%)	5 (13.5%)	32(86.5%)	0 (0.0%)	18(58.1%)	13(41.9%)	<0.01
<i>SIRT2</i>	9 (24.3%)	26(70.3%)	2 (5.4%)	14(45.2%)	16(51.6%)	1 (3.2%)	0.19
<i>SIRT3</i>	15(40.5%)	22(59.5%)	0 (0.0%)	24(77.4%)	7 (22.6%)	0 (0.0%)	<0.01
<i>SIRT4</i>	6 (16.2%)	22(59.5%)	9 (24.3%)	14(45.2%)	13(41.9%)	4 (12.9%)	0.03
<i>SIRT5</i>	2 (5.4%)	27(73.0%)	8 (21.6%)	3 (9.7%)	22(71.0%)	6 (19.4%)	0.79
<i>SIRT6</i>	9 (28.1%)	21(65.6%)	2 (6.3%)	15(57.7%)	11(42.3%)	0 (0.0%)	0.05
<i>SIRT7</i>	12(32.4%)	23(62.2%)	2 (5.4%)	21(67.7%)	9 (29.0%)	1 (3.2%)	0.01

* Dados apresentados em frequência absoluta e relativa (%).

4.2.3 Expressão das sirtuínas e relação com idade diagnóstica e o fenótipo tumoral.

A diferença de expressão das sirtuínas não se relacionou com a idade diagnóstica dos pacientes (Tabela 8). Em relação ao fenótipo tumoral, as *SIRT1* e 3 foram relacionadas ao tamanho do tumor; nos casos com hiperexpressão da *SIRT1* a média do maior diâmetro tumoral foi 2.4 ± 1.1 enquanto nos pacientes com expressão normal foi de 3.3 ± 1.3 (Tabela 8; Figura 12a; $P<0.01$). Já os casos com perda de expressão da *SIRT3* apresentaram adenomas maiores, média de 3.1 ± 1.2 , em relação aos casos com expressão normal, média de 2.2 ± 1.1 (Tabela 8; Figura 13a ; $P<0.01$).

A associação entre a expressão do RNAm das *SIRT 1* e 3 e o tamanho tumoral, também foi observada, de forma mais fraca (*SIRT1*, $\rho=-0.3$ e $P=0.01$) ou moderada (*SIRT3*, $\rho= -0.4$, $P<0.01$) quando os valores de RQ foram correlacionados diretamente com a medida do maior diâmetro tumoral (Figura 12b e 13b).

Tabela 8- Relação da expressão das *SIRT*s com a idade diagnóstica e o fenótipo tumoral.

	HIPO- EXPRESSÃO	NORMAL	HIPER- EXPRESSÃO	P
<i>SIRT1</i>				
Idade ao diagnóstico	0:0	45.7 ± 18.2	48.3 ± 13.1	0.52
Tamanho do tumor				
micro:macro	0:0	0:23	4:41	0.14
maior diâmetro (cm)	0:0	3.28 ± 1.30	2.38 ± 1.15	<0.01
Invasão (sim:não)	0:0	14:9	19:26	0.81
<i>SIRT2</i>				
Idade ao diagnóstico	49.2 ± 16.5	47.0 ± 14.2	39.6 ± 13.5	0.56
Tamanho do tumor				
micro:macro	1:22	3:39	0:3	0.82
maior diâmetro (cm)	3.20 ± 1.36	2.45 ± 1.18	2.00 ± 0.43	0.05
Invasão (sim:não)	14:9	24:18	2:1	0.92
<i>SIRT3</i>				
Idade ao diagnóstico	48.8 ± 15.9	45.5 ± 13.6	0:0	0.37
Tamanho do tumor				
micro:macro	2:37	2:27	0:0	0.76
maior diâmetro (cm)	3.10 ± 1.23	2.23 ± 1.13	0:0	<0.01
Invasão (sim:não)	25:14	15:14	0:0	0.30
<i>SIRT4</i>				
Idade ao diagnóstico	47.0 ± 17.9	46.5 ± 12.8	50.4 ± 16.0	0.72
Tamanho do tumor				
micro:macro	1:19	3:32	0:13	0.52
maior diâmetro (cm)	3.10 ± 1.28	2.36 ± 1.11	2.91 ± 1.50	0.09
Invasão (sim:não)	10:10	21:14	9:4	0.54
<i>SIRT5</i>				
Idade ao diagnóstico	45.2 ± 20.0	47.8 ± 13.6	47.0 ± 13.4	0.93
Tamanho do tumor				
micro:macro	0:5	4:45	0:14	0.44
maior diâmetro (cm)	2.72 ± 0.82	2.64 ± 1.34	2.82 ± 1.19	0.89
Invasão (sim:não)	2:3	28:21	9:5	0.89
<i>SIRT6</i>				
Idade ao diagnóstico	50.9 ± 15.1	44.9 ± 13.6	40.5 ± 0.70	0.23
Tamanho do tumor				
micro:macro	2:22	1:31	0:2	0.65
maior diâmetro (cm)	2.63 ± 1.14	2.59 ± 1.27	2.50 ± 1.41	0.99
Invasão (sim:não)	13:11	21:11	1:1	0.65
<i>SIRT7</i>				
Idade ao diagnóstico	49.0 ± 16.6	45.3 ± 11.7	51.3 ± 28.3	0.55
Tamanho do tumor				
micro:macro	2:31	2:30	0:3	0.91
maior diâmetro (cm)	2.63 ± 1.12	2.66 ± 1.41	3.40 ± 1.51	0.61
Invasão (sim:não)	16:17	21:11	3:0	0.12

* Dados apresentadas como números absolutos e média ± desvio padrão.

Figura 12. Associação entre a expressão da *SIRT1* e o tamanho tumoral dos adenomas hipofisários. (a) diferença de média do maior diâmetro tumoral entre os grupos com expressão normal e hiperexpressão ($P < 0.01$). (b) Correlação negativa entre o RQ RNAm e a medida do maior diâmetro tumoral ($\rho = -0.3$ e $P = 0.01$).

Figura 13. Associação entre a expressão da *SIRT3* e o tamanho tumoral dos adenomas hipofisários. (a) diferença de média do maior diâmetro tumoral entre os grupos com expressão normal e hiperexpressão ($P < 0.01$). (b) Correlação negativa entre o RQ RNAm e a medida do maior diâmetro tumoral ($\rho = -0.4$, $P < 0.01$).

Contudo, não houve associação da expressão das sirtuínas com a invasividade tumoral (Tabela 8; Figura 14). O comportamento invasivo foi relacionado ainda com a expressão das sirtuínas analisando cada subtipo tumoral isoladamente e também não foi encontrada nenhuma associação (Tabela 9).

Figura 14. Heat map da expressão das *SIRT1-7* entre os adenomas hipofisários invasivos e não invasivos. **Vermelho**= hiperexpressão; **verde**= expressão normal; **amarelo**= hipoeexpressão; **S**= sirtuína.

Tabela 9- Relação da expressão das *SIRT*s 1-7 com a invasão de acordo com o subtipo tumoral.

	Hipo-expressão	Normal	Hiper-expressão	P
ACNF	invasão (sim:não)			
<i>SIRT1</i>	-	10:8	8:5	0.74
<i>SIRT2</i>	10:4	7:9	1:0	0.15
<i>SIRT3</i>	15:9	3:4	-	0.41
<i>SIRT4</i>	8:6	6:7	4:0	0.21
<i>SIRT5</i>	2:1	14:8	2:4	0.51
<i>SIRT6</i>	8:7	6:5	-	0.95
<i>SIRT7</i>	11:10	6:3	1:0	0.82
GH	invasão (sim:não)			
<i>SIRT1</i>	-	4:1	18:14	0.63
<i>SIRT2</i>	4:5	17:9	1:1	0.53
<i>SIRT3</i>	10:5	12:10	-	0.51
<i>SIRT4</i>	2:4	15:7	5:4	0.27
<i>SIRT5</i>	1:1	14:13	7:1	0.12
<i>SIRT6</i>	5:4	15:6	1:1	0.49
<i>SIRT7</i>	5:7	15:8	2:0	0.29

*Dados apresentadas como números absolutos.

4.2.4 Correlação da expressão das *SIRT*1-7 com os marcadores de senescência celular *CDKN1A* e *CDKN2A*

A expressão de todas as *SIRT*s apresentou correlação positiva moderada (*SIRT*1-5,7) ou forte (*SIRT*6) com a expressão do *CDKN1A*. Uma correlação positiva foi observada também em relação a expressão do *CDKN2A*. Contudo, essa foi fraca e presente apenas para as *SIRT*s 3-5

4.2.5 Correlação da expressão das *SIRT1-7* com o proto-oncogene *PTTG*.

Foi observada uma fraca correlação entre a *PTTG* expressão das *SIRT1* (ρ 0.3; $P=0.04$) e a *SIRT3* (ρ 0.4; $P=0.01$). Quando essas correlações foram avaliadas por subtipo tumoral, a correlação entre o *PTTG* e a *SIRT1* foi mantida nos somatotropinomas (ρ 0.4; $P=0.01$) e o *PTTG* e a *SIRT3* nos ACNF (ρ 0.4; $P=0.049$).

Tabela 10- Correlação entre a expressão dos genes das sirtuínas e do *CDKN1A*, *CDKN2A* e *PTTG*.

	<i>SIRT1</i>	<i>SIRT2</i>	<i>SIRT3</i>	<i>SIRT4</i>	<i>SIRT5</i>	<i>SIRT6</i>	<i>SIRT7</i>
<i>CDKN1A</i>	0,406*	0,599	0,418	0,370	0,420	0,727	0,479
	0,001	0,000	0,001	0,004	0,001	0,000	0,000
<i>CDKN2A</i>	0,196	0,203	0,360	0,363	0,345	0,258	0,209
	0,139	0,125	0,005	0,005	0,007	0,050	0,114
<i>PTTG</i>	0,271	0,034	0,329	-0,004	0,167	-0,069	0,012
	0,039	0,796	0,011	0,973	0,209	0,604	0,925

*Rho/P value

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, os fenômenos epigenéticos passaram a ser fortemente investigados como um importante precursor da transformação neoplásica das células hipofisárias (30), assim como a senescência celular vem sendo proposta como um potencial mecanismo de controle da proliferação celular e da progressão desses tumores. (15). As sirtuínas são enzimas multifuncionais que regulam o processo de silenciamento gênico via modificação das proteínas histonas e estão implicadas em diversos mecanismos celulares vitais, como apoptose e senescência celular.

O presente estudo visou investigar, de maneira inédita, a expressão tecidual das *SIRT1-7*, e sua relação com o tamanho e a invasividade tumoral, nos somatotropinomas e ACNFs. Foi observada uma hiperexpressão da *SIRT1* em 86,5% dos somatotropinomas *versus* 41,9% dos ACNF ($P < 0.01$), não sendo detectada perda de expressão desse gene em nenhum dos dois subtipos tumorais. A *SIRT1* é uma das mais bem estudadas sirtuínas de mamíferos. No processo de tumorigênese, esta sirtuína pode atuar de forma ambígua na maquinaria celular, estando associada tanto aos processos de supressão quanto de promoção tumoral (69).

Como um oncogene, a *SIRT1* pode estimular a inibição da apoptose e senescência celulares, inativar genes supressores, ativar proto-oncogenes e promover expansão clonal (44, 69). Como supressor, esta função pode ser desempenhada pela capacidade da *SIRT1* aumentar a estabilidade do genoma, pelo reparo de danos causados as moléculas de DNA e a estrutura da cromatina e, pela inibição da proliferação celular (44, 49, 69).

Em nosso estudo, a expressão da *SIRT1* foi relacionada ao tamanho tumoral, sendo observado um menor diâmetro tumoral nos casos com maior expressão da *SIRT1*

(2.4 ± 1.1 versus 3.3 ± 1.3 ; $P < 0.01$). Esta é uma evidência clínica que indica que a SIRT1 poderia atuar no controle da proliferação das células tumorais hipofisárias, em especial nos somatotropinomas. Corroborando com este papel, os estudos *in vitro* de Lim JH et. al. (2010) mostraram que a *SIRT1* poderia atuar na inativação do HIF1- α inibindo a vascularização e protegendo contra a formação e o crescimento do tumor, atuando assim como supressor tumoral (48).

Em nossos casos, a expressão da *SIRT1* foi moderadamente correlacionada a expressão do marcador de senescência celular *CDKN1A* ($\rho = 0.4067$; $P = 0,0015$), indicando que a SIRT1 poderia atuar na regulação positiva da via de senescência mediada pela p21/p53 nos adenomas hipofisários. Em adição, ainda que mais fracamente, a expressão da *SIRT1* foi correlacionada a expressão do *PTTG* ($\rho = 0.2712$; $P = 0,0395$). O papel do *PTTG* como indutor de senescência nos adenomas hipofisários tem sido descrito pela ativação da via p21, sendo os somatotropinomas os subtipos que apresentam maior imunoreatividade para esta proteína (18). Apesar dos nossos resultados apontarem para um possível envolvimento da SIRT1 na via de senescência mediada pela p21/p53 nos adenomas hipofisários, essa relação ainda precisa ser melhor investigada.

A *SIRT3*, de maneira oposta ao observado para a *SIRT1*, apresentou-se hipoexpressa nos adenomas hipofisários, sendo essa perda de expressão mais pronunciada nos ACNFs do que nos somatotropinomas (77,4% versus 40,5%; $P < 0.01$) com poucos desses casos apresentando hiperexpressão desse gene. A SIRT3 é uma proteína predominantemente mitocondrial que inibe a síntese de ROS, reduzindo primariamente a ocorrência de possíveis danos ao DNA decorrentes do estresse

oxidativo. Ao suprimir a síntese de ROS, *SIRT3* inibe paralelamente a ativação de HIF1- α levando a estabilização da angiogênese e da progressão tumoral (52).

De maneira semelhante ao observado para a *SIRT1*, houve uma associação positiva da expressão da *SIRT3* com o tamanho tumoral em nossos casos, onde os adenomas com perda de expressão mostraram maior tamanho em relação aqueles com expressão normal (3.1 ± 1.2 e 2.2 ± 1.1 , respectivamente; $P < 0.01$). O papel da *SIRT3* como um potencial supressor tumoral é também embasada pelos estudos *in vivo* de Kim et al., 2010 (56). Esses autores mostraram uma expressão diminuída do RNA mensageiro da *SIRT3* em amostras de neoplasias maligna de mama e em vários outros tumores incluindo tumor testicular, glioblastoma, próstata, cabeça e pescoço (56).

Ainda, similarmente ao encontrado para a *SIRT1*, a expressão da *SIRT3* foi moderadamente correlacionada a expressão dos marcadores de senescência celular *CDKN1A* ($\rho = 0.4180$; $P = 0,0011$) e, em adição, ao *CDKN2A* ($\rho = 0.3608$; $P = 0,005$). Esses dados indicam que esta sirtuína poderia atuar na regulação positiva da via de senescência mediada pela p21/p53 e p16/Rb nos adenomas hipofisários. A expressão da *SIRT3* também foi correlacionada a expressão do *PTTG* ($\rho = 0.3291$; $P = 0,0117$), cujo papel na indução da senescência celular via p21, como descrito anteriormente, já foi relatada nos somatotropinomas (23). Em relação à via p16/Rb, apesar das evidências que apontam para a convergência dessas duas principais vias de senescência celular após ativação de diferentes proto-oncogenes (70, 71), a importância da *SIRT3* e da senescência mediada pela p16 ainda precisa ser melhor estudada.

Em relação as demais sirtuínas, houve perda de expressão das *SIRTs* 4 e 7, particularmente associada aos ACNFs, e perda de expressão da *SIRT6* em mais de 50% desses tumores. Tem sido demonstrado, tanto em modelos animais quanto em tumores

humanos, que a perda de expressão da *SIRT4* está relacionada a danos no mecanismo de parada do ciclo celular induzido pelos danos no DNA, resultando no acúmulo de mutações e aumento de aneuploidias (72). Células *SIRT6*-deficientes são caracterizadas por apresentar telômeros não funcionais (31), instabilidade genômica (59), ineficiência no mecanismo de reparo do DNA (73), bem como ativação da via de sinalização NFκB (74), enquanto sua hiperexpressão estimula a apoptose em células transformadas (32).

A *SIRT7* reprime a atividade de proto-oncogenes como c-Myc and Akt, controlando duas importantes vias de proliferação celular (75, 76). Assim, as SIRTs 4, 6 e 7 atuam no controle do crescimento celular e protegem as células da instabilidade genômica, consistente com o modelo de que essas sirtuínas desempenhem um papel de supressor tumoral. A perda de sua expressão nos ACNFs poderia influenciar, dessa forma, no início da tumorigênese. Já o padrão de expressão das *SIRT2* e *5* não diferiu de forma importante entre os subtipos tumorais e não se mostrou alterado em relação ao *pool* de hipófises normais na maioria dos casos.

Adicionalmente, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa na expressão dos genes das sirtuínas entre os grupos de adenomas invasivos e não invasivos. Este é um dado intrigante, uma vez que o tamanho tumoral está fortemente relacionado com sua invasão e a expressão da *SIRT1* e da *SIRT3* foi correlacionada com o tamanho do tumor.

Em resumo, este estudo mostra que as sirtuínas estão, em sua maioria, hipoexpressas nos ACNF, sendo observado que aumento da expressão apenas da *SIRT3*, principalmente relacionado aos somatotropinomas. Foi observado uma boa correlação dessas sirtuínas com os marcadores de senescência celular, principalmente o *CDKN1A*, gene ligado a via de senescência mediada pela p21/p53. Esses resultados indicam que a

perda alterações no padrão de expressão das sirtuínas poderiam estar envolvidas no processo tumorigênico dos somatotropinomas e ACNFs.

Apesar de promissores, novos estudos envolvendo uma coorte ainda mais expressiva de adenomas hipofisários e empregando técnicas de estudo de expressão proteica, assim como ensaios *in vitro* para uma caracterização de seu processo molecular, são necessários para elucidar a importância das sirtuínas no desenvolvimento e progressão dos adenomas hipofisários. Além disso, o reconhecimento de novas vias tumorigênicas pode revelar novos alvos terapêuticos em potencial que podem ser alternativos ao tratamento cirúrgico e ao uso das drogas convencionais nos casos resistentes.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Foi identificada hiperexpressão do RNAm da *SIRT1* em 86.5% e 41.9%, e hipoexpressão do RNAm da *SIRT3* em 40.5% e 77.4%, dos casos de somatotropinomas e ACNF, respectivamente.
- A expressão gênica dessas sirtuínas foi relacionada ao tamanho tumoral, sendo observados adenomas de maior e menor dimensão nos casos com hiperexpressão da *SIRT3* e hipoexpressão da *SIRT1*, respectivamente.
- Foi identificada uma menor expressão das *SIRT4*, 6 e 7 nos ACNF, contudo esta não foi relacionada a diferenças no tamanho do tumor.
- Não houve associação da perda de expressão das sirtuínas com a invasividade tumoral dos somatotropinomas e ACNF.
- A expressão das sirtuínas foi correlacionada, principalmente, a expressão do *CDKN1A*, relacionado a via de senescência mediada pela p21/p53;
- A expressão das *SIRT1* e 3 foi fracamente correlacionado com a expressão do proto-oncogene *PTTG*.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO
PAULO - HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: __/__/__

ENDEREÇO: _____ N° APTO:

BAIRRO: _____ CIDADE:

CEP: TELEFONE: ()

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: __/__/__

ENDEREÇO: _____ N° APTO:

BAIRRO: _____ CIDADE:

CEP: TELEFONE: ()

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Análise da expressão das sirtuínas em adenomas

hipofisários e sua correlação com grau de invasividade.”

2. PESQUISADORES: Responsável: Ericka Barbosa Trarbach / Executante: Isabella Pacetti Pajaro Grande.

CARGO/FUNÇÃO: Aluno de Mestrado no programa de Endocrinologia – N°USP: 9248566

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular/LIM-25

Rubrica do sujeito da pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: Previsão de 36 meses.

5. DESENHO E OBJETIVOS DO ESTUDO: Fornecemos estas informações sobre o estudo para auxiliar na decisão em participar voluntariamente dessa pesquisa. Os adenomas hipofisários são, na maioria dos casos, tumores benignos, que podem ou não produzir hormônios. Dependendo do tipo de hormônio produzido, o paciente apresenta uma doença diferente: aumento do hormônio do crescimento (acromegalia), aumento do cortisol (doença de cushing), aumento da prolactina (prolactinoma). Mesmo quando não produzem hormônios, podem levar a sintomas significativos, como dores de cabeça e prejuízo à visão devido à

proximidade com estruturas nobres, como o nervo responsável pela visão. Apesar de benignos, podem ser difíceis de tratar, devido às dificuldades na retirada completa durante a cirurgia por serem, muitas vezes, invasivos. Podem, ainda, apresentar crescimento e recidiva no pós-operatório. Este estudo visa pesquisar a expressão de genes e proteínas nos adenomas hipofisários dos pacientes portadores dessa condição e sua relação com comportamento invasivo, crescimento tumoral e recidiva pós-operatória.

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS: Serão coletadas amostras de tecido do tumor da hipófise, obtido durante a cirurgia indicada para o tratamento, que serão posteriormente analisadas em laboratório. Essa análise não muda o tratamento recebido.

7. BENEFÍCIOS PARA O PARTICIPANTE: Não há benefício direto para o participante, mas esse estudo poderá contribuir para a compreensão do comportamento invasivo nos adenomas hipofisários.

Somente no final do estudo poderemos concluir sobre a presença de algum benefício.

8. RELAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS QUE POSSAM SER VANTAJOSOS, PELOS QUAIS, O PACIENTE PODE OPTAR: Não há.

9. GARANTIA DE ACESSO: Em qualquer etapa do estudo, o participante terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas referentes aos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa. O principal investigador é a Dra. ERICKA BARBOSA TRARBACH e a Pesquisadora Executante é Isabella Pacetti Pajaro Grande, que podem ser encontrados no endereço Av. Doutor Arnaldo, 455, 4º andar – salas 4345/4347, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular/LIM-25, telefones: (11) 3061-7252 / (11) 3061-8486 / (11) 3061-4347. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225– 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, ou 18, FAX: 2661-6442, ramal

26, e-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

10. É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

11. DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros indivíduos da pesquisa, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Rubrica do sujeito da pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

12. DIREITO DE SER MANTIDO ATUALIZADO SOBRE OS RESULTADOS: O participante do estudo tem o direito de saber o resultado final quando o estudo estiver concluído.

13. DESPESAS E COMPENSAÇÕES: Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

14. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e os materiais coletados somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo referido. Li este documento e seu conteúdo foi explicado para mim por Dra. ERICKA BARBOSA TRARBACH / Isabella Pacetti Pajaro Grande. Ficaram claros para mim, quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Forneço, de livre e espontânea

Anexos

vontade, meu consentimento para participar deste estudo, sabendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou prejuízo no meu atendimento neste Serviço.

Sim, eu recebi uma cópia assinada do termo de consentimento livre.

Assinatura do paciente/representante legal

Data__/__/__

Assinatura da testemunha

Data__/__/__

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data __/__/__

7.2 Anexo B

Tabela 1 - Valores de Ct , média entre as replicatas técnicas (Ct *mean*) e respectivo desvio padrão (SD) das amostras analisadas. As amostras com SD maior ou igual 0,5 foram excluídas.

	HPRT1			SIRT1			SIRT2			SIRT6		
Sample	C_T	C_T Mean	C_T SD	C_T	C_T Mean	C_T SD	C_T	C_T Mean	C_T SD	C_T	C_T Mean	C_T SD
102A	25,48	25,31	0,237	24,55	24,60	0,071	27,52	27,49	0,048	26,53	26,51	0,031
102A	25,15	25,31	0,237	24,65	24,60	0,071	27,45	27,49	0,048	26,49	26,51	0,031
102B	25,39	25,40	0,012	24,33	24,14	0,261				26,89	26,75	0,198
102B	25,41	25,40	0,012	23,96	24,14	0,261				26,61	26,75	0,198
107A	22,03	22,27	0,341	24,14	23,85	0,419	25,24	25,12	0,168	24,76	24,63	0,174
107A	22,51	22,27	0,341	23,55	23,85	0,419	25,00	25,12	0,168	24,51	24,63	0,174
107B	22,03	22,31	0,384	25,28	25,23	0,072	25,22	25,10	0,165	24,80	24,75	0,077
107B	22,58	22,31	0,384	25,18	25,23	0,072	24,99	25,10	0,165	24,69	24,75	0,077
108A	23,99	24,06	0,093	24,93	24,89	0,046	26,57	26,48	0,122	26,40	26,33	0,112
108A	24,13	24,06	0,093	24,86	24,89	0,046	26,40	26,48	0,122	26,25	26,33	0,112
109A	23,06	23,13	0,111	23,99	23,92	0,100	25,32	25,32	0,003	25,55	25,49	0,095
109A	23,21	23,13	0,111	23,85	23,92	0,100	25,32	25,32	0,003	25,42	25,49	0,095
109B	23,29	23,35	0,072	23,61	23,72	0,146	25,48	25,41	0,095	25,38	25,64	0,375
109B	23,40	23,35	0,072	23,82	23,72	0,146	25,35	25,41	0,095	25,91	25,64	0,375
113A	24,35	24,41	0,080	25,98	25,92	0,093	26,54	26,55	0,015	26,46	26,31	0,202
113A	24,46	24,41	0,080	25,85	25,92	0,093	26,56	26,55	0,015	26,17	26,31	0,202
113B	24,83	24,84	0,012	26,64	26,56	0,126	27,26	27,15	0,160	27,08	26,95	0,184
113B	24,85	24,84	0,012	26,47	26,56	0,126	27,03	27,15	0,160	26,82	26,95	0,184
117A	22,82	22,80	0,026	25,77	25,78	0,006	25,94	25,94	0,005	27,07	27,13	0,078
117A	22,78	22,80	0,026	25,78	25,78	0,006	25,93	25,94	0,005	27,18	27,13	0,078
117B	22,58	22,65	0,103	24,50	24,66	0,229	25,43	25,39	0,059	26,95	26,95	0,012
117B	22,72	22,65	0,103	24,82	24,66	0,229	25,35	25,39	0,059	26,94	26,95	0,012
119A	24,95	24,80	0,208	25,08	25,09	0,009	26,53	26,52	0,012	27,78	27,77	0,020
119A	24,65	24,80	0,208	25,09	25,09	0,009	26,51	26,52	0,012	27,75	27,77	0,020
119B	23,87	23,95	0,115	24,91	24,87	0,049	26,14	26,12	0,030	27,61	27,50	0,155
119B	24,03	23,95	0,115	24,84	24,87	0,049	26,10	26,12	0,030	27,39	27,50	0,155
11A	25,22	25,15	0,096	23,59	23,46	0,191	23,84	23,74	0,141	24,95	24,89	0,087
11A	25,09	25,15	0,096	23,32	23,46	0,191	23,64	23,74	0,141	24,83	24,89	0,087
11B	24,99	24,92	0,096	23,76	23,70	0,085	23,28	23,26	0,034	24,55	24,51	0,059
11B	24,85	24,92	0,096	23,64	23,70	0,085	23,23	23,26	0,034	24,47	24,51	0,059
121A	24,18	24,25	0,087	24,46	24,37	0,124	25,70	25,63	0,105	26,33	26,30	0,045
121A	24,31	24,25	0,087	24,28	24,37	0,124	25,56	25,63	0,105	26,27	26,30	0,045
121B	24,66	24,75	0,134	24,53	24,56	0,042	25,96	25,91	0,068	25,88	25,86	0,025
121B	24,85	24,75	0,134	24,59	24,56	0,042	25,86	25,91	0,068	25,85	25,86	0,025
123A	24,12	24,30	0,259	22,85	22,84	0,022	25,80	25,86	0,079	25,84	25,78	0,095
123A	24,48	24,30	0,259	22,82	22,84	0,022	25,92	25,86	0,079	25,71	25,78	0,095
123B	24,03	24,08	0,081	23,95	23,97	0,020	25,75	25,71	0,059	25,23	25,27	0,053
123B	24,14	24,08	0,081	23,98	23,97	0,020	25,67	25,71	0,059	25,30	25,27	0,053
127A	21,94	22,07	0,188	23,71	23,62	0,127	23,95	23,91	0,055	24,83	24,66	0,243
127A	22,21	22,07	0,188	23,53	23,62	0,127	23,88	23,91	0,055	24,49	24,66	0,243
127B	21,88	21,93	0,067	23,30	23,17	0,187	23,43	23,35	0,104	24,53	24,52	0,015
127B	21,98	21,93	0,067	23,04	23,17	0,187	23,28	23,35	0,104	24,51	24,52	0,015
128A	24,08	24,12	0,045	25,21	25,22	0,026	26,19	26,06	0,184	25,96	25,89	0,100
128A	24,15	24,12	0,045	25,24	25,22	0,026	25,93	26,06	0,184	25,82	25,89	0,100
128B	23,40	23,42	0,030	25,14	25,23	0,126	26,18	26,11	0,094	25,94	26,01	0,110
128B	23,44	23,42	0,030	25,32	25,23	0,126	26,05	26,11	0,094	26,09	26,01	0,110
129A	23,74	23,82	0,104	24,22	24,33	0,155	24,84	24,82	0,020	24,55	24,54	0,007
129A	23,89	23,82	0,104	24,43	24,33	0,155	24,81	24,82	0,020	24,54	24,54	0,007

Anexos

129B	23,73	23,75	0,035	24,21	24,28	0,104	24,71	24,69	0,036	24,49	24,53	0,056
129B	23,77	23,75	0,035	24,35	24,28	0,104	24,66	24,69	0,036	24,56	24,53	0,056
131A	24,19	24,28	0,128	24,53	24,46	0,102	25,32	25,16	0,226	25,40	25,36	0,061
131A	24,37	24,28	0,128	24,39	24,46	0,102	25,00	25,16	0,226	25,31	25,36	0,061
131B	23,33	23,38	0,067	23,80	23,79	0,006	23,93	23,94	0,013	23,66	23,71	0,064
131B	23,43	23,38	0,067	23,79	23,79	0,006	23,95	23,94	0,013	23,75	23,71	0,064
132A	22,57	22,68	0,160	23,56	23,46	0,143	23,03	22,98	0,073	23,38	23,32	0,095
132A	22,80	22,68	0,160	23,36	23,46	0,143	22,92	22,98	0,073	23,25	23,32	0,095
132B	22,93	22,99	0,079	23,92	23,80	0,174	23,80	23,69	0,153	23,94	23,95	0,012
132B	23,04	22,99	0,079	23,67	23,80	0,174	23,58	23,69	0,153	23,96	23,95	0,012
133A	23,70	23,82	0,175	24,49	24,32	0,242	24,08	23,88	0,281	24,21	24,03	0,253
133A	23,95	23,82	0,175	24,15	24,32	0,242	23,69	23,88	0,281	23,85	24,03	0,253
133B	23,30	23,25	0,068	23,96	24,02	0,086	23,92	23,87	0,066	23,68	23,71	0,035
133B	23,20	23,25	0,068	24,09	24,02	0,086	23,83	23,87	0,066	23,73	23,71	0,035
138A	25,94	26,03	0,128	24,87	24,97	0,146	26,48	26,46	0,026	27,16	27,28	0,167
138A	26,12	26,03	0,128	25,08	24,97	0,146	26,44	26,46	0,026	27,40	27,28	0,167
141A	25,24	25,25	0,020	24,51	24,52	0,008	26,72	26,69	0,038	26,96	26,92	0,056
141A	25,26	25,25	0,020	24,52	24,52	0,008	26,66	26,69	0,038	26,88	26,92	0,056
141B	24,92	25,03	0,149	23,97	24,01	0,057	26,54	26,55	0,013	27,00	27,06	0,090
141B	25,13	25,03	0,149	24,05	24,01	0,057	26,56	26,55	0,013	27,13	27,06	0,090
15A	24,00	24,17	0,242	23,29	23,19	0,136	22,46	22,39	0,097	24,04	23,96	0,112
15A	24,34	24,17	0,242	23,10	23,19	0,136	22,32	22,39	0,097	23,88	23,96	0,112
15B	23,75	23,78	0,043	23,06	23,02	0,056	22,07	22,08	0,023	23,70	23,77	0,098
15B	23,81	23,78	0,043	22,98	23,02	0,056	22,10	22,08	0,023	23,84	23,77	0,098
175A	24,35	24,45	0,140	24,77	24,78	0,022	25,14	25,25	0,160	25,08	25,12	0,047
175A	24,55	24,45	0,140	24,80	24,78	0,022	25,36	25,25	0,160	25,15	25,12	0,047
175B	24,17	24,20	0,050	24,89	24,90	0,018	25,06	25,05	0,018	25,08	25,12	0,063
175B	24,24	24,20	0,050	24,92	24,90	0,018	25,03	25,05	0,018	25,16	25,12	0,063
17A	27,22	27,18	0,059	25,18	25,16	0,031	26,99	27,05	0,079	28,02	28,03	0,023
17A	27,14	27,18	0,059	25,14	25,16	0,031	27,10	27,05	0,079	28,05	28,03	0,023
17B	26,46	26,50	0,057	22,61	22,44	0,239	25,84	25,88	0,064	26,94	27,11	0,242
17B	26,54	26,50	0,057	22,27	22,44	0,239	25,93	25,88	0,064	27,28	27,11	0,242
18A	25,12	25,16	0,046	23,15	23,07	0,122	22,53	22,64	0,149	23,97	23,90	0,097
18A	25,19	25,16	0,046	22,98	23,07	0,122	22,74	22,64	0,149	23,83	23,90	0,097
18B	25,04	25,08	0,062	23,08	23,05	0,047	22,34	22,37	0,043	23,81	23,82	0,007
18B	25,13	25,08	0,062	23,01	23,05	0,047	22,40	22,37	0,043	23,82	23,82	0,007
20A	25,20	25,13	0,109	22,99	23,07	0,119	22,17	22,09	0,114	23,50	23,46	0,069
20A	25,05	25,13	0,109	23,16	23,07	0,119	22,00	22,09	0,114	23,41	23,46	0,069
20B	25,23	25,21	0,027	22,86	22,76	0,135	22,49	22,51	0,036	23,87	23,75	0,172
20B	25,19	25,21	0,027	22,67	22,76	0,135	22,54	22,51	0,036	23,62	23,75	0,172
22A	25,67	25,83	0,232	21,94	21,96	0,034						
22A	26,00	25,83	0,232	21,99	21,96	0,034						
22B	25,46	25,64	0,247	23,15	23,09	0,088						
22B	25,81	25,64	0,247	23,03	23,09	0,088						
23A	25,85	25,89	0,057	22,98	23,00	0,035	22,79	22,74	0,068	24,26	24,23	0,047
23A	25,93	25,89	0,057	23,03	23,00	0,035	22,70	22,74	0,068	24,20	24,23	0,047
23B	25,87	25,86	0,013	22,92	22,93	0,005	22,62	22,63	0,013	24,07	24,08	0,010
23B	25,85	25,86	0,013	22,93	22,93	0,005	22,64	22,63	0,013	24,09	24,08	0,010
25B	28,59	28,57	0,032	22,63	22,60	0,048	27,36	27,49	0,182	30,35	30,25	0,132
25B	28,55	28,57	0,032	22,56	22,60	0,048	27,62	27,49	0,182	30,16	30,25	0,132
26A	28,17	28,14	0,039	23,81	23,89	0,106	28,27	28,26	0,024	30,57	30,47	0,145
26A	28,12	28,14	0,039	23,96	23,89	0,106	28,24	28,26	0,024	30,37	30,47	0,145
26B	28,65	28,68	0,044				28,76	28,64	0,169	30,76	31,11	0,488
26B	28,71	28,68	0,044				28,52	28,64	0,169	31,45	31,11	0,488
28A	30,18	30,05	0,186	26,24	26,26	0,039	28,24	28,18	0,087	30,15	30,46	0,436
28A	29,92	30,05	0,186	26,29	26,26	0,039	28,12	28,18	0,087	30,76	30,46	0,436
28B	29,99	30,01	0,025				28,00	27,95	0,072	30,12	30,03	0,123
28B	30,03	30,01	0,025				27,90	27,95	0,072	29,94	30,03	0,123
29A	29,01	29,07	0,080				28,23	28,41	0,260	31,43	31,27	0,228
29A	29,13	29,07	0,080				28,59	28,41	0,260	31,11	31,27	0,228
29B	28,29	28,31	0,026				27,63	27,63	0,009	31,27	31,11	0,234
29B	28,33	28,31	0,026				27,62	27,63	0,009	30,94	31,11	0,234
31A	29,49	29,56	0,095	24,79	24,73	0,085	30,08	30,06	0,023	31,94	31,71	0,315

Anexos

31A	29,63	29,56	0,095	24,67	24,73	0,085	30,04	30,06	0,023	31,49	31,71	0,315
31B	29,38	29,40	0,036	25,16	25,04	0,174	29,67	29,78	0,157	34,66	34,43	0,324
31B	29,43	29,40	0,036	24,92	25,04	0,174	29,89	29,78	0,157	34,20	34,43	0,324
32A	28,84	28,88	0,056	26,03	26,14	0,161	29,02	28,85	0,246			
32A	28,92	28,88	0,056	26,26	26,14	0,161	28,67	28,85	0,246			
32B	30,42	30,71	0,404				32,08	32,02	0,080			
32B	30,99	30,71	0,404				31,97	32,02	0,080			
35A	34,54	34,55	0,016	26,79	26,76	0,044	34,24	34,14	0,147			
35A	34,56	34,55	0,016	26,72	26,76	0,044	34,03	34,14	0,147			
35B	33,92	33,91	0,015	26,32	26,25	0,107						
35B	33,90	33,91	0,015	26,17	26,25	0,107						
36A	27,45	27,61	0,237				23,37	23,47	0,139	24,02	24,09	0,097
36A	27,78	27,61	0,237				23,57	23,47	0,139	24,16	24,09	0,097
36B	28,51	28,61	0,147				24,73	24,77	0,059	25,48	25,53	0,061
36B	28,71	28,61	0,147				24,82	24,77	0,059	25,57	25,53	0,061
40A	25,84	25,91	0,095	22,60	22,69	0,127	22,50	22,51	0,008	24,01	23,99	0,024
40A	25,98	25,91	0,095	22,78	22,69	0,127	22,51	22,51	0,008	23,97	23,99	0,024
40B	25,74	25,83	0,135	22,50	22,50	0,000	22,36	22,38	0,031	23,70	23,76	0,084
40B	25,93	25,83	0,135	22,50	22,50	0,000	22,40	22,38	0,031	23,82	23,76	0,084
41A	25,28	25,32	0,062				22,73	22,68	0,077	23,80	23,75	0,072
41A	25,37	25,32	0,062				22,63	22,68	0,077	23,69	23,75	0,072
41B	25,40	25,46	0,090	23,75	23,79	0,049	22,79	22,84	0,061	23,52	23,57	0,075
41B	25,53	25,46	0,090	23,82	23,79	0,049	22,88	22,84	0,061	23,63	23,57	0,075
47A	22,96	23,08	0,166	23,57	23,56	0,011	24,27	24,25	0,025	25,10	25,06	0,057
47A	23,20	23,08	0,166	23,55	23,56	0,011	24,24	24,25	0,025	25,02	25,06	0,057
47B	23,92	23,65	0,376	23,03	23,05	0,026	24,61	24,61	0,007	25,84	25,86	0,036
47B	23,38	23,65	0,376	23,07	23,05	0,026	24,62	24,61	0,007	25,89	25,86	0,036
48A	22,20	22,24	0,057	22,55	22,46	0,120	23,47	23,36	0,154	24,27	24,17	0,134
48A	22,28	22,24	0,057	22,38	22,46	0,120	23,25	23,36	0,154	24,08	24,17	0,134
48B	22,85	22,76	0,135	22,56	22,61	0,065	23,54	23,52	0,023	24,19	24,19	0,008
48B	22,66	22,76	0,135	22,66	22,61	0,065	23,51	23,52	0,023	24,20	24,19	0,008
49A	25,19	24,96	0,334	24,46	24,37	0,131	25,70	25,60	0,144	25,24	25,12	0,156
49A	24,72	24,96	0,334	24,28	24,37	0,131	25,50	25,60	0,144	25,01	25,12	0,156
50A	26,61	26,54	0,091	24,59	24,46	0,173	25,97	25,95	0,035	26,68	26,59	0,130
50A	26,48	26,54	0,091	24,34	24,46	0,173	25,92	25,95	0,035	26,50	26,59	0,130
50B	25,25	25,34	0,121	24,18	24,13	0,070	24,58	24,72	0,202	25,31	25,34	0,047
50B	25,42	25,34	0,121	24,08	24,13	0,070	24,86	24,72	0,202	25,37	25,34	0,047
51A	26,35	26,26	0,124	23,27	23,26	0,004	25,30	25,23	0,102	26,66	26,60	0,075
51A	26,17	26,26	0,124	23,26	23,26	0,004	25,16	25,23	0,102	26,55	26,60	0,075
51B	26,25	26,27	0,039	22,78	22,86	0,112	25,52	25,52	0,001	26,90	26,77	0,193
51B	26,30	26,27	0,039	22,93	22,86	0,112	25,52	25,52	0,001	26,63	26,77	0,193
52A	23,84	23,79	0,061	23,00	22,94	0,077	24,12	24,11	0,022	25,36	25,31	0,081
52A	23,75	23,79	0,061	22,89	22,94	0,077	24,09	24,11	0,022	25,25	25,31	0,081
52B	23,88	23,90	0,022	22,77	22,64	0,196	23,99	24,09	0,142	24,77	24,67	0,134
52B	23,91	23,90	0,022	22,50	22,64	0,196	24,19	24,09	0,142	24,58	24,67	0,134
54A	25,02	24,91	0,167	22,82	22,95	0,180	24,96	24,78	0,256	25,11	25,03	0,119
54A	24,79	24,91	0,167	23,07	22,95	0,180	24,59	24,78	0,256	24,94	25,03	0,119
54B	24,94	24,88	0,085	22,61	22,50	0,159	24,57	24,54	0,054	25,08	24,89	0,260
54B	24,82	24,88	0,085	22,38	22,50	0,159	24,50	24,54	0,054	24,71	24,89	0,260
55A	24,21	24,34	0,184	23,13	23,07	0,086	24,65	24,56	0,123	25,04	25,01	0,036
55A	24,47	24,34	0,184	23,01	23,07	0,086	24,48	24,56	0,123	24,99	25,01	0,036
55B	23,83	23,86	0,046	22,88	22,88	0,004	24,03	24,11	0,110	24,44	24,38	0,097
55B	23,89	23,86	0,046	22,87	22,88	0,004	24,19	24,11	0,110	24,31	24,38	0,097
57A	23,39	23,58	0,266	23,26	23,20	0,084	24,86	24,76	0,138	26,13	26,02	0,161
57A	23,77	23,58	0,266	23,14	23,20	0,084	24,67	24,76	0,138	25,90	26,02	0,161
57B	23,07	23,12	0,071				23,75	23,78	0,045	24,83	24,84	0,005
57B	23,17	23,12	0,071				23,81	23,78	0,045	24,84	24,84	0,005
63A	25,09	25,23	0,190	23,10	23,10	0,001	26,07	25,96	0,153	24,53	24,44	0,122
63A	25,36	25,23	0,190	23,10	23,10	0,001	25,85	25,96	0,153	24,36	24,44	0,122
63B	25,26	25,29	0,045	23,59	23,44	0,215	26,08	26,03	0,074	24,83	24,75	0,111
63B	25,32	25,29	0,045	23,29	23,44	0,215	25,97	26,03	0,074	24,67	24,75	0,111
66A	24,23	24,32	0,135				25,88	25,82	0,084	25,30	25,24	0,089
66A	24,42	24,32	0,135				25,76	25,82	0,084	25,18	25,24	0,089

Anexos

66B	24,59	24,61	0,037	22,88	22,85	0,054	25,80	25,87	0,100	25,56	25,57	0,018
66B	24,64	24,61	0,037	22,81	22,85	0,054	25,94	25,87	0,100	25,58	25,57	0,018
67A	25,44	25,36	0,113	24,25	24,20	0,061	25,20	25,18	0,030	26,16	26,08	0,108
67A	25,28	25,36	0,113	24,16	24,20	0,061	25,16	25,18	0,030	26,01	26,08	0,108
67B	25,33	25,31	0,028	23,99	24,06	0,102	24,97	25,10	0,191	26,12	26,05	0,099
67B	25,29	25,31	0,028	24,13	24,06	0,102	25,24	25,10	0,191	25,98	26,05	0,099
69A	26,02	26,10	0,113				25,63	25,54	0,126	26,01	25,85	0,224
69A	26,18	26,10	0,113				25,45	25,54	0,126	25,69	25,85	0,224
69B	26,15	26,14	0,009	24,06	23,98	0,118	25,59	25,65	0,077	25,87	25,91	0,066
69B	26,14	26,14	0,009	23,90	23,98	0,118	25,70	25,65	0,077	25,96	25,91	0,066
6A	24,24	24,29	0,060	22,96	22,76	0,287	22,30	22,15	0,219	24,40	24,18	0,303
6A	24,33	24,29	0,060	22,56	22,76	0,287	21,99	22,15	0,219	23,97	24,18	0,303
6B	24,58	24,58	0,002	22,96	23,13	0,240	22,22	22,19	0,055	24,20	24,13	0,091
6B	24,58	24,58	0,002	23,30	23,13	0,240	22,15	22,19	0,055	24,07	24,13	0,091
70A	25,49	25,55	0,089	24,12	24,13	0,021	24,97	24,92	0,059	25,78	25,78	0,008
70A	25,62	25,55	0,089	24,15	24,13	0,021	24,88	24,92	0,059	25,77	25,78	0,008
70B	25,62	25,66	0,052	22,87	22,93	0,085	24,98	25,09	0,157	25,59	25,74	0,220
70B	25,70	25,66	0,052	22,99	22,93	0,085	25,20	25,09	0,157	25,90	25,74	0,220
72A	24,80	24,97	0,238	24,71	24,71	0,003	26,03	26,05	0,036	26,58	26,54	0,055
72A	25,14	24,97	0,238	24,71	24,71	0,003	26,08	26,05	0,036	26,51	26,54	0,055
72B	24,97	25,01	0,046	24,72	24,64	0,123	26,44	26,34	0,152	26,75	26,86	0,157
72B	25,04	25,01	0,046	24,55	24,64	0,123	26,23	26,34	0,152	26,97	26,86	0,157
74A	24,73	24,74	0,024	23,60	23,42	0,244	25,13	25,02	0,155	26,79	26,62	0,243
74A	24,76	24,74	0,024	23,25	23,42	0,244	24,91	25,02	0,155	26,45	26,62	0,243
74B	24,23	24,18	0,079				24,08	24,05	0,044	25,12	25,09	0,047
74B	24,12	24,18	0,079				24,02	24,05	0,044	25,05	25,09	0,047
80A	27,02	27,17	0,211	20,68	20,75	0,102	26,14	26,13	0,010	26,97	26,91	0,083
80A	27,32	27,17	0,211	20,82	20,75	0,102	26,13	26,13	0,010	26,85	26,91	0,083
80B	27,26	27,30	0,056	17,96	17,94	0,020	26,25	26,29	0,053	27,07	27,07	0,000
80B	27,34	27,30	0,056	17,93	17,94	0,020	26,32	26,29	0,053	27,08	27,07	0,000
88A	25,46	25,57	0,154	22,94	23,05	0,145	26,09	26,13	0,064	27,76	27,75	0,022
88A	25,68	25,57	0,154	23,15	23,05	0,145	26,18	26,13	0,064	27,73	27,75	0,022
88B	24,67	24,81	0,196	22,12	22,03	0,128	25,77	25,58	0,265	27,45	27,35	0,142
88B	24,95	24,81	0,196	21,93	22,03	0,128	25,39	25,58	0,265	27,25	27,35	0,142
89A	23,26	23,37	0,153	22,94	22,92	0,019	23,24	23,25	0,016	24,89	24,84	0,068
89A	23,48	23,37	0,153	22,91	22,92	0,019	23,26	23,25	0,016	24,79	24,84	0,068
89B	23,77	23,80	0,039	22,00	22,07	0,105	23,68	23,74	0,086	25,05	25,06	0,022
89B	23,83	23,80	0,039	22,14	22,07	0,105	23,80	23,74	0,086	25,08	25,06	0,022
8A	31,73	31,83	0,139	26,84	26,74	0,147	28,92	28,95	0,047	30,41	30,28	0,178
8A	31,93	31,83	0,139	26,63	26,74	0,147	28,99	28,95	0,047	30,16	30,28	0,178
8B	32,40	32,20	0,294	24,50	24,57	0,097	29,55	29,53	0,035	30,62	30,77	0,215
8B	31,99	32,20	0,294	24,64	24,57	0,097	29,50	29,53	0,035	30,92	30,77	0,215
90A	24,81	24,85	0,056	22,95	22,94	0,018	22,96	22,98	0,022	24,08	24,04	0,058
90A	24,89	24,85	0,056	22,93	22,94	0,018	22,99	22,98	0,022	24,00	24,04	0,058
90B	24,72	24,80	0,112	22,93	22,96	0,041	22,78	22,84	0,077	23,93	23,96	0,041
90B	24,88	24,80	0,112	22,98	22,96	0,041	22,89	22,84	0,077	23,99	23,96	0,041
93A	27,47	27,41	0,093	22,99	22,97	0,027	24,58	24,65	0,098	24,89	24,87	0,032
93A	27,34	27,41	0,093	22,95	22,97	0,027	24,72	24,65	0,098	24,85	24,87	0,032
93B	27,27	27,30	0,041	23,29	23,35	0,092	24,28	24,31	0,044	24,83	24,77	0,074
93B	27,33	27,30	0,041	23,42	23,35	0,092	24,34	24,31	0,044	24,72	24,77	0,074
96A	26,72	26,79	0,100	22,44	22,48	0,049	23,23	23,20	0,039	24,93	24,99	0,084
96A	26,86	26,79	0,100	22,51	22,48	0,049	23,18	23,20	0,039	25,04	24,99	0,084
96B	26,93	26,97	0,059	23,76	23,72	0,064	23,26	23,28	0,020	24,76	24,85	0,120
96B	27,02	26,97	0,059	23,67	23,72	0,064	23,29	23,28	0,020	24,93	24,85	0,120
97A	22,95	23,02	0,108	24,32	24,28	0,055	25,19	25,17	0,039	25,16	25,20	0,061
97A	23,10	23,02	0,108	24,24	24,28	0,055	25,14	25,17	0,039	25,25	25,20	0,061
97B	22,86	23,02	0,219	20,99	20,96	0,045	25,70	25,75	0,074	25,92	25,90	0,021
97B	23,17	23,02	0,219	20,93	20,96	0,045	25,81	25,75	0,074	25,89	25,90	0,021
98A	22,17	22,24	0,105	23,85	23,73	0,173	24,21	24,12	0,125	25,15	24,89	0,373
98A	22,32	22,24	0,105	23,61	23,73	0,173	24,03	24,12	0,125	24,62	24,89	0,373
98B	22,10	22,10	0,009	22,61	22,54	0,092	24,07	23,97	0,138	23,81	23,84	0,048
98B	22,11	22,10	0,009	22,48	22,54	0,092	23,87	23,97	0,138	23,88	23,84	0,048
PoolA	20,91	20,91	0,006	19,98	20,00	0,022	19,67	19,72	0,061	20,27	20,29	0,041

Anexos

PoolA	20,91	20,91	0,006	20,01	20,00	0,022	19,76	19,72	0,061	20,32	20,29	0,041
PoolB	21,03	21,11	0,121	19,97	19,92	0,075	19,23	19,28	0,075	19,96	19,93	0,052
PoolB	21,20	21,11	0,121	19,87	19,92	0,075	19,34	19,28	0,075	19,89	19,93	0,052

Anexos

7.3 Anexo C

Características clínicas e fenótipo tumoral dos adenomas hipofisários e RQ dos genes avaliados.

N	ID	Sexo	Diag.	MDT (cm)	Tamanho	INVASAO	SIRT1	SIRT2	SIRT3	SIRT4	SIRT5	SIRT6	SIRT7	CDKN1A	CDKN2A	PTTG
1	50	F	ACNF	2.6	MACRO	NAO	3.1	0.9	0.4	0.9	0.6	0.5	0.4	0.0	0.0	1.5
2	26	F	ACNF	2.3	MACRO	SIM	5.5	5.8	0.5	0.3	0.3		0.2	7.2	0.2	6.6
3	55	M	ACNF	4.2	MACRO	SIM	4.2	0.2	0.2	0.1	0.7	0.1	0.1	0.0	0.0	0.8
4	51	M	ACNF	2.5	MACRO	NAO	0.8	0.7	0.9	0.9	0.9	0.7	0.8	0.1	0.0	1.7
5	61	M	ACNF	3.2	MACRO	SIM	1.1	0.3	0.3	0.2	1.1	0.1	0.0	0.1	0.4	1.6
6	66	F	ACNF	3.3	MACRO	SIM	9.5	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	2.8
7	62	M	ACNF	6.0	MACRO	SIM	2.5	0.2	1.3	0.3	1.6	0.7	1.6	0.0	0.0	15.6
8	56	M	ACNF	3.4	MACRO	NAO	10.3	0.1	0.2	0.3	1.3	0.0	0.0	0.1	0.0	2.2
9	57	F	ACNF	3.5	MACRO	NAO	1.7	0.8	0.3	0.7	1.9	0.3	0.1	0.2	0.0	3.3
10	55	F	ACNF	4.0	MACRO	SIM	2.5	0.9	0.5	2.3	1.2	0.5	0.5	0.2	0.0	2.3
11	69	F	ACNF	2.8	MACRO	SIM	0.9	0.3	0.4	0.3	0.5	0.2	0.2	0.1	0.0	1.5
12	61	F	ACNF	2.4	MACRO	SIM	1.7	0.7	0.4	0.8	1.0	0.6	0.8	0.1	0.0	2.3
13	45	F	ACNF	1.2	MACRO	NAO	1.9	0.6	0.4	1.2	0.8	0.4	0.2	0.0	0.3	1.7
14	19	M	ACNF	1.2	MACRO	NAO	1.3	0.6	0.2	1.6	2.1	0.6	0.1	0.8	2.4	3.3
15	39	F	ACNF	2.2	MACRO	NAO	1.6	0.5	0.2	0.6	2.1	0.0	0.1	0.0	0.4	2.7
16	47	F	ACNF	2.6	MACRO	NAO	1.7	1.4	0.9	0.4	2.4	1.5	1.3	3.9	0.0	2.0
17	57	M	ACNF	2.7	MACRO	SIM	1.8	0.6	0.4	0.5	1.3	0.4	0.7	0.1	0.3	1.4
18	25	F	ACNF	2.8	MACRO	NAO	1.6	0.2	0.1	0.2	0.9	0.0	0.1	0.0	0.2	1.2
19	33	F	ACNF	3.0	MACRO	SIM	3.1	0.3	0.6	0.5	1.0	1.4	0.6	4.0	0.4	0.7
20	61	F	ACNF	2.8	MACRO	SIM	7.4	1.4	0.6	0.7	1.3	0.6	0.6	1.2	0.0	3.0
21	17	M	ACNF	4.0	MACRO	SIM	1.1	0.6	0.2	0.0	1.7	0.4	0.1	0.0	0.0	11.9
22	52	M	ACNF	5.2	MACRO	SIM	1.3	0.1	0.2	3.2	1.4		1.3	0.0	0.0	3.2
23	45	M	ACNF	4.1	MACRO	SIM	0.9	0.5	0.1	0.1	0.6	0.6	0.0	0.3	0.0	0.6
24	64	F	ACNF	5.4	MACRO	SIM	0.8	0.3	0.2	0.4	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7
25	76	M	ACNF	2.5	MACRO	NAO	3.4	0.6	0.2	0.5	1.5	0.6	0.1	1.2	0.1	1.2

Anexos

26	58	M	ACNF	1.6	MACRO	NAO	2.7	1.3	1.0	1.5	2.0	0.4	0.2	0.5	0.4	2.7
27	73	F	ACNF	3.7	MACRO	SIM	2.4	0.4	0.1	4.3	8.3		0.5	0.0	0.0	2.0
28	84	M	ACNF	5.1	MACRO	SIM	1.2	0.4	0.2	2.8	2.4		3.3	0.0	0.1	0.7
29	71	F	ACNF	3.3	MACRO	SIM	1.9	0.6	0.3	0.5	1.5	0.2	0.2	0.0	0.1	1.6
30	31	M	ACNF	4.2	MACRO	NAO	1.0	0.4	0.2	0.3	1.2		1.6	0.0	0.0	1.2
31	64	M	ACNF	3.7	MACRO	NAO	5.3	0.5	1.9	0.1	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	13.1
32	33	F	GH	2.9	MACRO	SIM	2.5	0.7	0.0	6.4	6.5	0.9	5.8	2.2	0.2	
33	51	F	GH	4.8	MACRO	SIM	4.3	1.2	0.5	2.8	2.2		0.6	0.2	0.5	5.2
34	39	M	GH	2.6	MACRO	SIM	4.5	1.2	1.2	1.5	2.2	0.8	0.7	4.5	1.2	4.0
35	42	F	GH	4.0	MACRO	SIM	1.9	0.4	0.4	0.1	0.6	0.6	0.5	0.6	0.3	3.4
36	32	M	GH	2.3	MACRO	SIM	2.1	0.4	1.2	0.8	4.2	0.4	0.3	0.9	1.3	2.9
37	41	F	GH	3.5	MACRO	SIM	9.1	1.3	0.9	0.1	3.5	2.3	0.0	7.6	5.2	2.4
38	34	M	GH	1.6	MACRO	NAO	26.4	0.5	0.6	2.2	6.8		0.2	3.3	23.4	6.2
39	24	M	GH	1.6	MACRO	NAO	14.4	0.3	1.2	0.2	0.4	0.2	0.0	1.9	0.7	8.0
40	64	F	GH	1.3	MACRO	SIM	2.5	1.9	0.7	0.8	1.4	1.3	1.0	1.6	2.1	0.6
41	44	M	GH	2.3	MACRO	NAO	132.3	0.8	0.5	1.6	1.8	0.7	1.1	0.8	0.8	3.3
42	71	F	GH	1.8	MACRO	SIM	22.3	0.6	0.7	1.5	2.9	0.2	0.4	3.3	3.3	7.0
43	37	F	GH	1.4	MACRO	NAO	2.1	1.0	0.6	1.7	1.1	1.1	0.9	2.2	0.3	0.5
44	39	M	GH	0.8	MICRO	NAO	2.3	0.5	0.3	0.8	0.8	0.2	0.2	0.6	0.7	3.4
45	54	F	GH	2.2	MACRO	NAO	3.7	0.5	0.4	0.6	0.9	0.3	0.1	1.4	0.1	2.3
46	61	F	GH	1.1	MACRO	NAO	3.3	1.8	0.8	5.6	0.8	0.9	1.2	1.0	0.6	4.2
47	51	F	GH	2.5	MACRO	SIM	2.9	0.3	0.3	0.9	1.3	0.0	0.6	0.0	0.1	2.1
48	29	F	GH	1.8	MACRO	NAO	1.8	0.5	0.4	0.4	1.1		0.0	0.3	0.0	1.8
49	30	F	GH	2.2	MACRO	SIM	3.2	0.7	0.6	1.8	1.7	0.6	0.6	1.4	0.0	1.4
50	58	M	GH	0.6	MICRO	NAO	4.9	0.9	1.0	0.6	1.7	1.2	0.8	5.2	0.2	1.5

Anexos

51	48	F	GH	1.1	MACRO	NAO	4.2	1.2	1.0	3.7	1.4	1.0	1.8	1.4	0.2	2.7
52	21	F	GH	3.4	MACRO	SIM	1.6	0.6	0.6	1.5	1.1	0.6	0.5	1.0	0.8	1.6
53	48	M	GH	0.8	MICRO	NAO	6.2	0.8	0.6	1.0	1.5	0.6	0.5	1.5	6.7	2.8
54	37	F	GH	3.7	MACRO	SIM	10.4	1.3	1.4	2.0	2.4	1.4	1.6	1.9	1.0	5.8
55	40	M	GH	5.9	MACRO	SIM	1.6	1.2	0.3	1.2	1.7	1.3	0.9	3.6	0.1	1.3
56	34	M	GH	3.4	MACRO	SIM	2.3	1.9	0.4	1.1	1.3	1.4	1.5	4.4	0.2	3.1
57	37	F	GH	2.2	MACRO	SIM	3.7	1.1	0.7	1.5	1.5	1.7	2.1	1.7	0.4	3.9
58	40	F	GH	1.5	MACRO	NAO	3.1	2.5	0.7	2.6	1.6	2.3	1.5	2.0	0.6	0.7
59	54	F	GH	1.2	MACRO	SIM	2.4	0.6	0.5	1.2	1.3	0.5	0.5	1.0	3.1	0.6
60	26	F	GH	2.0	MACRO	SIM	1.9	1.1	0.9	2.3	1.6	1.1	1.3	0.5	3.9	1.7
61	48	M	GH	0.9	MICRO	NAO	56.7	0.3	0.4	0.5	1.0		0.4	0.7	7.7	4.5
62	41	F	GH	1.3	MACRO	SIM	3.0	0.8	0.6	0.7	1.0	0.7	0.5	1.3	0.5	2.0
63	59	F	GH	1.1	MACRO	NAO	2.3	1.5	0.7	0.2	1.1	1.4	0.6	0.9	0.0	0.3
64	53	F	GH	2.2	MACRO	SIM	2.7	2.4	1.2	7.9	1.9	1.6	1.9	1.6	0.2	2.9
65	57	F	GH	1.7	MACRO	NAO	2.2	0.3	0.3	0.6	1.1		0.1	0.3	4.9	1.0
66	44	F	GH	2.0	MACRO	SIM	2.4	0.6	0.4	1.2	1.3	0.6	0.6	0.8	0.5	2.4
67	29	M	GH	2.7	MACRO	SIM	3.9	1.9	0.3	0.9	1.3	1.8	0.7	3.6	0.3	6.0
68	46	M	GH	2.7	MACRO	SIM	9.7	0.5	0.3	2.7	0.4	0.5	0.1	0.7	0.1	1.1

N: número; **ID:** idade ao diagnóstico; **Diag:** diagnóstico; **MDT:** maior diâmetro tumoral.

7.4 Anexo D

Valores das dosagens hormonais dos pacientes com somatotropinomas

N	GH	IGF1	ULNR-IGF1	Remissão hormonal
32	47.8	1141	297	NAO
33	1261.0	1074	233	NAO
34	183.0	1206	277	NAO
35	99.0	1136	261	NAO
36	121.8	1245	297	NAO
37	6.7	501	277	NAO
38	25.0	1150	297	NAO
39	15.1	1078	341	NAO
40	12.9	1102	207	NAO
41	0.8	386	261	SIM
42	14.3	1588	184	NAO
43	7.7	305	227	NAO
44	3.6	1029	277	SIM
45	37.9	1072	233	NAO
46	2.9	724	207	NAO
47	20.6	1297	233	NAO
48	34.2	1092	270	NAO
49	34.9	608	321	NAO
50	2.9	661	220	NAO
51	27.2	997	246	NAO
52	71.3	1433	342	NAO
53	3.6	1090	246	SIM
54	156.7	1051	277	NAO
55	7.8	934	277	NAO
56	33.8	812	297	NAO
57	29.6	1523	277	NAO
58	15.9	1114	277	NAO
59	3.7	815	233	NAO
60	1.7	350	270	NAO
61	8.4	976	246	SIM
62	6.3	931	261	NAO
63	3.5	1032	220	NAO
64	22.5	729	190	SIM
65	6.6	806	172	SIM
66	148.8	1087	261	NAO
67	76.6	895	322	NAO
68	5.1	920	246	NAO

ULNR: *upper limit normal range*

7. REFERÊNCIAS

1. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev*. 2007;87(3):933-63.
2. Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*. 2003;112(11):1603-18.
3. Dasen JS, Rosenfeld MG. Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:327-55.
4. Molitch ME. Nonfunctioning pituitary tumors and pituitary incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(1):151-71, xi.
5. Pinto EM, Bronstein MD. [Molecular aspects of pituitary tumorigenesis]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(4):599-610.
6. Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev*. 1998;19(6):798-827.
7. Ironside JW. Best Practice No 172: pituitary gland pathology. *J Clin Pathol*. 2003;56(8):561-8.
8. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*. 2004;101(3):613-9.
9. 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;126(1):123-35.
10. Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV, Cusimano MD, Kovacs K. Aggressive pituitary adenomas--diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(7):423-35.
11. 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*. 1993;33(4):610-7; discussion 7-8.
12. Moreno CS, Evans CO, Zhan X, Okor M, Desiderio DM, Oyesiku NM. Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer Res*. 2005;65(22):10214-22.
13. Liu W, Matsumoto Y, Okada M, Miyake K, Kunishio K, Kawai N, et al. Matrix metalloproteinase 2 and 9 expression correlated with cavernous sinus invasion of pituitary adenomas. *J Med Invest*. 2005;52(3-4):151-8.

14. Turner HE, Nagy Z, Esiri MM, Harris AL, Wass JA. Role of matrix metalloproteinase 9 in pituitary tumor behavior. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(8):2931-5.
15. Mete O, Ezzat S, Asa SL. Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol.* 2012;49(2):R69-78.
16. Marcotte R, Wang E. Replicative senescence revisited. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002;57(7):B257-69.
17. Gilman AG, Simon MI, Bourne HR, Harris BA, Long R, Ross EM, et al. Overview of the Alliance for Cellular Signaling. *Nature.* 2002;420(6916):703-6.
18. Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(5):257-66.
19. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999;13(12):1501-12.
20. Denicourt C, Dowdy SF. Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev.* 2004;18(8):851-5.
21. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(7):482-96.
22. Itahana K, Dimri GP, Hara E, Itahana Y, Zou Y, Desprez PY, et al. A role for p53 in maintaining and establishing the quiescence growth arrest in human cells. *J Biol Chem.* 2002;277(20):18206-14.
23. Chesnokova V, Melmed S. Pituitary tumour-transforming gene (PTTG) and pituitary senescence. *Horm Res.* 2009;71 Suppl 2:82-7.
24. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol.* 1996;16(3):859-67.
25. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(24):13742-7.
26. Loughran O, Malliri A, Owens D, Gallimore PH, Stanley MA, Ozanne B, et al. Association of CDKN2A/p16INK4A with human head and neck keratinocyte replicative senescence: relationship of dysfunction to immortality and neoplasia. *Oncogene.* 1996;13(3):561-8.
27. Reznikoff CA, Yeager TR, Belair CD, Savelieva E, Puthenveetil JA, Stadler WM. Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells. *Cancer Res.* 1996;56(13):2886-90.

28. Manojlovic-Gacic E, Skender-Gazibara M, Popovic V, Soldatovic I, Boricic N, Raicevic S, et al. Oncogene-Induced Senescence in Pituitary Adenomas--an Immunohistochemical Study. *Endocr Pathol*. 2016;27(1):1-11.
29. Alexandraki KI, Munayem Khan M, Chahal HS, Dalantaeva NS, Trivellin G, Berney DM, et al. Oncogene-induced senescence in pituitary adenomas and carcinomas. *Hormones (Athens)*. 2012;11(3):297-307.
30. Wang Y, Liang Y, Vanhoutte PM. SIRT1 and AMPK in regulating mammalian senescence: a critical review and a working model. *FEBS Lett*. 2011;585(7):986-94.
31. Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*. 2008;452(7186):492-6.
32. Van Meter M, Mao Z, Gorbunova V, Seluanov A. SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells. *Cell Cycle*. 2011;10(18):3153-8.
33. Yacub-Usman K, Richardson A, Duong CV, Clayton RN, Farrell WE. The pituitary tumour epigenome: aberrations and prospects for targeted therapy. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(8):486-94.
34. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med*. 2009;27(5):351-7.
35. Chalkiadaki A, Guarente L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(10):608-24.
36. Vassilopoulos A, Fritz KS, Petersen DR, Gius D. The human sirtuin family: evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics*. 2011;5(5):485-96.
37. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(2):793-8.
38. Nakagawa T, Guarente L. Sirtuins at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 6):833-8.
39. Song NY, Surh YJ. Janus-faced role of SIRT1 in tumorigenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1271(1):10-9.
40. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 2001;107(2):149-59.
41. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*. 2001;107(2):137-48.
42. Ikenoue T, Inoki K, Zhao B, Guan KL. PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain. *Cancer Res*. 2008;68(17):6908-12.

43. Wong S, Weber JD. Deacetylation of the retinoblastoma tumour suppressor protein by SIRT1. *Biochem J.* 2007;407(3):451-60.
44. Yuan J, Minter-Dykhouse K, Lou Z. A c-Myc–SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation. *J Cell Biol.* 1852009. p. 203-11.
45. Pillai VB, Sundaresan NR, Gupta MP. Regulation of Akt signaling by Sirtuins: Its implication in cardiac hypertrophy and aging. *Circ Res.* 2014;114(2):368-78.
46. Holloway KR, Calhoun TN, Saxena M, Metoyer CF, Kandler EF, Rivera CA, et al. SIRT1 regulates Dishevelled proteins and promotes transient and constitutive Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(20):9216-21.
47. Zhang Y, Zhang M, Dong H, Yong S, Li X, Olashaw N, et al. Deacetylation of cortactin by SIRT1 promotes cell migration. *Oncogene.* 2009;28(3):445-60.
48. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell.* 2010;38(6):864-78.
49. Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Campbell J, et al. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One.* 2008;3(4):e2020.
50. Rajendran R, Garva R, Krstic-Demonacos M, Demonacos C. Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:368276.
51. Villalba JM, Alcain FJ. Sirtuin activators and inhibitors. *Biofactors.* 2012;38(5):349-59.
52. Saunders LR, Verdin E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene.* 2007;26(37):5489-504.
53. Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol.* 2007;27(24):8807-14.
54. Li Y, Matsumori H, Nakayama Y, Osaki M, Kojima H, Kurimasa A, et al. SIRT2 down-regulation in HeLa can induce p53 accumulation via p38 MAPK activation-dependent p300 decrease, eventually leading to apoptosis. *Genes Cells.* 2011;16(1):34-45.
55. Bell EL, Guarente L. The SirT3 Divining Rod Points to Oxidative Stress. *Mol Cell.* 2011;42(5):561-8.
56. Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, et al. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell.* 2010;17(1):41-52.

57. Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer Cell*. 2011;19(3):416-28.
58. Nasrin N, Wu X, Fortier E, Feng Y, Bare OC, Chen S, et al. SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells. *J Biol Chem*. 2010;285(42):31995-2002.
59. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 2006;124(2):315-29.
60. Zwaans BMM, Lombard DB. Interplay between sirtuins, MYC and hypoxia-inducible factor in cancer-associated metabolic reprogramming. *Dis Model Mech*. 2014. p. 1023-32.
61. Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev*. 2006;20(9):1075-80.
62. Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, Kostin S, Boettger T, Kubin T, et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res*. 2008;102(6):703-10.
63. Cohen DE, Supinski AM, Bonkowski MS, Donmez G, Guarente LP. Neuronal SIRT1 regulates endocrine and behavioral responses to calorie restriction. *Genes Dev*. 2009;23(24):2812-7.
64. Monteserin-Garcia J, Al-Massadi O, Seoane LM, Alvarez CV, Shan B, Stalla J, et al. Sirt1 inhibits the transcription factor CREB to regulate pituitary growth hormone synthesis. *Faseb j*. 2013;27(4):1561-71.
65. Akieda-Asai S, Zaima N, Ikegami K, Kahyo T, Yao I, Hatanaka T, et al. SIRT1 Regulates Thyroid-Stimulating Hormone Release by Enhancing PIP5Kgamma Activity through Deacetylation of Specific Lysine Residues in Mammals. *PLoS One*. 2010;5(7):e11755.
66. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):RESEARCH0034.
67. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004;64(15):5245-50.
68. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

69. Bosch-Presegué L, Vaquero A. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer*. 2011;2(6):648-62.
70. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997;88(5):593-602.
71. Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol*. 2000;35(3):317-29.
72. Jeong SM, Xiao C, Finley LW, Lahusen T, Souza AL, Pierce K, et al. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. *Cancer Cell*. 2013;23(4):450-63.
73. Kaidi A, Weinert BT, Choudhary C, Jackson SP. Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. *Science*. 2010;329(5997):1348-53.
74. Kawahara TL, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell*. 2009;136(1):62-74.
75. Yu J, Qin B, Wu F, Qin S, Nowsheen S, Shan S, et al. Regulation of Serine-Threonine Kinase Akt Activation by NAD⁺-Dependent Deacetylase SIRT7. *Cell Rep*. 2017;18(5):1229-40.
76. Shin J, He M, Liu Y, Paredes S, Villanova L, Brown K, et al. SIRT7 represses Myc activity to suppress ER stress and prevent fatty liver disease. *Cell Rep*. 2013;5(3):654-65.