VIVIANE CRISTINA LONGUINI

**Identificação de moduladores genéticos em uma grande
família com neoplasia endócrina múltipla (NEM1)**

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

Programa de: Endocrinologia

Orientador: Dr. Rodrigo de Almeida Toledo

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Longuini, Viviane Cristina

Identificação de moduladores genéticos em uma extensa família com neoplasia endócrina múltipla (NEM1) / Viviane Cristina Longuini. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.

Orientador: Rodrigo de Almeida Toledo.

Descritores: 1.Neoplasia endócrina múltipla tipo 1 2.Genes supressores de tumor 3.Gene supressor de tumor p27Kip1 4.Genes neoplásicos 5.Moduladores de fenótipo

USP/FM/DBD-037/11

DEDICATÓRIA

À Deus, que por incondicional amor, nos capacita, ilumina nossos caminhos e acrescenta em conhecimento e sabedoria.

Aos meus pais, Roberto Longuini e Zilda Ferreira Longuini por terem me dado uma base sólida familiar, pela dedicação, paciência, amor e carinho e incentivo que me transmitiram por todos esses anos.

Ao meu esposo Jorge Eduardo de Menezes, fiel e amoroso que neste tempo se mostrou incansável, incentivador, paciente, compreensivo nos momentos de minha ausência e minha fonte inspiradora para as minhas conquistas.

Ao professor Dr. Sérgio Pereira de Almeida Toledo e Dr. Rodrigo de Almeida Toledo, por serem exemplo de generosidade, dedicação e sabedoria. Tenho a honra de tê-los como orientadores.

EPÍGRAFE

**“Porque melhor é a sabedoria do que jóias, e de tudo o que se
deseja nada se pode comparar com ela.”**

Provérbios 8:11

**“Se, porém, algum de vós necessita sabedoria peça-a a Deus,
que a todos dá com generosidade e bondade.”**

Tiago 1:5

(Bíblia Sagrada)

AGRADECIMENTOS

Ao longo de nossa vida, encontramos pessoas que se mostram parte fundamental de nossa história, pois em diversos momentos as encontramos próximas, independente de sua própria condição humana, e essas pessoas são capazes de alterar o curso de nossas vidas por isso agradeço a todos, em especial.

À Deus, por sua presença constante me fortalecendo e me guiando, por todas as oportunidades e desafios que me fizeram hoje uma profissional melhor capacitada, e uma mulher mais segura para realizar todos os objetivos que Ele sonhou para minha vida.

Aos meus queridos irmãos Sérgio e Andréia, cunhada Lucia Cristina, sobrinhos Alex e Giovani, avó Vicentina, sogra Mara Garolla e cunhado Júlio Cesar pelo permanente apoio e incentivo, por tudo que representam e são em minha vida.

À todos os pacientes e familiares que através de sua compreensão e valor a vida, sobrepuseram suas dores e tornaram esse trabalho possível.

Ao Professor Dr. Sergio Pereira de Almeida Toledo, por compartilhar seus conhecimentos, ajudando a alicerçar e aprimorar o meu perfil profissional e humano, tendo-o como exemplo de um pesquisador idôneo, honesto e ético em todos os aspectos de sua atuação.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo de Almeida Toledo, pelos momentos de dedicação e “noites mal dormidas” de trabalho intenso, à confiança em mim depositada para realização deste projeto, por permitir transformar um objetivo em uma realidade, a você todo o meu sincero apreço e compromisso, seu exemplo de pesquisador, profissional e cristão me são patentes e referenciais em minha vida.

Aos médicos Dr. Delmar Muniz Lourenço Junior, Dra. Flavia Coutinho, Dra. Tatiana Denk e Dra. Joya Emilie Correia-Deur pela presteza e dedicação, e por fornecerem os dados clínicos que acrescentaram um valor inestimável a este trabalho.

As colegas de pós-graduação, Elisangela Quedas, Juliana Arantes de Azevedo, Michelle Buscarilli de Moraes, Roxanne Hatanaka, Tomoko Sekiya por dividirem comigo não só conhecimentos e a prática profissional, mas como também momentos únicos de descontração, alegria e amizade vividos em simpósios, congressos e viagens que estreitaram nossos laços, sei que nosso crescimento científico e profissional continuará de forma ímpar.

Aos profissionais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por todo apoio, suporte e acessibilidade durante os anos de execução deste trabalho. Em especial aos funcionários da Unidade de Endocrinologia Genética – LIM 25, Eliete Helena Santiago, Geni Rodrigues Santos, Dra. Joya Emilie Correia-Deur, Maria das Graças Cavalcanti que diariamente, através de seu convívio e competência me permitiram alcançar os meus objetivos de forma tranqüila e produtiva.

Aos Professores Doutores Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso, Dr. Marcello Delano Bronstein e Dr. Ricardo Jureidini por contribuírem com preciosas sugestões e observações na minha qualificação, acrescentando na finalização deste trabalho.

À Cida secretária de pós-graduação da endocrinologia, pela dedicação, auxílio e apoio.

Ao CNPq-CAPES, pelo apoio financeiro e científico, à Unidade de Endocrinologia Genética pelo espaço e estrutura, à Secretaria de Pós-graduação e à Fundação Faculdade de Medicina pelo suporte para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Considerações Gerais.....	2
1.2	Neoplasias Endócrinas Múltiplas	3
1.3	Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM1).....	5
1.3.1	Definição.....	5
1.3.2	Histórico	7
1.4	Aspectos clínicos da NEM1.....	8
1.4.1	Hiperparatireoidismo.....	8
1.4.2	Tumores entero-pancreáticos na NEM1	12
1.4.2.1	Gastrinoma	13
1.4.2.2	Insulinoma.....	15
1.4.2.3	Outros Tumores entero-pancreáticos na NEM1.....	16
1.4.3	Tumores hipofisários na NEM1.....	16
1.4.4	Outros tumores na NEM1	19
1.5	Seguimento clínico da NEM1 / Consenso NEM1	19
1.6	A NEM1 no Brasil.....	21
1.7	Aspectos Moleculares na NEM1	22
1.7.1	Mutações no gene <i>MEN1</i>	23
1.7.2	Tumorigênese na NEM1.....	27
1.7.2.1	O modelo clássico da tumorigênese na NEM1	27
1.7.2.2	Questões ainda não compreendidas sobre a tumorigênese na NEM1	28
1.8	Evidências do envolvimento de outro(s) gene(s) na NEM1	30
1.8.1	Gene p27(Kip1)/CDKN1B	31
1.8.2	Gene que codifica a proteína que interage com o receptor Aril Hidrocarbono - <i>Aryl Hydrocarbon Receptor interacting protein (AIP)</i>	33
2	OBJETIVO.....	35

3	PACIENTES	37
3.1	Extensa família com MEN1	38
3.2	Peculiaridades clínicas dos pacientes brasileiros com NEM1	40
3.3	Pacientes controles	41
4	MÉTODOS	42
4.1	Extração de DNA.....	43
4.2	Protocolo de Amplificação Gênica	43
4.3	Protocolo de Sequenciamento Gênico	45
4.3.1	Purificação dos produtos de PCRs	45
4.3.2	Reação de sequenciamento	46
4.3.3	Reação de precipitação	47
4.3.4	Sequenciamento automático	47
4.3.5	Análise do sequenciamento.....	47
4.4	Estatística.....	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Análise de mutação germinativa nos genes <i>AIP</i> e <i>p27Kip1</i>	50
5.2	Polimorfismos no gene <i>AIP</i>	50
5.3	Polimorfismos no gene <i>p27kip1</i>	51
5.4	Hiperparatireoidismo	56
5.5	Tumor hipofisário.....	56
5.6	Tumor entero-pancreático	57
5.7	Carcinóide	57
5.8	Malignidade.....	58
5.9	Análise <i>in silico</i> do polimorfismo p.V109G	59
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÕES.....	68
8	REFERÊNCIAS	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

Ca: Cálcio sérico

CMT: Carcinoma medular de tireóide

CNC: Síndrome de Carney

FEO: Feocromocitoma

FSH: Hormônio folículo estimulante.

FSHoma: tumores hipofisários produtores de FSH

FIPA: Tumores hipofisários familiares isolados

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GA: Gastrinomas

GAe: Gastrinomas esporádicos

GH: Hormônio de crescimento

HC: Hospital das Clínicas de SP

HIP: Tumores hipofisários

HPT: Hiperparatiroidismo

HPTe: Hiperparatireoidismo esporádico

LH: Hormônio luteinizante

LOH: Perda de heterozigose, referente à inativação somática de gene supressor de tumor (LOH, do inglês *Loss of Heterozygosity*)

NEM : Neoplasia Endócrina Múltipla

NEMs : Neoplasias Endócrinas Múltiplas

NEM1: Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1

NEM1F: Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 familiar

NEM2: Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2

TNF: Tumor não-funcionante

NF: Neurofibromatose

NF-1: Neurofibromatose tipo 1

PCR: *Polymerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase

PP-oma: tumores produtores do polipeptídeo pancreático

PRL: Prolactina

PRKAR1A: *Protein Kinase A (PKA) type 1-a regulatory subunit (R1a)*

PTH: paratormônio

PTX: paratireoidectomia total com implante no antebraço

RM: Ressonância magnética

SNC: Sistema Nervoso Central

TAC: Tomografia axial computadorizada

TEPs: tumores entero-pancreáticos

TSH: Hormônio tireo-estimulante

TSHoma: tumor produtor de TSH

TUs: Tumores

VHL: Von Hippel-Lindau

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais glândulas afetadas na NEM1.....	6
Figura 2: Funções e interações da proteína MENIN	25
Figura 3: A MENIN interage e suprime a atividade de transcrição dependente do JunD	26
Figura 4: Tumorigênese na NEM1. Modelo clássico de dois eventos mutacionais para genes supressores de tumor e provável presença de fatores moduladores.....	27
Figura 5: Uma nova função para a proteína MENIN foi recentemente caracterizada.	32
Figura 6: A genealogia da extensa família brasileira com NEM1, ilustrando grande variabilidade clínica	38
Figura 7: Seqüenciamento automático do gene <i>MEN1</i> mostrando acima a mutação c.308delC localizada no éxon 2	39
Figura 8: Gráfico ilustrando grande variabilidade inter-familiar na NEM1.....	40
Figura 9: Polimorfismo c.-79C>T do gene <i>p27Kip1</i> , em heterozigose	51
Figura 10: Polimorfismo p.V109G do gene <i>p27Kip1</i>	52
Figura 11: Visualização da MENIN e p27 não mutados no ciclo-celular. ...	65
Figura 12: A proteína MENIN mutada (inativada) não interage com RNA polimerases e metil-transferases e deixa de regular a expressão do <i>p27Kip1</i> , levando a baixa expressão dessa proteína envolvida no controle do ciclo-celular	66
Figura 13: Nossos dados indicam que o genótipo GG do polimorfismo p.V109G do gene <i>p27Kip1</i> estaria associado a um pior prognóstico e risco a um risco maior de desenvolvimento de tumores mais agressivos entre os pacientes com a mutação c.308delC no gene <i>MEN1</i>	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Neoplasias endócrinas múltiplas.....	4
Tabela 2:	Diferenças entre HPT/NEM-1 e o HPTe	10
Tabela 3:	Diferenças entre os gastrinomas associados à NEM1 e os gastrinomas esporádicos.	14
Tabela 4:	Complexidade e variabilidade clínica da NEM1	18
Tabela 5:	Rastreamento clínico periódico para pacientes com NEM1 ou indivíduos sob-risco	20
Tabela 6:	Lista dos <i>primers</i> desenhados para a análise do gene <i>p27(Kip1)/CDKN1</i>	44
Tabela 7:	Lista dos <i>primers</i> utilizados para a análise do gene <i>AIP</i>	45
Tabela 8:	Frequência alélica e genotípica do polimorfismo <i>p27Kip1</i> p.V109G.....	53
Tabela 9:	Análise de correlação entre os polimorfismos identificados no gene <i>p27kip1</i> e as manifestações clínicas dos familiares com NEM1	54
Tabela 10:	Resultados da análise estatística dos polimorfismos c.-79C>T e p.V109G no gene <i>p27kip1</i> dos pacientes com a mutação <i>MEN1</i> c.308delC	59
Tabela 11:	Avaliação do polimorfismo p.V109G do gene <i>p27Kip1</i> no câncer de mama e no carcinoma oral de células escamosas....	62

RESUMO

Longuini VC. *Identificação de moduladores genéticos em uma grande família com neoplasia endócrina múltipla (NEM1)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 81p.

A Neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (NEM1; OMIM 131100) é uma síndrome endócrina hereditária, que envolve tumores nas glândulas paratireóides, pâncreas endócrino/duodeno e hipófise. Mutações germinativas no gene supressor de tumor *MEN1* são identificadas em aproximadamente 80% dos casos familiares. Os casos restantes podem apresentar grandes deleções no gene *MEN1* (raras), não identificáveis ao seqüenciamento direto, ou mutações em outros genes, ainda pouco conhecidos. Recentemente, mutações germinativas em genes que codificam quinases dependentes de ciclinas, como o gene supressor de tumor *p27Kip1*, foram identificadas em cerca de 1-2% dos pacientes NEM1 sem mutação no gene *MEN1*. Esses pacientes apresentam uma clínica similar à NEM1, sendo chamada de NEM-like ou NEM4. Estudos *in vitro* mostraram que a proteína codificada pelo gene *MEN1*, MENIN, controla a expressão gênica de *p27Kip1*, indicando que ambos os genes fazem parte da mesma via celular supressora de tumor. Devido à correlação genótipo-fenótipo ser muito fraca nessa síndrome e à grande variabilidade fenotípica encontrada em pacientes com NEM1 (mesmo entre indivíduos/familiares que possuem mesma mutação no gene *MEN1*), no presente estudo investigamos a hipótese do envolvimento do gene *p27Kip1*, e de outro gene supressor de tumor recentemente associado com um fenótipo tumores hipofisários famílias, o gene *AIP*, como possíveis moduladores de fenótipo entre os pacientes com NEM1 de uma extensa família brasileira com a mutação germinativa *MEN1* c.308delC e ampla variabilidade fenotípica. Dentre uma série de variáveis clínicas investigadas, observamos um possível papel modulador de fenótipo do gene *p27Kip1* nesta família com NEM1. Foi encontrada associação significativa entre o genótipo do polimorfismo p.V109G do gene *p27Kip1*, localizado em um domínio de ligação com a proteína p38 (que é um regulador negativo de p27 por levar à degradação dessa proteína), com os seguintes aspectos clínicos: maior agressividade do tumor hipofisário (macro vs. microadenomas), precocidade no desenvolvimento do tumor pancreático, e presença de carcinóides e metástases nos pacientes analisados ($p < 0,05$). Não foi observada nenhuma associação do gene *AIP* e o fenótipo dos pacientes com NEM1. O presente estudo investigou, pela primeira vez, o *status* germinativo do gene *p27Kip1* em pacientes com mutação *MEN1* e identificou uma associação significativa em relação à susceptibilidade e agressividade dos tumores na coorte estudada.

Descritores: 1.Neoplasia Endócrina múltipla tipo 1 2.Genes supressores de tumor 3.Gene supressor de tumor *p27Kip1* 4.Genes neoplásicos 5.Moduladores de fenótipo

SUMMARY

Longuini VC. *Identification of modifying genetic factors in a large family with multiple endocrine neoplasia type 1* [dissertação]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 81p.

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) is an inherited tumoral syndrome that involves tumors in the parathyroids, anterior pituitary and in the pancreatic islet(s) cells. Germline mutations in the tumor suppressor gene *MEN1* are detectable through direct sequencing in the majority (80%) of the patients with familial MEN1. The remaining patients may present large *MEN1* gene deletions, not detectable through direct sequencing, or mutations in other genes, so far largely unknown. Recently, rare mutations in genes that encode cyclin-dependent kinases, as *p27Kip1*, have been reported in approximately 1-2% of the patients without a *MEN1* mutation. These patients were reported as presenting a MEN1-like (or the MEN4) syndrome phenotype. *In vitro* studies have demonstrated that the protein encoded by the *MEN1* gene, MENIN, controls the expression of the *p27Kip1* gene and, therefore, these two genes seem to act in the same intracellular tumor suppressor pathway. Due to the lack of genotype-phenotype correlation in MEN1 and the large clinical variability usually observed within unrelated patients carrying the same *MEN1* mutation, we hypothesized that *p27Kip1* (as well as *AIP* gene, recently associated with familial predisposition to pituitary tumors) may act as phenotypic modifying gene(s) in the MEN1 syndrome. Herein, we analyzed possible correlations between *p27Kip1* genotype and a number of clinical features. We identified significant statistic associations between the p.V109G *p27Kip1* polymorphism and phenotype manifestations, indicating a potential role of *p27Kip1* in modifying MEN1 phenotype, as follows: pituitary tumor size; early development of pancreatic tumors, and presence of carcinoids and metastasis ($p < 0,05$). In addition, a possible association with the *AIP* gene was excluded. The present study analyzed, for the first time, the germline status of *p27Kip1* gene in *MEN1*-mutated patients and identified a potential interaction between the genotype of this tumor suppressor gene in regulating susceptibility and the tumor aggressiveness in MEN1 patients.

Descriptorss: 1.Multiple endocrine neoplasia type 1 2.Tumor suppressor genes 3.Tumor suppressor gene *p27Kip1* 4.Neoplastic genes 5.Phenotypic modifiers

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Nos últimos anos houve um avanço considerável no conhecimento da biologia celular e molecular, contribuindo de forma importante nos diagnósticos das doenças hereditárias. Na área da Endocrinologia, as Neoplasias Endócrinas Múltiplas (NEMs) são síndromes bastante estudadas sob o ponto de vista molecular.

Atualmente, com o rastreamento de mutações responsáveis pela NEM tipo 1 (NEM1), podemos identificar os familiares portadores dessas mutações em idade precoce, muitas vezes ainda sem a manifestação clínica da doença. O diagnóstico molecular tem forte impacto tanto diagnóstico clínico, como no tratamento precoce (cirúrgico ou medicamentoso), contribuindo assim com a diminuição da morbi-mortalidade e conseqüentemente melhorando a sobrevida destes pacientes (Lourenço, 2007).

Entretanto, ainda existem muitos pontos não esclarecidos, tais como a susceptibilidade dos pacientes aos tumores envolvidos na NEM1. A questão principal, diz respeito à diversidade de manifestações clínicas intra- e inter-familiar desses pacientes com mutação germinativa e inativadora no gene *MEN1*. Ou seja, familiares que herdaram a mesma mutação *MEN1* e apresentam manifestações clínicas bastante distintas. De uma maneira geral, acredita-se na existência de outros fatores que poderiam estar

envolvidos nessa diversidade de manifestações clínicas, possivelmente fatores moduladores genéticos do gene *MEN1*, que estariam influenciando a expressão fenotípica desses pacientes.

1.2 Neoplasias Endócrinas Múltiplas

As Neoplasias Endócrinas Múltiplas (NEMS) são síndromes endócrinas hereditárias, clinicamente complexas, e que apresentam um padrão de herança autossômica dominante de alta penetrância. As NEMs são caracterizadas pela presença de pelo menos dois tumores envolvendo as três principais glândulas endócrinas alvo em um mesmo paciente, podendo estes serem benignos ou malignos. As manifestações clínicas da doença estão relacionadas de acordo com os genes envolvidos e as glândulas endócrinas afetadas, que resulta principalmente, do excesso de hormônios produzidos por estes tumores (Brandi, 2001).

As principais NEMs identificadas são: Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (NEM1); Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2 (NEM2); Von Hippel-Lindau (VHL); Complexo de Carney (CNC) e Neurofibromatose tipo 1 (NF1) (Tabela 1; Marx, 1999). Essas síndromes são caracterizadas pela presença de mutações germinativas que causam à inativação de genes supressores de tumor ou ativação de proto-oncogenes, envolvidos na regulação da proliferação celular (Marx, 2005).

No presente projeto, focaremos o estudo genético da NEM1.

Tabela 1: Neoplasias endócrinas múltiplas.

Síndrome	Principais Manifestações Clínicas	Genética
NEM1	Adenomas hipofisários Hiperparatireoidismo primário Tumores das ilhotas pancreáticas/duodeno endócrino Tumores do córtex adrenal Angiofibroma cutâneo Lipomas	Mutação inativadora do gene <i>MEN1</i> (11q13), que codifica para a proteína MENIN
NEM2 A, B e o carcinoma medular de tireóide isolado familiar (CMT-F)	Carcinoma Medular de Tireóide Feocromocitoma Hiperparatireoidismo primário	Mutação ativadora do proto-oncogene <i>RET</i> (10q 11.2), que codifica o receptor RET
Neurofibromatose tipo 1	Neurofibroma cutâneo Neoplasias do SNC Manchas café com leite Feocromocitoma hiperparatireoidismo primário Tumor carcinóide produtor de somatostatina Carcinoma renal	Mutação inativadora do gene <i>NF-1</i> (17q11.2), que codifica a proteína NEUROFIBROMINA
Síndrome de Von Hippel-Lindau	Feocromocitoma Tumores das ilhotas pancreáticas Hemangioblastoma do SNC Angiomas da retina Hipernefromas Cistos Viscerais Neurofibromas	Mutação inativadora do gene <i>VHL</i> (3p25), que codifica a proteína ELONGINA
Complexo de Carney	Pigmentação cutânea puntiforme Mixoma Cardíaco Mixoma cutâneo Doença adrenocortical pigmentar nodular primária Tumor de células de Sertoli Acromegalia Schawanoma	Mutação inativadora do gene <i>PRKAR1A</i> (17q22-24), que codifica o domínio regulatório da proteína quinase a (PKA)

1.3 Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM1)

1.3.1 Definição

A Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (OMIM 131100) é uma doença tumoral, de ocorrência familiar ou esporádica, caracterizada essencialmente por sua complexidade e variabilidade clínica (Brandi, 2001; Lourenço, 2006). Na NEM1, podem ocorrer tanto tumores endócrinos quanto tumores não-endócrinos, sendo que mais de 20 tipos diferentes de neoplasias (benignas e malignas, funcionantes e não-funcionantes) já foram associadas a essa doença (Marx, 2005). Usualmente, na segunda década de vida dos pacientes geneticamente predispostos, há desenvolvimento de tumores benignos, enquanto que a partir da 4ª década de vida há um aumento significativo de ocorrência de tumores malignos, os quais levam à morte cerca de um terço (33%) destes pacientes (Wilkinson, 1993; Geerdink, 2003).

Estima-se que a incidência da NEM1 varie de 0,01 a 2,5 por 1.000 casos (Marx, 1999). As manifestações clínicas da doença estão diretamente relacionadas com o órgão afetado e geralmente resultam da hipersecreção hormonal, dos efeitos da massa tumoral e da malignidade (metástase) (Marx, 1999).

As principais glândulas associadas a essa síndrome são: paratireóides, hipófise e pâncreas endócrino/duodeno (Figura 1). As manifestações clínicas mais frequentes de pacientes com NEM1 são: hipogonadismo, galactorréia, infertilidade, defeitos visuais (devido ao prolactinoma); osteoporose, complicações renais como nefrolitíase, e complicações ósseas

(desmineralização óssea, fraturas); choque hipoglicêmico, distúrbios psiquiátricos (devidos ao insulinoma); gastrite, úlcera gástrica, estenose esofágica (devidas ao gastrinoma) (Marx, 1999).

Figura 1: Principais glândulas afetadas na NEM1

O diagnóstico de NEM1 pode ser realizado pela: a) clínica, através do achado de tumores em pelo menos duas das três glândulas endócrinas-alvo principais (paratireóides, hipófise e pâncreas endócrino/duodeno) e/ou b) genética, através da identificação de mutação germinativa no gene *MEN1* (Brandi, 1987; Hoff, 2000; Marx, 2005).

O diagnóstico de NEM1 familiar é realizado na presença de um caso-índice com o diagnóstico de NEM1 com pelo menos um familiar em primeiro grau com tumor em pelo menos uma das três principais glândulas endócrinas-alvo envolvidas na NEM1 (Brandi, 2001). A ausência de história familiar de NEM1 é sugestiva de NEM1 esporádico, que se caracteriza pela associação casual de pelo menos dois tumores NEM1-relacionados, sem a presença de mutação germinativa no gene *MEN1*. Entretanto, cerca de 10% dos casos resultam de mutação *de novo*.

Existem algumas variantes clínicas conhecidas na NEM1, como a NEM1 *Burin*, que é caracterizada pela alta penetrância de prolactinomas, carcinóides e hiperparatireoidismo (HPT), associados a uma baixa penetrância de tumores pancreáticos (Olufemi, 1998).

A maioria dos tumores associados à NEM1 é composta por neoplasias benignas, porém alguns tumores entero-pancreáticos e os carcinóides podem ser malignos, sendo estes a principal *causa mortis* associada à NEM1 (Geerdink, 2003).

1.3.2 Histórico

O primeiro caso de NEM1 foi relatado por Erdheim em 1903, que descreveu um paciente apresentando as quatro glândulas paratireóides aumentadas, em associação a um adenoma pituitário eosinofílico que foi reconhecido em necropsia, devido às manifestações clínicas associadas à acromegalia (Erdheim, 1903). Posteriormente, ocorreram relatos de que

necrópsias realizadas em pacientes acromegálicos apresentavam novos achados de tumores múltiplos nas paratireóides e pâncreas endócrino (Cushing e Davidoff, 1927, Metz, 1994; Delellis, 1995).

Os primeiros relatos de tumores endócrinos em alguns membros de uma mesma família foram realizados por Rossier e Dressler em 1939, demonstrando associação entre a doença ulcerosa péptica e nefrolitíase. A NEM1 é também conhecida como “Síndrome de Wermer” devido à descrição pelo autor que a associação de tumores endócrinos observada era herdada de modo autossômico dominante. Assim, a síndrome foi inicialmente denominada de Adenomatose Endócrina Múltipla (Wermer, 1954), e posteriormente como Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1.

1.4 Aspectos clínicos da NEM1

1.4.1 Hiperparatireoidismo

O hiperparatireoidismo primário (HPT), causado pela hipersecreção do PTH, é geralmente a primeira e a mais freqüente manifestação clínica nos pacientes NEM1 (Brandi, 2001; Verges 2002). Comumente, o diagnóstico de HPT na NEM1 ocorre entre os 12 e 28 anos de idade, com média de 19 anos (Skogseid, 1994). Existem relatos de HPT/NEM1 em pacientes com idades precoces (entre 4, 8 e 12 anos), sendo que a penetrância aumenta com a idade de tal forma que se aproxima de 95% nos

pacientes com 30 anos e de quase 100% aos 40 anos (Mallette, 1994; Metz, 199; Burgess, 1999).

Em geral, o quadro clínico do HPT/NEM1 tem estágio inicial prolongado e de grau leve, caracterizado por hipercalcemia assintomática associada à elevação moderada do PTH (HPT assintomático). Entretanto, caso não tratado, o HPT/NEM1 pode evoluir gradativamente para uma forma mais grave, com o desenvolvimento de nefrolitíases repetidas, complicações renais, fraqueza muscular, artralguas, osteoporose e um aumento dos riscos de fraturas ósseas nesses pacientes (Bone, 1990; Mallette, 1994; Metz, 1994; Lourenço-Jr, 2010).

As características do HPT/NEM1 diferem das características clássicas do hiperparatireoidismo primário esporádico (HPTe) em vários aspectos. O HPT/NEM1 usualmente apresenta: a) hiperplasia de paratireóides, e mais raramente adenomas; b) maior prevalência de comprometimento de múltiplas glândulas; c) manifestação clínica mais precoce (20-30 anos no HPT/NEM1 vs 50-60 anos, no HPTe); d) ambos os sexos são afetados na mesma proporção (1:1), enquanto que o HPTe ocorre 3 vezes mais em mulheres; e) taxas mais elevadas de recorrência após paratireoidectomia (> 50% vs 2%). O resumo destes dados podem ser observados na Tabela 2, que apresenta a relação das diferenças entre o HPT/NEM-1 e o HPTe (Coutinho, 2010; Lourenço-Jr, 2010).

Tabela 2: Diferenças entre HPT/NEM-1 e o HPTe

ACHADOS	HPT/NEM-1	HPT ISOLADO
TRANSMISSÃO	AUTOSSÔMICO DOMINANTE	ESPORÁDICO
IDADE DE INÍCIO DE HIPERCALCEMIA	2ª E 3ª DÉCADAS IDADE MÉDIA: 18 ANOS	5ª E 6ª DÉCADAS (50-60 ANOS)
PREDOMINÂNCIA SEXUAL (F:M)	1:1	3:1
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	INDISTINGÜÍVEL	INDISTINGÜÍVEL
OUTROS TUMORES ENDÓCRINOS ASSOCIADOS	FREQUENTEMENTE	AUSENTE
INTERAÇÃO ADVERSA COM GASTRINOMA	PRESENTE	AUSENTE
PATOLOGIA	HIPERPLASIA DAS 4 GLÂNDULAS	ADENOMA SIMPLES
TRATAMENTO	PARATIREOIDECTOMIA SUBTOTAL OU TOTAL + IMPLANTE EM ANTEBRAÇO + TIMECTOMIA PROFILÁTICA TRANSCERVICAL	ADENOMECTOMIA
CINTILOGRAFIA	60%	90%
RESULTADO CIRÚRGICO		
CURA IMEDIATA	92%	95%
PERSISTÊNCIA	8%	5%
HIOPARATIREOIDISMO PROLONGADO	5%	2%
RECORRÊNCIA TARDIA	>50%	2%

O diagnóstico de HPT é feito por meio de níveis elevados de cálcio total e iônico, associados à hipercalciúria e níveis altos de PTH, enquanto os níveis de fosfato sérico estão baixos ou permanecem no limite inferior. Ao analisar os níveis de PTH, leva-se concomitantemente em consideração os valores de

cálcio. Desse modo, a presença de PTH com valores no limite superior da normalidade associada à hipercalcemia é sugestiva de HPT, já que em outras causas de hipercalcemia a concentração de PTH estaria suprimida (Bone, 1990).

A lesão histológica das paratireóides mais freqüentemente observada na NEM1 é a hiperplasia difusa ou nodular, sendo que mais tardiamente transformações adenomatosas podem também serem encontradas (Gagel, 1998).

O tratamento do HPT/NEM1 é geralmente cirúrgico, entretanto ainda não existe um consenso claro sobre o melhor momento para a indicação da cirurgia. Nesse sentido, os critérios utilizados para o manejo clínico-cirúrgico dos casos HPT/NEM1 são os mesmos estabelecidos pelo consenso sobre HPTe (Bilezikian, 2009).

Existem basicamente dois procedimentos cirúrgicos para o tratamento do HPT/NEM1: a) paratireoidectomia subtotal e b) paratireoidectomia total seguida de enxerto de tecido paratireoidiano no antebraço não-dominante. Levando-se em conta o acometimento multiglandular e as altas taxas de recidiva de HPT em casos com NEM1, o tratamento cirúrgico indicado é rotineiramente mais extenso que a adenomectomia, freqüentemente realizada no HPT esporádico. Dessa forma, a abordagem cirúrgica que vem sendo utilizada com sucesso no Hospital das Clínicas da FMUSP-SP em casos com HPT/NEM1 é a paratireoidectomia total seguida por implante de tecido paratireóideo no antebraço (Montenegro, 2005).

No intuito de monitorar a real condição do implante, são realizadas dosagens de PTH coletadas acima da drenagem venosa do implante as

quais posteriormente são comparadas com as do antebraço contralateral. Uma desvantagem da paratireoidectomia total é a ocorrência temporária de hipoparatireoidismo pós-cirúrgico, uma vez que o implante começa habitualmente a funcionar parcialmente entre 6 e 12 semanas após a cirurgia e totalmente ao redor de 9-15 meses após a cirurgia. Nesse período, é imprescindível que o paciente faça a reposição de cálcio e calcitriol (Thompson, 1995; Coutinho, 2010).

O tratamento do HPT/NEM1 tem como principais objetivos obter e manter níveis séricos normais de PTH e cálcio, evitar a hipocalcemia, excluir o estímulo hipercalcêmico crônico sobre o possível gastrinoma associado, e excluir o estímulo crônico deletério do excesso de PTH sobre a massa óssea, além de prevenir as complicações renais do HPT (Carling, 2005; Coutinho, 2010; Lourenço-Jr, 2010).

1.4.2 Tumores entero-pancreáticos na NEM1

Os tumores endócrinos entero-pancreáticos (TEPs) ocorrem em aproximadamente 35% dos pacientes com NEM1, sendo que esta prevalência é muito variável dependendo da população estudada (10-85%) (Trump, 1996; Marx, 2005). Em cerca de 10% dos casos com NEM1, os TEPs podem ser a primeira manifestação clínica da doença (Verges, 2002).

A identificação bioquímica dos tumores entero-pancreáticos baseia-se na determinação da glicemia de jejum, gastrina, glucagon, insulina, pró-insulina e cromogranina A séricas (Skogseid, 1999; Brandi, 2001). No entanto,

existe também a necessidade de realizar exames de imagem tais como: tomografia computadorizada ou ressonância magnética, e eventualmente ecografia endoscópica para melhor definição das características destes tumores (Skogseid, 1999). O quadro clínico dos TEPs está diretamente relacionado com o tipo do tumor envolvido e os sinais/sintomas basicamente não diferem dos TEPs não associados à NEM1.

1.4.2.1 Gastrinoma

Os gastrinomas são tumores neuro-endócrinos entero-pancreáticos secretores de gastrina. Na NEM1 (GA/NEM1), o gastrinoma é o TEP funcionante mais freqüente, sendo encontrado em 40-75% dos casos de NEM1.

O GA/NEM1 é usualmente multifocal, contrastando com a manifestação unifocal usualmente verificada nos casos de gastrinomas esporádicos (GAe), como descrito na Tabela 3. Os GA/NEM1 são predominantemente duodenais e múltiplos, apresentam alto potencial maligno, possuem menores taxas de cura que o GA esporádico, constituindo-se na principal *causa mortis* associada à NEM1 (Teh, 1997 e 1998; Lourenço-Jr, 2008).

Mais de 90% dos tumores carcinóides típicos associados à NEM1 são malignos, bem como 25% dos carcinóides brônquicos (Teh, 1997 e 1998; Gibril, 2003). Entretanto, estes tumores carcinóides são relativamente raros na NEM1, com penetrância <10%, aos 40 anos de idade. Por outro lado, apesar de os gastrinomas terem menor ocorrência de malignidade (60%), eles podem estar presentes em até 75% dos casos com NEM1, dependendo da população analisada. Assim, o gastrinoma é considerado o principal tumor associado à mortalidade nessa síndrome (Kouvaraki, 2006).

A ocorrência de metástases está associada à redução significativa da idade média de sobrevida em casos com NEM1 (55,4 anos para homens e 46,8 anos para mulheres), quando comparada com a expectativa de vida da população não afetada (> 70 anos) (Geerdink, 2003).

Tabela 3: Diferenças entre os gastrinomas associados à NEM1 e os gastrinomas esporádicos.

Caracteres	Gastrinoma/NEM1	Gastrinoma esporádico
Herança	autossômica dominante	-
Idade de início da hipergastrinemia	30-50 anos; em geral < 40 anos	50-60 anos; em geral > 40 anos
Proporção sexual (F:M)	1:1	M > F
Outros TUs endócrinos associados	freqüentes	ausentes
TUs pancreáticos não funcionantes	freqüentes	ausentes
Carcinóides gástricos	freqüentes	ausentes
Interações adversas com HPT/hipercalcemia	sim	não
Patologia histológica	múltiplos adenomas; hiperplasia inicial	adenoma isolado
Localização	maioria no duodeno (> 90%)	mais prevalente no pâncreas (duodeno) (60%)
Tratamento clínico	inibidores de bomba de prótons e análogos da somatostatina	inibidores de bomba de prótons e análogos da somatostatina
Tratamento cirúrgico	enucleação de tumores por duodenotomia + pancreatectomia subtotal com enucleação de tumores na cabeça do pâncreas + ressecção ganglionar regional	a) tumores pequenos: enucleação de tumores duodenais ou pancreáticos; b) tumores maiores: duodenectomia ou pancreatectomia parcial + ressecção ganglionar regional*
Cura	< 25%	60%

O tratamento recomendado para o GA/NEM1 consiste inicialmente na administração de bloqueadores da bomba de prótons para o controle da hipersecreção ácida gástrica, seguida de tratamento cirúrgico. Devido à grande dificuldade de alcançar a cura total, as melhores formas de abordagem cirúrgica são bastante debatidas na literatura (Brandi, 2001).

1.4.2.2 Insulinoma

O insulinoma é o segundo tumor pancreático funcionante mais prevalente na NEM1, depois do gastrinoma. O insulinoma é um tumor originário das células beta das ilhotas pancreáticas, sendo o tumor de células das ilhotas mais freqüente na população geral (Delcore, 1994).

A incidência do insulinoma é desconhecida; estima-se que seja de 4 casos por 1 milhão na população geral, com predominância igual em ambos os sexos. (Delcore, 1994). A maior parte dos tumores esporádicos é benigna e somente 10% a 15% dos insulinomas apresentam um comportamento biológico maligno, com invasão capsular e vascular.

Os insulinomas associados à NEM1 diferem-se dos esporádicos por ocorrerem mais precocemente, na 3º e 4º década (vs a 5º década nos esporádicos); por serem geralmente múltiplos; por terem maior incidência de malignidade; ausência de ocorrência de insulinoma/NEM1 extra-pancreático; e por apresentarem maiores taxas de recorrência pós-cirúrgica.

O tratamento do insulinoma é cirúrgico, basicamente com o objetivo de preservar as funções endócrinas e exócrinas pancreáticas e o alívio de sintomas hipoglicêmicos (Brandi, 2001; Metz, 1994).

1.4.2.3 Outros Tumores entero-pancreáticos na NEM1

Outros tumores pancreáticos podem estar relacionados à NEM1 tais como glucagonoma, somatostatinoma, PP-oma, Vipoma e tumores não-funcionantes, porém, todas estas neoplasias são menos freqüentes (Marx, 1999).

1.4.3 Tumores hipofisários na NEM1

Os tumores hipofisários podem ser a primeira manifestação clínica de pacientes com NEM1 em aproximadamente 20% dos casos. Interessante notar que a idade de diagnóstico desses tumores é detectada entre 17 e 65 anos (média de 37 anos) é similar à encontrada nos casos com predisposição familiar a tumores hipofisários isolados (FIPA) e nos casos com tumores hipofisários esporádicos entre 13 a 75 anos (Verges, 2002; Daly, 2006; Toledo, 2007).

A prevalência de tumores hipofisários na NEM1 (HIP/NEM1) pode variar dependendo da população estudada, oscilando entre 16-65%, com uma penetrância entre 20-40% aos 40 anos de idade (Burgess, 1989; Verges, 2002; Lourenço-Jr, 2008). Aproximadamente 80% dos HIP/NEM1 são macroadenomas, em contraste com os casos de tumores hipofisários esporádicos (HIPe) com freqüência de 42% (Verges, 2002). Outra característica específica dos HIP/NEM1 é se apresentarem como multicêntricos e pluri-hormonais (Troillas, 2008).

Dos diversos subtipos de tumores hipofisários, os mais freqüentemente associados à NEM1 são os prolactinomas, adenomas hipofisários secretores de GH, adenomas hipofisários secretores de ACTH e adenomas não-funcionantes, nas seguintes proporções: 76%, 5%, 6% e 20%, respectivamente (Metz, 1994; Corbetta, 1997). Outros tumores hipofisários, como o FSHoma, TSHoma e LHoma (Lourenço, 2009) ocorrem raramente na NEM1, conforme visto na Tabela 4.

Como será discutido mais à diante no presente projeto, estudo recentemente publicado aponta para os tumores HIP/NEM1 como uma interessante e promissora área de pesquisa na NEM1 (Pellegata, 2006).

O diagnóstico clínico e laboratorial seguem os mesmos padrões tanto para os adenomas hipofisários associados à NEM1 como para os adenomas hipofisários esporádicos e o tratamento dos adenomas hipofisários associados à NEM1 não difere do aplicado em adenomas hipofisários esporádicos (Lourenço, 2009; Toledo, 2009).

Tabela 4: Complexidade e variabilidade clínica da NEM1

TUMORES ENDÓCRINOS	TUMORES NÃO-ENDÓCRINOS
Adenoma de paratireóide (>90%)	Lipoma (30%)
Tumores da hipófise anterior (20-40%):	
<ul style="list-style-type: none"> • Prolactinoma (70%) • Co-secretores (10%) • Somatotropinoma (9%) • ACTHoma (4%) • TSHoma (raro) • não funcionante (20%) 	Leiomioma (10%)
Tumores entero-pancreáticos (35%)	
<ul style="list-style-type: none"> • Gastrinoma (40%-75%) * • Insulinoma (10%) • Não-funcionante, incluindo PP (20%)* • Outros: Glucagonoma*, Vipoma*, Somatostatinoma*, etc (2%) 	Angiofibroma (85%) Colagenoma (70%)
Carcinóides:	
<ul style="list-style-type: none"> • Tímico* (2%) • Brônquico* (2%) • Tumor gástrico* (10%) 	Ependimoma (1%) Meningeoma (5%)
Córtex adrenal, N.F. (25%)	
Feocromocitoma (< 1%)	

Obs: Penetrância dos tumores endócrinos e não-endócrinos relacionados à NEM1, aos 40 anos de idade. Baseado em Brandi, 2001, Verges 2002 e Marx, 2005;

* potencialmente maligno; NF, não-funcionante; PP, polipeptídeo polipancreático.

1.4.4 Outros tumores na NEM1

Além dos tumores clássicos acima relatados, muitos outros tumores menos freqüentes foram identificados em pacientes com NEM1 e relacionados a essa síndrome (Tabela 4; Marx, 2005). Dentre eles podemos citar: tumor carcinóide tímico e brônquico, tumores adrenais e tumores carcinóides gástricos. Devido à ampla variabilidade de tumores e manifestações clínicas nesta síndrome, a NEM1 é hoje considerada uma doença complexa e multi-sistêmica (Marx, 2005).

1.5 Seguimento clínico da NEM1 / Consenso NEM1

O Consenso sobre NEMs recomenda que o seguimento clínico periódico para casos com NEM1 deve ser iniciado entre 5-20 anos de idade sendo recomendado para todos os casos diagnosticados com NEM1 e também para os seus familiares potencialmente sob-risco (Tabela 5) (Brandi, 2001). Por se tratar de um procedimento extenso, o seguimento clínico adequado de um paciente com NEM1 é um processo trabalhoso, demorado e que envolve altos custos (Brandi, 2001).

Tabela 5: Rastreamento clínico periódico para pacientes com NEM1 ou indivíduos sob-risco

Tumor	Idade de início do rastreamento (anos)	Testes bioquímicos, anuais	Testes de imagem, a cada 2 anos
HPT	8	CÁLCIO, PTH	-
GASTRINOMA	20	GASTRINA	-
INSULINOMA	5	GLICOSE, INSULINA, PRÓ-INSULINA	-
TUMORES PANCREÁTICOS NÃO-FUNCIIONANTES	15	CRONOGRANINA	US-ENDOSCÓPICO
TUMORES HIPOFISÁRIOS	5	PROLACTINA; IGF-1	RNM
TU. CARCINÓIDES TÍMICOS E BRÔNQUICOS	20	-	TC
TU. CARCINÓIDES GÁSTRICOS*	20	-	ENDOSCOPIA

Brandi, 2001; Newey, 2009.

Em 2001, Brand e *col*, publicaram resultados sobre Consenso de Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 onde determinaram um protocolo com critérios básicos para o diagnóstico e condutas terapêuticas adequadas a serem seguidos, tais como: a) seguimento anual bioquímico associado a seguimento com exames de imagem a cada três anos; b) paratireoidectomia total ou subtotal, crio-preservação das paratireóides e timectomia preventiva; c) uso de inibidores de bomba de próton para o controle de hipersecreção da gastrina; d) cirurgia dos tumores pancreáticos/duodenais deve ser mais extensa em comparação à realizada em casos esporádicos; e) o rastreamento gênico de familiares assintomáticos é importante para a identificação de portadores de mutação, entretanto, a conduta cirúrgica deve ser baseada em critérios clínicos.

1.6 A NEM1 no Brasil

A NEM1 é uma doença ainda relativamente pouco estudada no Brasil. O mais extenso rastreamento clínico da NEM1 vem sendo realizado no Hospital das Clínicas (HC) da FMUSP de São Paulo (Jorge, 2001; Lourenço-Jr, 2007; Toledo 2007; Lourenço-Jr, 2008; Lourenço-Jr, 2010; Coutinho, 2010). Em 2004, foi incorporado um programa de rastreamento de mutações do gene *MEN1*, que contribuiu para o melhor conhecimento dos aspectos genéticos da NEM1 em nosso País. Em 2007, foram publicados os dados referentes ao rastreamento gênico de 154 pacientes sob-risco de NEM1, envolvendo 14 famílias (Toledo, 2007).

Esse rastreamento foi capaz de indicar, a) quais casos deveriam ser incluídos no rastreamento clínico anual de tumores associados à NEM1, e b) quais casos poderiam ser excluídos de tal rastreamento, por não apresentar a predisposição genética para a doença. Ambos os resultados são importantes e altamente informativos na conduta nos casos sob-risco para NEM1. Cinquenta e dois indivíduos possuíam mutação germinativa, tendo sido encaminhados para o rastreamento clínico, enquanto 102 indivíduos sob-risco não haviam herdado mutação, tendo sido esclarecidos sobre o resultado e excluídos do rastreamento clínico anual para NEM1 (Toledo, 2007).

Em outro estudo, analisamos se os resultados deste rastreamento realizado no HC-FMUSP foram relevantes levando-se em conta o manejo dos familiares sob-risco. De relevância, os casos que foram diagnosticados através da análise genética apresentavam manifestações clínicas

consideravelmente mais suaves. Eles eram: a) claramente mais jovens (tinham 11-15 anos a menos); b) usualmente assintomáticos; c) geralmente apresentavam somente um ou nenhum tumor relacionado à NEM1; d) apresentavam tumores em estadio mais precoce; e) não apresentavam tumores malignos; e f) nenhum caso foi a óbito durante o seguimento (Lourenço-Jr, 2007).

Esses dados demonstram que a implementação de um programa de rastreamento genético para a NEM1 em um centro de referência, como o HC-FMUSP, foi um importante avanço que vem colaborando na melhoria do diagnóstico precoce, seguimento e tratamento dessa doença em nosso país. Atualmente, nossa casuística conta com 34 famílias com mutação germinativa MEN1 (Toledo, 2011 – em fase de publicação).

1.7 Aspectos Moleculares na NEM1

Inicialmente, o gene *MEN1* foi localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q13) por análise de ligação e por mapeamento de deleção no DNA genômico do tumor (Larsson, 1988). Esses estudos demonstraram também perda de heterozigose (LOH, *loss-of-heterozygosis*) deste *locus* em tumores endócrinos entero-pancreáticos de pacientes com NEM1, sugerindo que a proteína codificada pelo gene *MEN1* era possivelmente decorrente de um gene supressor de tumor, de acordo com a hipótese de desenvolvimento tumoral elaborada por Knudson (Knudson, 1971).

Após este achado, vários autores de diferentes grupos na Europa e Estados Unidos intensificaram as análises de todos os genes contidos neste *locus*. Em 1989, foi demonstrada perda alélica no cromossomo 11q13 em tumores de paratireóides relacionados e não-relacionados à NEM1, e subsequente, em insulinomas e em tumores hipofisários de pacientes com NEM1 (Larsson, 1988; Thakker, 1993).

Em 1997, o gene *NEM1* foi clonado e seqüenciado por dois consórcios independentes, que isolaram o gene *MEN1* no braço longo do cromossomo 11, região 1, sub-região 3 (11q13) (Chandrasekharappa, 1997; Lemmens, 1997).

O gene *MEN1* possui 9,2 Kb e consiste de 10 éxons (o éxon 1 e 832 bases do éxon 10 não são traduzidos), codifica uma proteína de 610 aminoácidos e de localização intranuclear chamada MENIN (Chandrasekharappa, 1997; Lemmens, 1997; Agarwal, 2005). O seqüenciamento desse gene em pacientes com NEM1 familiar e esporádica documentou mutações inativadoras germinativas e somáticas, indicando sua associação com a doença.

1.7.1 Mutações no gene *MEN1*

Aproximadamente 70-90% dos casos hereditários são encontradas mutações no gene supressor de tumor *MEN1* (Stenson, 2003; Marx, 2005). A ausência de mutações nos outros 10-30% dos casos é atribuída à: a) variação de sensibilidade dos métodos laboratoriais empregados; b)

presença de mutações fora da região codificadora do gene; e c) presença de grandes deleções, que impossibilitariam a amplificação por PCR do alelo mutado (Cavaco, 2002).

Mais de 1.000 mutações inativadoras já foram descritas no gene *MEN1* (Lemos, 2008). Essas mutações encontram-se espalhadas ao longo de todo o gene, tanto por regiões codificadoras como em regiões intrônicas. A maioria das mutações identificadas no gene *MEN1* (descritas no Human Genome Mutation Database, www.hgmd.cf.ac.uk) é constituída por alterações inativadoras clássicas, como: a) mutações pontuais que inserem um sinal de parada da transcrição no códon mutado, chamadas de mutação nonsense; ou b) mutações de mudança de quadro de leitura transcricional (deleções ou inserções), que alteram a seqüência de aminoácidos sintetizados e podem também inserir um sinal precoce de parada da transcrição gênica, chamada de mutações frameshift. Mutações que alteram as fronteiras éxon-íntron e íntron-éxon do gene *MEN1* e mutações pontuais que alteram somente um aminoácido, chamadas mutações missense, são mais raras mais também podem ocorrer (Toledo 2007; Lemos, 2008). As mutações *missense* geralmente estão localizadas em regiões evolutivamente conservadas da proteína MENIN e podem provocar mudanças significativas na conformação espacial e da função dessa proteína supressora de tumor (Pannet, 2001; Yaguchi, 2004; Toledo, 2007).

Estudos clínico-genéticos na NEM1 não demonstraram forte correlação genótipo-fenótipo nessa síndrome, assim como não identificaram sítios específicos que agrupem um grande número de mutações, sítios estes

conhecidos como *hot-spot* mutacionais (Chandrasekhappa, 1997; Stenson, 2003; Marx, 2005). Entretanto, algumas mutações recorrentes, ocorrendo em regiões com repetições curtas de DNA ou com repetições sucessivas de um único nucleotídeo foram localizadas (Kytola, 2001; Toledo, 2007).

As mutações inativadoras no gene *MEN1* estão associadas ao desenvolvimento de tumores endócrinos pela inativação da proteína supressora de tumor MENIN, que é envolvida em processos celulares essenciais, como: controle do ciclo e do crescimento celular, regulação da transcrição gênica através de interações com a JunD, regulação da apoptose, estabilidade genômica e reparo de DNA (Huang, 1999; Wautot, 2000; Agarwal, 2005; Balogh, 2006).

Funções e interações da proteína MENIN

Figura 2: Funções e interações da proteína MENIN (Figura adaptada de Balogh, 2006)

O primeiro mecanismo descrito que trouxe informações sobre a regulação da proliferação celular da MENIN foi pela sua interação com fatores de transcrição, tais como o JunD e AP-1 (Agarwal, 1999). A MENIN interage e suprime a atividade de transcrição dependente do JunD (Figura 3), embora não se saiba como contribui para sua atividade reguladora do crescimento celular. Vale notar que a MENIN não interage com outros membros da família Jun/Fos. A MENIN também interage com diversas outras proteínas, como o SMAD3, um fator de transcrição envolvido na via de sinalização do TGF- β (Greenspan, 2006; Figura 2).

Figura 3: A MENIN interage e suprime a atividade de transcrição dependente do JunD (Agarwal, 2005)

1.7.2 Tumorigênese na NEM1

1.7.2.1 O modelo clássico da tumorigênese na NEM1

O desenvolvimento clássico dos tumores em pacientes com NEM1 ocorre por uma seqüência de dois eventos mutacionais. O primeiro evento refere-se a uma mutação que é herdada (mutação germinativa) e o segundo evento mutacional refere-se a uma mutação que ocorre somente nos tecidos afetados pela doença (mutação somática). Assim, as células dessas glândulas-alvo acumulam duas mutações em ambos os alelos do gene supressor tumoral *MEN1*, causando sua inativação completa (Agarwal, 1997; Figura 4).

Figura 4: Tumorigênese na NEM1. Modelo clássico de dois eventos mutacionais para genes supressores de tumor e provável presença de fatores moduladores (Marx, 2005)

Esse processo de tumorigênese a partir de dois eventos mutacionais explica porque um indivíduo que herdou uma mutação germinativa no gene *MEN1* possui elevada predisposição aos tumores NEM1-relacionados múltiplos, e também porque os casos familiares geralmente apresentam tumores em faixas etárias mais baixas que os casos esporádicos (Knudson, 1971; Agarwal, 1997).

Como os pacientes com NEM1 familiar herdam a inativação de um dos alelos, a ocorrência de apenas mais um evento mutacional (inativação somática) do alelo normal, chamado de perda de heterozigosidade (LOH, *Loss of Heterozygosity*), já favorece o desenvolvimento e progressão do tumor. Já nos pacientes com doença esporádica, há necessidade que ocorra dois eventos somáticos no gene *MEN1* de uma mesma célula das glândulas-alvo para o desencadeamento da tumorigênese (Marx, 2005; Chandrasekharappa, 1997).

1.7.2.2 Questões ainda não compreendidas sobre a tumorigênese na NEM1

Ainda há diversos pontos referentes à susceptibilidade aos tumores envolvidos na NEM1 que ainda não são bem compreendidos e necessitam de estudos mais aprofundados.

A questão principal ainda em aberto diz respeito à diversidade de manifestações clínicas nesses pacientes: *Por que indivíduos com mutação germinativa e inativadora no gene MEN1 (inclusive familiares que herdaram*

a mesma mutação/alelo *MEN1*) apresentam manifestações clínicas tão diversas?

Levando em conta uma equação fundamental da genética: fenótipo = genótipo + ambiente; pode-se supor que pacientes morando em locais/cidades com características ambientais bastante diferentes apresentariam diferentes fenótipos, mesmo se tivessem uma mesma mutação, entretanto, mensurar esse tipo de influência é uma tarefa bastante ampla e complexa. Nossos dados mostram que mesmo irmãos morando em uma mesma cidade e, portanto expostos às mesmas condições ambientais de estresse e poluição (entre outros fatores), apresentam fenótipos referentes aos tumores bastante desiguais. Dessa forma, outros fatores estariam envolvidos nessa diversidade de manifestações clínicas, possivelmente fatores genéticos moduladores de fenótipo.

Sabe-se que o surgimento de um tumor geralmente ocorre por “defeitos” em várias vias celulares, como inativações de vias supressoras de tumor ligadas aos pontos de checagem celular (causadas por mutação inativadora em genes supressores de tumor), e/ou ativações de vias oncogênicas ligadas à regulação do ciclo celular (causadas por mutação ativadora em proto-oncogenes).

Nesse contexto, trata-se de uma hipótese plausível pensar que, outras vias (além da supressora de tumor ligada ao gene *MEN1*) estariam influenciando a tumorigênese na *MEN1*. Isso explicaria porque irmãos que herdaram a mesma mutação *MEN1* (mas eventualmente herdaram diferentes fatores moduladores) podem apresentar fenótipos tão diferentes,

quanto ao: a) tipo de tumor, b) à agressividade tumoral e c) idade de início de aparecimento dos tumores.

1.8 Evidências do envolvimento de outro(s) gene(s) na NEM1

Apesar do *MEN1* ser o principal gene responsável causal pela NEM1, não são encontradas mutações em 10-30% dos casos hereditários, o que geralmente é atribuída à: a) variação de sensibilidade dos métodos laboratoriais empregados; b) presença de mutações fora da região codificadora do gene; e c) presença de grandes deleções, que impossibilitariam a amplificação do alelo mutado (Cavaco, 2002).

Entretanto, mais recentemente tem-se sugerido que a ausência de mutações no gene *MEN1* em casos com NEM1, ao invés de ser causada por limitações técnicas para detecção de mutações, seria causada por uma heterogeneidade molecular nessa doença. Um extenso estudo analisou a presença de grandes deleções (através das técnicas de MPLA / MRC Holland e PCR de longo alcance) e mutações na região promotora de 101 casos com diagnóstico clínico de NEM1 sem mutação no gene *MEN1*; e apenas uma grande deleção foi encontrada (1%) (Vaidya, 2007). Os autores sugerem que a presença de um evento germinativo em outro gene (ou genes) que não o *MEN1* estaria envolvido na determinação do fenótipo da NEM1 nesses 100/101 casos restantes.

1.8.1 Gene *p27(Kip1)/CDKN1B*

Outros artigos, também recentemente publicados, reforçam a hipótese da NEM1 ser uma doença com heterogeneidade genética. Pellegata *et al*, relataram uma família com 3 gerações com NEM1 e que não apresentava mutação no gene *MEN1*, na qual foi identificada uma mutação germinativa no gene *p27(Kip1)/CDKN1B* (Pellegata, 2007).

O gene *p27(Kip1)/CDKN1B* foi clonado e seqüenciado em 1995, está localizado no braço curto do cromossomo 12, região 1, subregião 3 (12p13), contém 3 éxons e codifica uma proteína inibidora de quinase dependente de ciclina, reguladora de processos envolvido no ciclo celular. Estudos do modelo animal (*knock out*) do gene *p27(Kip1)/CDKN1B* indicam uma associação com tumores hipofisários, pois esses animais desenvolvem hiperplasia/tumor hipofisário aos 3 meses de idade (Fero, 1996; Kiyokawa, 1996).

Estudos funcionais demonstraram que a proteína MENIN (codificada pelo *MEN1*) regula a expressão gênica de *p27(Kip1)/CDKN1B*, por intermédio de associação com RNA polimerases e metil-transferases (Karnik, 2005; Fontaniere, 2006). A ausência de MENIN leva a baixa expressão de *p27(Kip1)/CDKN1B*, enquanto a elevação dos níveis de MENIN recompõe a expressão de *p27(Kip1)/CDKN1B*. Esse controle epigenético da expressão de *p27(Kip1)/CDKN1B* pela MENIN pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5: Uma nova função para a proteína MENIN foi recentemente caracterizada. Através de sua interação com RNA polimerases (Pol-II) e metil-transferases (MLL), MENIN é capaz de controlar a expressão de *p27(Kip1)/CDKN1B* (Karnik, 2005; Fontaniere, 2006)

Em conjunto, esses dados sugerem que as manifestações clínicas dos pacientes com NEM1 podem estar possivelmente reguladas pela interação entre as proteínas/genes MENIN e p27. Entretanto, ainda não há estudos que tenham avaliado o gene *p27(Kip1)/CDKN1B* de casos NEM1 típicos, com a mutação *MEN1*.

1.8.2 Gene que codifica a proteína que interage com o receptor Aril Hidrocarbono - *Aryl Hydrocarbon Receptor interacting protein (AIP)*

O *AIP* (*aryl hydrocarbon receptor interacting protein*) é um gene recentemente associado a susceptibilidade a tumores hipofisários familiares (Verimaa, 2006). Esse gene foi clonado e seqüenciado em 1996, está localizado no braço longo do cromossomo 11, região 1, subregião 3.3 (11q13.3), contém 6 éxons, distanciando de 3 Mb do gene *MEN1*. A proteína AIP interage com o receptor aril hidrocarbono (AHR) e está, assim, ligada à via de degradação de poluentes (Meyer, 2000). Mutações germinativas nesse gene foram identificadas em famílias com tumores hipofisários secretores de hormônio de crescimento (GH) e/ou prolactina (PRL) (Verimaa, 2006). Foi relatada perda de heterozigose (LOH) nesses tumores, sugerindo um papel supressor de tumor do *AIP*.

Descrevemos em nosso laboratório uma nova mutação germinativa no gene *AIP*, Y268X, que estava presente em amostras de DNA de dois irmãos que desenvolveram adenoma hipofisário secretor de GH, e conseqüentemente acromegalia, aos 17 e 21 anos de idade (Toledo, 2007b). Essa mutação não estava presente em amostras de DNA de 30 casos com acromegalia esporádica (não-familiar) e em 92 indivíduos controles estudados.

Recentemente, dois casos clinicamente diagnosticados com NEM1, entretanto sem mutação no gene *MEN1*, foram descritos possuírem mutação germinativa no gene *AIP* (Georgitsi M, 2007). Outros estudos descreveram

pacientes com mutação germinativa no gene *AIP* que desenvolveram tumores hipofisários e não-hipofisários (Cazabat, 2007; Beckers, FIPA Meeting-2008, não publicado). Recentemente, nosso grupo analisou o *status* somático do gene *AIP* em tumores não-hipofisários (córtex adrenal e linfoma) de uma paciente com a mutação *AIP* R81X, e verificamos LOH no tumor adrenocortical, sugerindo um possível papel desse gene na tumorigênese do córtex adrenal (Toledo, 2010).

Levando-se em conta as recentes evidências relatadas de que a NEM1 seria possivelmente uma doença com heterogeneidade genética, a busca por marcador(es) genético(s)/gene(s) além do gene *MEN1*, que estariam funcionando como fatores modulares de fenótipo nesses pacientes, é bastante importante para melhor avaliação dessa hipótese. Além disso, esse estudo possibilitaria a expansão do entendimento da tumorigênese nessa doença complexa,

A identificação de possíveis fator(es) modulador(es) de fenótipo, ligados por exemplo a aspectos clínicos como “tipo de tumores”, “agressividade” e/ou “precocidade” de desenvolvimento desses tumores, é um caminho que pode, no futuro, nos encaminhar a novos direcionamentos/recomendações para o rastreamento e o seguimento clínico da NEM1.

2 OBJETIVO

Avaliar a participação dos genes *p27(Kip1)/CDKN1B* e *AIP* como fatores moduladores de fenótipo em pacientes com mutações no gene *MEN1*.

3 PACIENTES

3.1 Extensa família com MEN1

Para a análise de fatores de moduladores na NEM1, foi estudada uma extensa família brasileira, descendente de italianos que imigraram ao redor de 1890 da Zona do Vêneto (Itália) para o Brasil, tendo-se localizado na região de Mocóca interior do Estado de São Paulo. Essa família apresenta a mutação inativadora c.308delC, que está localizada no exon 2 do gene *MEN1*. Esta mutação é do tipo *frameshift*, que leva a uma mudança de quadro de leitura da transcrição e a uma proteína truncada, com 118 aminoácidos (Toledo, 2007).

Figura 6: A genealogia da extensa família brasileira com NEM1, ilustrando grande variabilidade clínica (Lourenço-Jr EJE, 2008)

Na genealogia da figura 6, nota-se grande variabilidade intra-familiar, principalmente relacionado com tumores hipofisários e pancreáticos.

Como o rastreamento clínico e genético dessa família diagnosticada com NEM1 continuou sendo realizado por nosso grupo, novos familiares que foram diagnosticados com a doença durante o período de execução desse projeto, também foram incluídos no estudo.

Todos os indivíduos incluídos nesse estudo leram e assinaram termo de consentimento livre esclarecido aprovado pela Comissão de Ética do HC-FMUSP, CAPPESQ.

Figura 7: Seqüenciamento automático do gene *MEN1* mostrando acima a mutação c.308delC localizada no éxon 2

Em comparação com outras cinco grandes famílias e com dados da literatura, nota-se que na família brasileira incluída no presente estudo (F6) existe uma ampla variabilidade clínica inter-familiar, com elevada prevalência (52%) de tumores hipofisários e pancreáticos, conforme ilustrado pela figura 8 a seguir (Lourenço, 2008).

Figura 8: Gráfico ilustrando grande variabilidade inter-familiar na NEM1. A família brasileira é a família F6 (Lourenço-Jr EJE, 2008). HPT = hiperparatireoidismo; PIT = tumor hipofisário; PRL = prolactinoma; NFPit = PIT não funcionando; PET = tumor entero-pancreático; G = gastrinoma e NFPT = PET não funcionando

3.2 Peculiaridades clínicas dos pacientes brasileiros com NEM1

As manifestações clínicas dos casos afetados estavam de acordo com as referidas na literatura. Em conjunto, o HPT foi o achado clínico mais freqüente (94,2%). A prevalência dos tumores pancreáticos foi de 63,5%

(literatura: 35%-75%), enquanto a prevalência dos adenomas pituitários (52%) foi mais elevada do que a encontrada na literatura (20%-40%) (Lourenço-Jr EJE, 2008). A diferença entre a prevalência de tumores nas grandes famílias com NEM1 (Figura 8) poderia ser explicada devido a existência de fator(es) genético(s) modulador(es) de fenótipo.

Dessa forma, pacientes brasileiros com NEM1 dessa extensa família Brasileira diagnosticada no HC-FMUSP constituem um grupo informativo para análise de modulador(es) de fenótipo na NEM1. Estes pacientes já tiveram vários outros aspectos fenotípicos estudados anteriormente, tais como a massa óssea (Coutinho, 2010; Lourenço, 2008; Lourenço, 2010).

3.3 Pacientes controles

Foram incluídas amostras de DNAs de 174 indivíduos controles, sem histórico de tumores na família.

4 MÉTODOS

4.1 Extração de DNA

Amostras de DNA de leucócitos dos 28 casos anteriormente diagnosticados com NEM1 já haviam sido extraídas e encontravam-se armazenadas em nosso laboratório para estudo. A extração de DNA de sangue periférico de novos casos suspeitos com NEM1 foi realizada através da técnica do sal (Miller, 1988).

4.2 Protocolo de Amplificação Gênica

Foram desenhados *primers* para a amplificação gênica por PCR de toda a região codificadora do gene *p27(Kip1)/CDKN1B*, assim como as fronteiras éxons/introns (*primers*, Tabela 6).

Os *primers* utilizados para a amplificação dos 6 éxons codificantes do gene *AIP* e suas regiões fronteira foram descritos por Vierimaa *et al.* 2006 e estão listados na Tabela 7.

A reação de PCR foi otimizada sob as seguintes condições: Buffer 1 X (200 mmol Tris-Hcl com pH 8.4 e 500 mmol/l de Kcl) e MgCl₂ 2 mM; 0,2 mM de dNTP (Mix dNTP's 25 mM) (Kit Invitrogen, Brasil); 200 ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (senso ou reverso) e 1 U

de *Taq* DNA polimerase. Um único programa foi padronizado para todas PCRs: 95 °C por 5 min seguido por 35 ciclos de 95 °C por 20', 62 °C por 30' e 72 °C por 30'; seguidos por uma extensão final de 10 min, a 72 °C.

Tabela 6: Lista dos *primers* desenhados para a análise do gene *p27(Kip1)/CDKN1*

Primer	Seqüência (5'→ 3')	Produto (pb)
1A F	GTCGGGGTCTGTGTCTTTTG	297
1A R	CCATGTCTCTGCAGTGCTTC	
1B F	TGTCTAACGGGAGCCCTAGC	249
1B R	AGTAGAACTCGGGCAAGCTG	
1C F	AGTTAACCCGGGACTTGGAG	299
1C R	GTCCGACGGATCAGTCTTTG	
1D F	AGGAGAGCCAGGATGTCAGC	312
1D R	GCCAGGTAGCACTGAACACC	
2 F	CTGACTATGGGGCCAACTTC	294
2 R	GCCAGCAACCAGTAAGATCAG	

Primers desenhados com uso do software Primer3 (frodo.wi.mit.edu).

Tabela 7: Lista dos *primers* utilizados para a análise do gene *AIP*

Primer	Seqüência (5'→ 3')	Produto (pb)
1F	CCGAGACATTCCTAGGCTCC	397
1R	CTCTCGCCTAAGGCCTCC	
2F	GGA CTGGACTTCTCCTTGGG	346
2R	GTCTAGCAGAGGGTGGAGGG	
3F	GATGGTGGTGGGGAAGG	359
3R	ACCCCTGGGTGGACAGG	
4-5F	ATGTGGGTCAGGTCTGCTG	587
4-5R	AAAGGCTAGGTCTTGACCCC	
6F	AGGAGACATGAGGGCAGGC	469
6R	AACAGCCACCCAAGTACCAG	

Fonte: Vierimaa, 2006

4.3 Protocolo de Sequenciamento Gênico

4.3.1 Purificação dos produtos de PCRs

Após a confirmação da especificidade da amplificação gênica por eletroforese em gel de agarose, os produtos de PCRs foram purificados com uso de enzima ExoSAP-IT[®] (USB Cooperation). Para cada 5µl do produto de PCR foram adicionados 2µl de ExoSAP-IT[®] e deixado por 1h a 37 °C, seguido por 15min por 80 °C para denaturação das enzimas.

4.3.2 Reação de seqüenciamento

Os produtos de PCRs purificados foram utilizados para preparo das reações de seqüenciamento com kit contendo nucleotídeos fluorescentes (Kit BigDye[®] terminator v.3.1, Applied Biosystems, CA), tampão de seqüenciamento e um *primer*.

O Kit Big Dye é constituído de nucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), buffer, cloreto de magnésio, Ampli Taq DNA polimerase FS e os dideoxinucleotídeos (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) ligados à moléculas fluorescentes de alta sensibilidade denominadas dicloro-rodaminas. As dicloro-rodaminas dicloro R6G, dicloro ROX, dicloro R110 e dicloro TAMRA são ligadas respectivamente às ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP. As dicloro-rodaminas são moléculasceptoras de fluorescência, a 6-carboxi-fluoresceína (6FAM).

As reações de seqüenciamento foram realizadas para um volume final de 10µl contendo: 1µl de Big dye, 2µl de tampão 5X, 1µl do *primer* senso ou reverso (5 pmol/µl), 1-3µl do produto de PCR purificado completando-se o volume final para 10µl com água MilliQ.

As condições de termo-ciclagem para a reação de seqüenciamento foram: 25 ciclos de 10 s 95 °C (denaturação), 10 s 50 °C (anelamento do *primer*) e 1 min de extensão a 60 °C.

4.3.3 Reação de precipitação

- A- Para cada amostra contendo 10µl de reação de seqüenciamento foram acrescentados: 1,0µl de EDTA 125mM; 1,0µl de Acetato de sódio 3mol; 25µl Etanol absoluto;
- B- A solução foi homogeneizada, submetida a um “*spin*” e deixada à temperatura ambiente por 15 min, protegida da luz;
- C- Centrifugação à 2000g por 45min. a 4°C, seguido de remoção de todo o sobrenadante;
- D- Foram adicionados 35µl; seguido de 15 min. de centrifugação 1650g a 4°C;
- E- Ao final da centrifugação, foi removido todo o sobrenadante;
- F- As amostras foram secas em banho seco.

4.3.4 Seqüenciamento automático

O seqüenciamento foi realizado no aparelho seqüenciador ABI-3130XL (Applied Biosystems, Foster City, USA), com 16 capilares.

4.3.5 Análise do seqüenciamento

As análises dos eletroferogramas foram realizadas manualmente, com auxílio de *softwares* de edição de seqüência.

4.4 Estatística

Inicialmente, analisamos se a frequência alélica e genotípica observada nos controles e pacientes encontrava-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (site: www.tufts.edu).

Na sequência, foi realizado o teste do chi-quadrado (χ^2) para avaliar uma possível associação entre os genótipos do gene *p27Kip1* e as manifestações clínicas dos familiares com a mutação *MEN1* c.308delC. Os genótipos foram correlacionados com as seguintes variantes: presença ou ausência de cada tipo de tumor; idade da manifestação, tamanho do tumor, e presença de malignidade. Para as análises estatísticas foi utilizado o software SPSS *statistical package* (v.11.0).

5 RESULTADOS

5.1 Análise de mutação germinativa nos genes *AIP* e *p27Kip1*

Inicialmente, foram seqüenciadas todas as regiões codificadoras e fronteira íntron/éxon dos genes *AIP* e *p27Kip1* de nove familiares adultos com mutação c.308delC. Foram selecionados casos com clínica menos grave (por exemplo, ausência de tumor hipofisário), com clínica relativamente grave (microadenoma hipofisário) e com clínica mais grave (macroadenomas hipofisários). Assim, esses pacientes, por apresentarem manifestações clínicas diferentes / discordantes, representariam adequadamente a variabilidade fenotípica observada nessa família NEM1.

Nenhuma alteração patogênica (mutação germinativa) foi identificada nos genes *AIP* e *p27Kip1* dos pacientes analisados.

5.2 Polimorfismos no gene *AIP*

De acordo com o banco de polimorfismos do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/snp>), já foram descritas as seguintes variantes nas regiões codificadoras do gene *AIP*: p.D44D (rs11811907) e p.L49V (rs1063385) localizados no éxon 2; p.D172D (rs2276020) e p.L214M (rs3210041) localizados no éxon 4; p.K228Q (rs641081) localizado no éxon 5;

p.A297A (rs35665586), p.R307Q (rs4930199) e p.I327I (rs1049565) localizados no éxon 6.

Todas as variantes polimórficas descritas no gene *AIP* se encontravam em homozigose nos familiares analisados.

5.3 Polimorfismos no gene *p27kip1*

Dos cinco polimorfismos anteriormente descritos no gene *p27kip1*, 5'UTR c.-79C>T (rs2066828); p.W15R (rs2066828); p.A55A (rs16908375); p.A56A (rs35456792) e p.V109G (rs35456792), dois deles (o c.-79C>T e o p.V109G), foram encontrados em heterozigose nos familiares analisados.

Figura 9: Polimorfismo c.-79C>T do gene *p27Kip1*, em heterozigose

O polimorfismo c.-79C>T, identificado em heterozigose nos pacientes analisados, leva a uma troca de uma timina por uma citosina no nucleotídeo 79 (c.-79C>T) à *upstream* (antes) do início da transcrição gênica, conforme se pode observar na figura 9.

O segundo polimorfismo encontrado em heterozigose no gene *p27Kip1* dos pacientes foi o p.V109G (Figura 10).

Figura 10: Polimorfismo p.V109G do gene *p27Kip1*

Essa variante genética compreende uma troca de uma timina por uma guanina no nucleotídeo 326 (c.326T>G; sequência referência NCBI NM_004064.3) e está localizado no domínio de ligação de p27 com p38 (amino ácidos 97-151), éxon 1 do gene *p27kip1* (Tomoda, 1999).

Após a genotipagem, foram realizadas análises de frequência alélica e genotípica dos controles saudáveis e dos pacientes portadores de mutação c.308delC da grande família com NEM1. Todas as variantes analisadas se encontravam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Apesar das frequências alélicas dos pacientes e dos controles serem bastante parecidas, as frequências genotípicas divergiram, sendo os genótipos em

homozigose GG (18%) e TT (43%) mais freqüentes nos pacientes, enquanto o genótipo GT se encontrava mais freqüente nos controles (50%) (Tabela 8).

Tabela 8: Freqüência alélica e genotípica do polimorfismo *p27Kip1* p.V109G

Indivíduos	N	Genótipos			Alelos	
		GG	GT	TT	G	T
NEM1	28	5 (18%)	11 (39%)	12 (43%)	21 (37,5%)	35 (62,5%)
Controles	174	20 (11,5%)	87 (50%)	67 (38,5%)	127 (36,49%)	221 (63,51%)

Para avaliarmos um possível papel do gene *p27Kip1* como modulador de fenótipo em pacientes com NEM1 e mutação *MEN1* c.308delC, buscamos identificar correlações estatisticamente significantes entre os genótipos dos polimorfismos c.-79C>T e p.V109G e as manifestações clínicas dos pacientes. Os aspectos clínicos incluídos na análise, assim como os dados genéticos dos pacientes são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Análise de correlação entre os polimorfismos identificados no gene *p27kip1* e as manifestações clínicas dos familiares com NEM1

<i>p27Kip1</i>			Dados clínicos dos familiares com mutação <i>MEN1</i> c.308delC															
c.-79	p.V109G	Hapl	Sexo	Idade NEM1	HPT	Idade HPT	Pit	Idade Pit	História Pit	PRL	NF	Tam	Pet	Idade Pet	Entr. NEM1	Carc	ACT	Malig .
CC	TT	3	F	16	N		S	16	SINT	S	N	Mi	S	16	PIT	N	N	N
CT	TT	5	M	48	S	48	S	48	SINT	S	N	Mi	S	48	HPT	N	S	S
TT	TT	7	M	16	S		S	16	SINT	S	N	Mi	N		PIT	N	N	N
CC	GG	1	M	56	S	56	N		N	N	N		N		HPT	N	N	S
CC	TT	3	F	22	S	24	S	22		S	N	Mi	S	22	PIT	N	N	N
CC	GT	2	M	21	S	23	S	21	SINT	S	N	Ma	S	24	PIT	S	N	S
	GT		M	61	S	61			N	N			N		HPT			
CC	TT	3	F	24	S	24			N	N			S	24	HPT ASSINT	N	N	N
CC	TT	3	M	44	S	41	S	44	ASSINT	N	S	Mi	S	36	HPT	N	S	N
CT	TT	5	M	47	S	47	N		N	N	N		S	47	HPT	N	S	N
CT	GT	4	M	59	S	59	S	63	ASSINT	S	N	Mi	S	59	HPT	S	S	S
CC	GT	2	M	55	S	57	S	55		S	N	Mi	S	65	HPT	N	N	N
CC	GG	1	M	34	S	41	N		N	N	N		N			N	N	N
TT	GT	6	M	54	S	50	S	54	ASSINT	N	S	Mi	S	54	HPT	N	N	N
CC	GT	2	M	24	S	24			N	N			N		HPT			
CC	TT	3	M	33	S	33	N		N	N	N		S	33	HPT	N	S	N
CC	GG	1	F	61	S	54	S	40		S	N	Ma	S	61	PIT	S	1	S

Continua

Conclusão Tabela 9

<i>p27Kip1</i>			Dados clínicos dos familiares com mutação <i>MEN1</i> c.308delC															
CC	GT	2	F	26	S	26	N		N	N	N		N		HPT	N	N	N
CC	GT	2	F	37	S	37	N		N	N	N		S	37	HPT	S	N	S
CT	GT	4	M	23	S	24	N		N	N	N		N		HPT ASSINT	N	N	N
CC	GG	1	M	60	S	60	N		N	N	N		N		HPT	N	1	S
CC	TT	3	F	14	S	14	S	14	ASSINT	N	S	Mi	N		HPT ASSINT	N	N	N
CC	GG	1	F	55	S	55			N	N			N		HPT			
CC	GT	2	F	53	S	53	N		N	N	N		S	53	HPT	N	S	S
CT	TT	5	M	50	S	50	N		N	N	N		S	50	PET	N	S	N
CT	TT	5	M	39	S	39	S	39	ASSINT	N	S	Mi	S	39	HPT	N	S	N

Hapl = haplótipo; Dx = diagnóstico de NEM1; HPT = hiperparatireoidismo; Pit = tumor hipofisário; PRL = prolactinoma; NF = Pit não-funcionante; Tam = tamanho; Pet = tumor entero-pancreático; Entr. = entrada da doença (1ª manifestação clínica); Carc = carcinóide; ACT = tumor adrenocortical; Malig = malignidade / metástase; S = sim; N = não; M = masculino; F = feminino; Mi = microadenoma; Ma = macroadenoma.

5.4 Hiperparatireoidismo

Quanto ao HPT, foram analisados dois aspectos: presença da doença e idade ao diagnóstico. Não foram observadas correlações significantes.

5.5 Tumor hipofisário

Quanto aos tumores hipofisários nos pacientes com NEM1, analisamos se o gene *p27Kip1* estaria associado à manifestação da doença hipofisária quanto à idade ao diagnóstico, história da manifestação da doença (ausência, assintomático, sintomático), tipo do tumor e tamanho da lesão hipofisária.

Dentre essas variáveis, foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre o genótipo do polimorfismo *p27Kip1* p.V109G e tamanho do tumor hipofisário. Dentre os 10 pacientes com lesões < 10 mm (microadenomas), 7 (70%) apresentavam o genótipo TT e os 3 (30%) restantes apresentavam o genótipo GT. A idade média desses pacientes foi de 36,7 anos de idade, variando de 14 a 59 anos. O genótipo GG do polimorfismo p.V109G não foi identificado em nenhum dos 10 pacientes com microadenoma, incluindo 6 pacientes com mais de 39 anos de idade. O genótipo GG do polimorfismo p.V109G só foi identificado em um único paciente, que desenvolveu um macroprolactinoma. O outro familiar com lesão hipofisária > 10 mm apresentava o genótipo GT e foi diagnosticado com um macroprolactinoma aos 21 anos de idade.

5.6 Tumor entero-pancreático

Foi observada uma correlação estatística entre a idade ao diagnóstico do tumor entero-pancreático e os genótipos do polimorfismo p.V109G ($p=0.025$). A média da idade ao diagnóstico de tumor entero-pancreático entre os pacientes com o genótipo GG (N=1) e GT (N=6) foi de 50,4 anos (variando 24 a 65 anos), enquanto a média da idade ao diagnóstico de tumor entero-pancreático entre os pacientes com o genótipo TT foi menor, de 35 anos (variando de 16 a 50 anos).

5.7 Carcinóide

Havia informações sobre o desenvolvimento de carcinóides em 23 familiares. Entre os 4 familiares que desenvolveram carcinóides, 3 (75%) deles apresentavam o genótipo GT para o polimorfismo p.V109G e 1 (25%) apresentava o genótipo GG, enquanto nenhum caso (0%) apresentava o genótipo TT. A frequência dos genótipos do polimorfismo p.V109G dos 19 familiares que não desenvolveram carcinóide diferiu bastante em relação ao primeiro grupo. Três familiares (15,8%) sem carcinóide apresentavam o genótipo GG e 5 (26,3%) apresentavam o genótipo GT, enquanto que a maioria dos familiares (11/19, 57,8%) apresentava o genótipo TT. Tal diferença se mostrou estatisticamente significativa ($p=0.008$). Essa associação não parece ter relação com a idade dos pacientes, visto que nos grupos com

os genótipos GG/GT/TT, 4/5/6 familiares tinham, ao rastreamento para a presença carcinóides, mais que 30 anos de idade, respectivamente.

5.8 Malignidade

Dentre os 23 pacientes cujas informações sobre o rastreamento de malignidade estavam disponíveis, 8 (34,7%) apresentavam um quadro metastático. Destes, 7 (87,5%) apresentavam o genótipo GG (3/7) ou GT (4/7). Notou-se uma clara graduação quanto à frequência de malignidade em relação ao genótipo do polimorfismo p.V109G em nossos casos. Dentre os familiares com o genótipo TT, apenas 1/11 (9%) tinha metástase; dentre os com genótipo GT, 4/8 (50%) desenvolveram metástases, enquanto dentre os familiares com GG, 3/4 (75%) apresentavam um quadro metastático. Essa gradação observada se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,008$).

Nenhuma associação significativa foi encontrada em relação ao polimorfismo c.-79C>T do gene *p27Kip1*.

O resumo dos achados de associação entre os genótipos do polimorfismo p.V109G e as manifestações clínicas dos pacientes estudados pode ser visto na tabela 10.

Tabela 10: Resultados da análise estatística dos polimorfismos c.-79C>T e p.V109G no gene *p27kip1* dos pacientes com a mutação *MEN1* c.308delC

Clínica	N	p.V109G p	c.-79C>T p
<i>Tumor hipofisário</i>			
micro X macro	12 (2)	0.013*	> 0.05
<i>Tumor pancreático</i>			
Idade	16	0.025*	> 0.05
Tumores Carcinóides	23 (4)	0.036*	> 0.05
Malignidade	23 (8)	0.008*	> 0.05

* valores estatisticamente significante

As demais análises realizadas não foram estatisticamente significantes.

5.9 Análise *in silico* do polimorfismo p.V109G

Utilizamos um *software* que analisa a homologia de seqüências e as propriedades físico-químicas dos aminoácidos para prever se determinada alteração pode ser patogênica (SFIT <http://sift.jcvi.org/>). Verificamos que a mudança do aminoácido valina (V) para glicina (G) na posição 109 (p.V109G), é uma troca aparentemente tolerada.

6 DISCUSSÃO

As causas associadas à variabilidade fenotípica observada em diversas síndromes mendelianas, como a NEM1, não são bem conhecidas.

No presente estudo, investigamos a possibilidade de os genes supressores de tumor *p27Kip1* e *AIP*, recentemente associados à síndrome NEM1-like / NEM4 (Pellegata, 2006) e à susceptibilidade a tumores hipofisários familiares (FIPA; Vierimaa, 2006), respectivamente, exercerem um papel modulador de fenótipo em uma extensa família com NEM1 associada à mutação c.308delC, no gene *MEN1* (Toledo, 2007; Lourenço-Jr, 2008).

Inicialmente, verificamos que nenhuma variante patogênica *p27Kip1* ou *AIP* foi identificada nesses pacientes, excluindo a possibilidade de uma segunda mutação estar influenciando o fenótipo dessa família. Além de ausência de mutações, todos os polimorfismos do gene *AIP* foram encontrados em homozigose. Assim, esse gene provavelmente não deve atuar influenciando o fenótipo de pacientes dessa família, tendo sido assim excluído das análises seguintes.

O gene *p27Kip1* apresentava duas variantes polimórficas em heterozigose, a c.-79C>T (rs2066828) e a p.V109G (rs35456792). Todos os familiares com mutação *MEN1* c.308delC foram genotipados para esses polimorfismos e foram realizadas análises estatísticas para se verificar se havia alguma associação entre essas variantes de *p27Kip1* e as manifestações clínicas dos pacientes.

O polimorfismo c.-79C>T se localiza na região não transcrita do gene *p27Kip1* (5' UTR) e foi anteriormente associado a um maior risco de câncer de próstata (Chang BL, 2004). Entretanto, em nossas análises iniciais, nenhuma associação foi encontrada quando analisamos este polimorfismo em nossa casuística ($P>0,05$).

O polimorfismo p.V109G é localizado na região codificadora (éxon 1) do gene *p27Kip1*, mais especificamente em um domínio de ligação de p27 com p38, uma proteína envolvida na degradação de p27 (Tomoda, 1999; Shiraso, 2009). A variante polimórfica p.V109G é a mais comum do gene *p27Kip1* e foi anteriormente associada a um maior risco, pior prognóstico, invasão e progressão tumoral (Tabela 11).

Tabela 11: Avaliação do polimorfismo p.V109G do gene *p27Kip1* no câncer de mama e no carcinoma oral de células escamosas

Tumor	Associação	Referência
Câncer de mama	Risco e prognóstico	Figueiredo, 2007
Câncer de mama	Invasão, linfonodos	Naidu, 2007
Câncer de mama	Pior prognóstico	Schondorf, 2004
Carcinoma de Células Escamosas (Oral)	Risco e progressão	Li, 2004

A baixa expressão de p27 é um fator associado a um pior prognóstico em diversos tumores (revisado por Chu, 2008). Uma vez que o polimorfismo p.V109G se localiza no domínio de degradação de p27, levando a uma menor expressão, este pode ser o motivo pelo qual estudos de câncer de

mama indicarem essa variante como um possível modulador molecular para risco, prognóstico e invasão tumoral (Tabela 11).

Em nosso estudo, analisamos, pela primeira vez, o possível envolvimento do gene *p27Kip1* e mais especificamente da variante p.V109G, em pacientes com NEM1. Nossos dados demonstram que, em nossa casuística, o genótipo GG estava presente de forma mais freqüente em pacientes que desenvolveram tumores hipofisários maiores que 10mm ($p=0,013$).

Além disto, a possível associação do genótipo GG da variante p.V109G com o desenvolvimento de tumores pancreáticos mais precoces ($p=0,025$) e principalmente um possível risco maior ao desenvolvimento de carcinóides ($p=0,036$) e metástases ($p=0,008$), que são as principais causa *mortis* de pacientes com NEM1, tem relevância. Nesse sentido, a genotipagem da variante p.V109G do gene *p27Kip1* poderia ser considerado útil como um marcador molecular de malignidade nesta família.

Do ponto de vista molecular, estudos *in vitro* anteriores mostraram que a proteína MENIN e p27 fazem parte de uma mesma via supressora de tumor e que há comunicação entre essas duas proteínas (Karnik, 2005).

Quando não mutado, o gene *MEN1* codifica uma proteína MENIN íntegra, que forma um complexo com a metiltransferase (MLL) e RNA polimerase II (POL II) e regula a transcrição de *p27Kip1* (Karnik, 2005). Por sua vez, p27 inibe o complexo Ciclina/CDKs e, assim, impede a fosforilação

da proteína retinoblastoma (Rb). O Rb não fosforilado seqüestra o fator de transcrição E2F (responsável pela ativação da passagem da fase G1 para a fase S), regulando assim o ciclo celular (Figura 11).

Quando o gene *MEN1* está mutado ocorre à inativação da MENIN, diminuindo a transcrição do gene *p27Kip1* e causando uma baixa expressão da proteína p27. Assim, p27 deixa de inibir o complexo Ciclina/CDKs, que passa a fosforilar Rb, liberando o fator de transcrição E2F, induzindo a passagem descontrolada da fase G1 para a fase S do ciclo celular e à formação de neoplasias (Karnik, 2005) (Figura 12).

Nossos dados indicam que o polimorfismo p.V109G *p27Kip1* age como um modulador de fenótipo em pacientes com a mutação *MEN1* c.308delC, e estaria associado ao desenvolvimento de neoplasias mais agressivas e metástases. Isso pode explicar porque irmãos que herdaram a mesma mutação *MEN1* podem apresentar fenótipos tão diferentes com relação ao tipo de tumor, à agressividade tumoral e a idade de início de aparecimento dos tumores (Figura 13).

Figura 11: Visualização da MENIN e p27 não mutados no ciclo-celular. A proteína MENIN íntegra interage com RNA polimerases e metil-transferases e controla a expressão do gene *p27Kip1*

Figura 12: A proteína MENIN mutada (inativada) não interage com RNA polimerases e metil-transferases e deixa de regular a expressão do *p27Kip1*, levando a baixa expressão dessa proteína envolvida no controle do ciclo-celular

Figura 13: Nossos dados indicam que o genótipo GG do polimorfismo p.V109G do gene *p27Kip1* estaria associado a um pior prognóstico e risco a um risco maior de desenvolvimento de tumores mais agressivos entre os pacientes com a mutação c.308delC no gene *MEN1*

7 CONCLUSÕES

a) Nossos resultados demonstram que, na extensa família com mutação *MEN1* c.308delC aqui estudada, mutações nos genes *p27Kip1* e *AIP* não são fatores moduladores da variabilidade fenotípica.

b) Nesta mesma população de pacientes, foram encontradas evidências estatisticamente significantes de que a variante p.V109G do gene *p27Kip1* pode agir como um potencial modulador de fenótipo na NEM1, relacionado à agressividade tumoral/malignidade.

8 REFERÊNCIAS

Agarwal SK, Guru SC, Heppner C, Erdos MR, Collins RM. Menin interacts with the AP1 transcription factor jun D and represses jun-D-activated transcription Cell. 1999; 96:143-152.

Agarwal SK, Kester MB, Debelenko LV, Heppner C, Emmert-Buck MR, Skarulis MC, Doppman JL, Kim YS, Lubensky IA, Zhuang Z, Green JS, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Liotta LA, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Burns AL & Marx SJ - Germline mutations of the *MEN1* gene in familial multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *Human Molecular Genetics*, 1997; 6:1169–1175.

Agarwal SK, Kennedy PA, Scacheri PC, Novotny EA, Hickman AB, Cerrato A, Rice TS, Moore JB, Rao S, Ji Y, Mateo C, Libutti SK, Oliver B, Chandrasekharappa SC, Burns AL, Collins FS, Spiegel AM & Marx SJ - Menin molecular interactions: insights into normal functions and tumorigenesis. *Hormone and Metabolic Research*, 2005; 37: 369–374.

Benson L, Ljunghall S, Akerstrom G, Oberg K - Hyperparathyroidism presenting as the first lesion in multiple endocrine neoplasia type 1. *Am J Med*. 1987; 82 (4):731-7.

Bilezikian JP, Potts JT Jr, Fuleihan Gel-H, Kleerekoper M, Neer R, Peacock M - Summary statement from a workshop on asymptomatic primary hyperparathyroidism: a perspective for the 21st century. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:5353 - 5361.

Bone HG. Diagnosis of multiglandular endocrine neoplasias. *Clin Chem* 1990, 36 (5):711-8

Brandi ML, SJ, Aurbach G & Fitzpatrick L. Familial multiple endocrine neoplasia type 1: a new look at pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 1987; 8: 391–405.

Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJ, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BA, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker RV, Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells SA Jr & Marx SJ - Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001; 86:5658–5671.

Burgess JR, Shepherd JJ, Parameswaran V, Hoffman L, Greenaway TM. Spectrum of pituitary disease in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1): clinical, biochemical, and radiological features of pituitary disease in a large MEN 1 kindred. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Jul; 81(7):2642-6.

Burgess JR, David R, Greenaway TM, Parameswaran V, Shepherd JJ. Osteoporosis in multiple endocrine neoplasia type 1: severity, clinical significance, relationship to primary hyperparathyroidism, and response to parathyroidectomy. *Arch Surg*. 1999 Oct; 134(10):1119-23.

Carling T, Udelsman R - Parathyroid surgery in familial hyperparathyroid disorders. *J. Intern. Med*. 2005, 257: 27-37.

Carty SE, Helm AK, Amico JA, Clarke MR, Foley TP, Watson CG & Mulvihill JJ. The variable penetrance and spectrum of manifestations of multiple endocrine neoplasia type 1. *Surgery*, 2003; 124:1106–1114.

Cavaco BM, Domingues R, Bacelar MC, Cardoso H, Barros L, Gomes L, Ruas MM, Agapito A, Garrao A, Pannett AA, Silva JL, Sobrinho LG, Thakker RV & Leite V - Mutational analysis of Portuguese families with multiple endocrine neoplasia type 1 reveals large germline deletions. *Clinical Endocrinology*, 2002; 56:465–473.

Cavaco BM, Domingues R, Bacelar MC et al - Mutational analysis of Portuguese families with multiple endocrine neoplasia type 1 reveals large germline deletions. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 2002; 56:465 – 473.

Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR, Debelenko LV, Zuang Z, Lubensky IA, Liotta LA, Crabtree JS, Wang Y, Roe BA, Weisemann J, Boguski MS, Agarwal SK, Kester MB, Kim YS, Heppner C, Dong Q, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia type1. *Science* 1997; 276: 404–407.

Chang BL, Zheng SL, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, Li G, Walsh PC, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J. A polymorphism in the CDKN1B gene is associated with increased risk of hereditary prostate cancer. *Cancer Res.* 2004 64:1997-9.

Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:253-67.

Costa MH, Candida M, Fragoso BV, Mendonca BB. Gene symbol: MEN1. Disease: MEN1. *Hum Genet.* 2005 Dec; 118(3-4):541.

Corbetta S, Pizzocaro A, Peracchi M et al. Multiple endocrine neoplasia type 1 in patients with recognized pituitary tumors of different types. *Clin Endocrinol* 1997, 47: 507-12.

Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, et al. A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:1118–1123.

Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, McNally SR, Swain GP, Montagna C, Hager JH, Hanahan D, Edlund H, Magnuson MA, Garrett-Beal L, Burns AL, Ried T, Chandrasekharappa SC, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS. Of Mice and MEN 1: Insulinomas in conditional mouse knockout. *Mol Cell Biol.* 2003; 23:6075-85.

Da Silva AM, Maciel RM, Da Silva MR, Toledo SR, De Carvalho MB, Cerutti JM- A novel germ-line point mutation in RET exon 8 (Gly(533)Cys) in a large kindred with familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Nov; 88(11):5438-43.

Dahia PL, Hao K, Rogus J, Colin C, Pujana MA, Ross K, Magoffin D, Aronin N, Cascon A, Hayashida CY, Li C, Toledo SP, Stiles CD - Novel pheochromocytoma susceptibility loci identified by integrative genomics. *Cancer Res.* 2005 Nov 1; 65 (21):9651-8.

Dahia PL, Ross KN, Wright ME, Hayashida CY, Santagata S, Barontini M, Kung AL, Sanso G, Powers JF, Tischler AS, Hodin R, Heitritter S, Moore F, Dluhy R, Sosa JA, Oacal IT, Benn DE, Marcsh DJ, Robinson BG, Schneider K, Garber J, Arum SM, Korbonits M, Grossman A, Pigny P, Toledo SP, Nose V, Li C, Stiles CD. A HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genet.* 2005 Jul; 1(1):72-80. Epub 2005 Jul 25.

Dahia PL, Hayashida CY, Strunz C, Abelin N, Toledo SP - Low cord blood levels of catecholamine from a newborn of a pheochromocytoma patient. Endocrine Genetics Unit, University of São Paulo School of Medicine, Brazil. *Eur J Endocrinol.* 1994 Mar; 130(3):217-9.

Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA, Beckers A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Dec; 91(12):4769-75. Epub 2006 Sep 12.

Delcore R, Friesen SR. Gastrointestinal neuroendocrine tumors. *J Am Coll Surg* 1994, 178: 187-211.

Delellis RA. Biology of disease: multiple endocrine neoplasias syndromes revisited. *Lab Invest* 1995, 75(5):494-505.

Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM: A syndrome of hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85: 733-44, 1996.

Fontaniere S, Casse H, Bertolino P, Zhang CX. Analysis of p27(Kip1) expression in insulinomas developed in pancreatic beta-cell specific Men1 mutant mice. *Fam Cancer.* 2006; 5(1):49-54. PMID: 16528608 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Gagel RF. Polyendocrine disorders: multiple endocrine neoplasia. In Wilson JD, Foster DW. 9 ed. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: Saunders Company, 1998. P. 1537-42.

Geerdink, E.A, Van der Luijt, RB, Lips, C.J. (2003) Do patients with multiple endocrine neoplasia syndrome type 1 benefit from periodical screening? *European Journal of Endocrinology*, 149, 577– 582.

Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, Tuppurainen K, Makinen MJ, Vierimaa O, Paschke R, Saeger W, van der Luijt RB, Sane T, Robledo M, De Menis E, Weil RJ, Wasik A, Zielinski G, Lucewicz O, Lubinski J, Launonen V, Vahteristo P, Aaltonen LA. Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar, 6;104(10):4101-5. Epub 2007 Feb 28.

Gibril F, Chen YJ, Schrump DS, Vortmeyer A, Zhuang Z, Lubensky IA, et al. Prospective study of thymic carcinoids in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88 (3):1066-81.

Grama D, Skogseid B, Wilander E et al. Pancreatic tumors in multiple endocrine neoplasia type 1: clinical presentation and surgical treatment. *World J Surg* 1992, 16: 611-9.

Greenspan FA, Gardner DG. Neoplásia Endócrina Múltipla. 2006. In *Endocrinologia Básica e Clínica*. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Editora Cap. 22, p. 685-690.

Hayashida CY, Alves VA, Kanamura CT, Ezabella MC, Abelin NM, Nicolau W, Bisi H, Toledo SP. Immunohistochemistry of medullary thyroid carcinoma and C-cell hyperplasia by an affinity-purified anti-human calcitonin antiserum. *Cancer*. 1993 Aug; 15;72(4):1356-63.

Hoff AO, Hauache OM. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1): clinical, biochemical and molecular diagnosis and treatment of the associated disturbances. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005 Oct; 49(5):735-46. Review.

Huang SC, Zhuang Z, Weil RJ, et al. Nuclear/cytoplasmic localization of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin. *Lab Invest*. 1999; 79:301–310.

Jorge BH, Agarwal SK, Lando VS, Salvatori R, Barbero RR, Abelin N, Levine MA, Marx SJ, Toledo SP - Study of the multiple endocrine neoplasia type 1, growth hormone-releasing hormone receptor, Gs alpha, and Gi2 alpha genes in isolated familial acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Feb; 86 (2):542-4.

Karnik SK, Hughes CM, Gu X, Rozenblatt-Rosen O, McLean GW, Xiong Y, Meyerson M, Kim SK. Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct; 11;102(41):14659-64. Epub 2005 Sep; 29. PMID: 16195383 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85:721-32, 1996.

Kouvaraki MA, Shapiro SE, Cote GJ, Lee JE, Yao JC, Waguespack SG, et al Management of pancreatic endocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1. *World J Surg.* 2006; 30 (5):643-53.

Lemmens I, Van De Ven WJM, Kas K, Zhang CX, Giraud S, Wautot V et al. Identification of the Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (*MEN1*) gene. The European Consortium on MEN 1. *Hum Molec Genet.* 1997; 6: 1177-1183.

Lemos MC, Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 (*MEN1*): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat* 2008;29:22-32.

Li G, Sturgis EM, Wang LE, Chamberlain RM, Spitz MR, El-Naggar AK, Hong WK, Wei Q. Association between the V109G polymorphism of the p27 gene and the risk and progression of oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:3996-4002.

Lourenco Jr DM, Coutinho FL, Toledo RA, Cavalcanti MG, Montenegro F, Machado MC, Toledo SPA. Variabilidade clínica na Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM-1): Estudo em 39 casos In: 27º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia, 2006, Recife. *Arqu Bras Endocrinol Metab.* 2006; (50): S639.

Lourenco Jr DM, Coutinho FL, Toledo RA, Quedas E, Cavalcanti MG, Montenegro, F, et al. Hiperparatireoidismo Assintomático (HPTa) na Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM-1). *Arqu Bras Endocrinol Metab.* 2006; (50):S608.

Lourenço Jr, DM, Toledo SPA. Neuroendocrinologia Clínica e Cirúrgica. In: Liberman & Cukier. *Neuroendocrinologia Clínica e Cirúrgica*. São Paulo: Lemos Editora, 2002; p.577.

Lourenço-JR DM, Toledo RA, Coutinh, FL, Toledo SPA. The impact of clinical and genetic screening of Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1) at the Hospital das Clínicas, São Paulo. *Clinics*, 2007; 62:465-476.

Lourenço-Jr DM, Toledo RA, Toledo SP. Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1: In: *Tratado de Clínica Médica*, A.C. Lopes (Ed), Editora Roca, 2006; pg 3535-3538.

Lourenco-Jr DM, Toledo RA, Coutinho FL, Toledo SP. The impact of clinical and genetic screenings on the management of the multiple endocrine neoplasia type 1. 2007, August, Clinics.

Maia AL, Gross JL, Punaes MK - Multiple endocrine neoplasia type 2. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005; 49(5):725-34.

Mallette, L. E. Management of hyperparathyroidism in the multiple endocrine neoplasia syndromes and other familial endocrinopathies. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, v. 23, n.1, p. 19-36, 1994.

Marx SJ, Agarwal SK, Heppner C, Kim YS, Kester MB, Goldsmith PK et al. The Gene for Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Bone*, v.25, n.1, p. 119-22, 1999.

Marx SJ, Agarwal SK, Kester MB, Heppner C, Kim YS, Emmert-Buck MR, et al. Germline and somatic mutation of the gene for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1). *J Intern Med* 1998; 243:447-5301; 61: 916-920.

Marx, S.J. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nature Reviews. Cancer* (2005) 5: 367–375.

Meyer BK, Petrulis JR, Perdew GH. Aryl hydrocarbon (Ah) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones*. 2000 Jul; 5(3):243-54.

Metz DC, Jensen RT, Bale AE, Skarulis MC, Eastman RC, Nieman L et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type I: clinical features and management. In:

Miller SA, Dykes DD. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 1988;16, 1215.

Montenegro F, Neves MC, Tavares MR, Cordeiro AC, Lourenco-Jr DM, Cunha Neto MB, Toledo SPA, Pereira MAA, Mendonca BB, Ferraz AR. Abordagem do Hiperparatireoidismo (HPT) na Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo-1 (NEM-1). In: *XX Congresso Brasileiro de Cirurgia de Cabeça e Pescoço*, 2005, Salvador.

Naidu R, Har YC, Taib NA. P27 V109G Polymorphism is associated with lymph node metastases but not with increased risk of breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2007;26):133-40.

Nunes AB, Ezabella MC, Pereira AC, Krieger JE, Toledo SP - A novel Val648Ile substitution in RET protooncogene observed in a Cys634Arg multiple endocrine neoplasia type 2A kindred presenting with an adrenocorticotropin-producing pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Dec; 87 (12):5658-61

Olufemi SE, Green JS, Manickam P, Guru SC, Agarwal SK, Kester MB, et al. Common ancestral mutation in the MEN 1 gene is likely responsible for the prolactinoma variant of MEN 1 (MEN 1 Burin) in four kindreds from Newfoundland. *Hum Mutat* 1998; 11:264-9.

Pannet AA, Thakker RV. Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson 'two hit' hypothesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001;86, 4371-4374.

Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Hofler H, Fend F, Graw J, Atkinson MJ. (2006) Germline mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 15558–15563. Erratum in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103, 19213.

Samaan NA, Ouais S, Ordonez NG, Choksi UA, Sellin RV, Hickey RC. Multiple endocrine syndrome type I. Clinical, laboratory findings, and management in five families. *Cancer*. 1989; 64 (3): 741-52.

Schöndorf T, Eisele L, Göhring UJ, Valter MM, Warm M, Mallmann P, Becker M, Fechteler R, Weisshaar MP, Hoopmann M. The V109G polymorphism of the p27 gene CDKN1B indicates a worse outcome in node-negative breast cancer patients. *Tumour Biol* 2004;25:306-12.

Schussheim DH, Skarulis MC, Agarwal SK, Simonds WF, Burns AL, Spiegel AM, Marx SM. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: new clinical and basic finding. *Trends Endocrinol. Metab.*, v. 12, n. 4, p. 173-8, 2001

Skogseid B, Eriksson B, Lundqvist G, Lorelius LE, Rastad J, Wide L, et al. Multiple endocrine neoplasia type 1: a 10-year prospective screening study in four kindreds. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991; 73 (2):281-7.

Skogseid B, Oberg K, Eriksson B, Juhlin C, Granberg D, Akerstrom G, et al. Surgery for asymptomatic pancreatic lesion in multiple endocrine neoplasia type I. *World J Surg*. 1996; 20 (7): 872-6.

Skogseid B. Plasma chromogranin A in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2712-2717.

Skogseid B, Rastad J, Oberg K. Multiple endocrine neoplasia type 1. Clinical features and screening. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994; 23:1-18.

Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Human Mutation*, 2003;21, 577-581.

Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia--syndromes of the twentieth century. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Aug;83(8):2617-20. Review.

Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*. 2003; 21:577-581.

Shiraso S, Katayose Y, Yamamoto K, Mizuma M, Yabuuchi S, Oda A, Rikiyama T, Onogawa T, Yoshida H, Hayashi H, Ohtsuka H, Motoi F, Egawa S, Kato J, Unno M. Overexpression of adenovirus-mediated p27kip1 lacking the Jab1-binding region enhances cytotoxicity and inhibits xenografted human cholangiocarcinoma growth. *Anticancer Res*. 2009;29:2015-24

Teh B T Thymic carcinoids in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *J Intern Med* 1998; 243:501-504.

Teh BT, McArdle J, Chan SP, Menon J, Hartley L, Pullan P, et al. Clinicopathologic studies of thymic carcinoids in multiple endocrine neoplasia type 1. *Medicine (Baltimore)*. 1997; 76 (1):21-9.

Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. Variação genética, Polimorfismo e Mutação. 1996. In: *Genética Médica São Paulo* : Guanabara Koogan editora Cap.6 p. 82-93

Tomoda K, Kubota Y, Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*. 1999;398:160-5.

Toledo SP, Ferraz AR. *Multiple endocrine type II neoplasm*. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 1990 Jan-Feb; 45 (1):1-2.

Toledo RA, Lourenco DM Jr, Liberman B, Cunha-Neto MB, Cavalcanti MG, Moyses CB, Toledo SP, Dahia PL. Germline mutation in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene in familial somatotropinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007b May; 92(5):1934-7. Epub 2007 Mar 6.

Toledo SP, dos Santos MA, Toledo Rde A, Lourenco Junior DM. Impact of RET proto-oncogene analysis on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics*. 2006 Feb; 61(1):59-70.

Toledo RA, Lourenco DM, Coutinho FL, Quedas E, Mackowiack I, Machado MC, Montenegro F, Cunha-Neto MB, Liberman B, Pereira MA, Correa PH, Toledo SP. (2007b) Novel MEN1 germline mutations in Brazilian families with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 67; 377-384.

Toledo RA, Lourenco Jr DM, Coutinho FL, Quedas E, Longuini VC, Moraes MB, et al. Estudo Gênico em pacientes com Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM-1). *Arqu Bras Endocrinol Metab*. 2006; (50): S497.

Trump D, Farren B, Wooding C, Pang JT, Besser GM, Buchanan KD, Edwards CR, Heath DA, Jackson CE, Jansen S, Lips K, Monson JP, O'Halloran D, Sampson J, Shalet SM, Wheeler MH, Zink A, Thakker RV. Clinical studies of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *QJM*. 1996 Sep;89(9):653-69. Erratum in: *QJM* 1996 Dec; 89(12):957-8.

Vaidya B, Martina Owens, Sian Ellard. (2007) Analysis of gross deletions in the MEN1 gene in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clinical Endocrinology*. Online accepted.

Verges B, Boureille F, Goudet P, Murat A, Beckers A, Sassolas G, Cougard P, Chambe B, Montvernay C, Calender A. Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Feb; 87(2):457-65.

Yaguchi H, Ohukura N, Yakahashi M, Nagumura Y, Kitabayashi I, Isukada T. Menin missense mutants associated with multiple endocrine neoplasia type 1 are rapidly degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 6569-6580.

Wilkinson S, Teh BT, Davey KR, McArdle JP, Young M, Shepherd JJ. Cause of death in multiple endocrine neoplasia type 1. *Archives of Surgery*, 1993;128, 683–690