Rodrigo de Almeida Toledo

**Identificação de mutações e rastreamento gênico
familiar em famílias brasileiras com neoplasia
endócrina múltipla tipo 1**

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

Área de concentração: Endocrinologia

Orientador: Dr. Pedro Henrique Silveira Correa

São Paulo

2007

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e minha irmã
dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos pacientes com Neoplasia endócrina múltipla tipo 1 e seus familiares que participaram desta pesquisa.

Agradeço ao meu Orientador, Dr. Pedro Henrique Silveira Correa, por seu apoio, compreensão e discussão a respeito desta Dissertação.

Agradeço ao Dr. Delmar Muniz Lourenço-Jr pela oportunidade de seus comentários, sugestões, análises, discussões e interpretações no que se refere a esta complexa área clínica, envolvendo a Neoplasia endócrina múltipla tipo 1.

Agradeço a todos os funcionários e alunos da Unidade de Endocrinologia Genética do LIM-25 pela convivência amistosa e pela colaboração.

Agradeço a meu pai, Prof. Dr. Sergio P. A. Toledo, por seu apoio irrestrito em todos os momentos desse trabalho; por seus conselhos e orientações, mas sobretudo por seu exemplo de caráter digno.

Agradeço à Profa. Dra. Berenice Bilharinho Mendonça - Professora Titular de Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP e Chefe de Serviço no Hospital das Clínicas da FMUSP – por ter acreditado nesse trabalho e por seu apoio, por meio da Disciplina, à realização deste projeto.

Agradeço à FAPESP, CNPq-CAPES, Fundação Faculdade de Medicina e Organizações PAPAIZ pelos financiamentos da parte de bancada e de apoio pessoal.

Por último e com maior importância, agradeço a Deus, por ter me estruturado e feito crescer em sua presença.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Listas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 NEOPLASIAS ENDÓCRINAS MÚLTIPLAS	2
1.2 NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 1	3
1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA NEM1.....	4
1.4 RASTREAMENTO GENÉTICO	12
1.5 CONSENSO SOBRE NEMs / 2001	12
1.6 ASPECTOS MOLECULARES DA NEM1.....	13
2. OBJETIVOS	24
3. MÉTODOS	26
3.1 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	28
3.2 PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO GÊNICA.....	30
3.3 PROTOCOLO DE ELETROFORESE EM GEL SENSÍVEL À CONFORMAÇÃO (CSGE).....	32
3.4 PROTOCOLO DE SEQUENCIAMENTO GÊNICO	33
3.5 ESTATÍSTICA.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES <i>MEN1</i>	38
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS.....	67
Apêndices.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

NEM 1	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1
<i>MEN1</i>	gene da Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1
HPT/NEM1	hiperparatireoidismo associado à NEM1
HPTe	hiperparatireoidismo esporádico
GA/NEM1	gastrinoma associado à NEM1
INSe	insulinoma esporádico
INS/NEM1	insulinoma associado à NEM1
PTH	paratormônio
RPM	rotações por minuto
° C	graus Celsius
PCR	reação em cadeia da DNA polymerase, do inglês: <i>Polimerase Chain Reaction</i>
pb	pares de base de DNA (nucleotídeos)
CSGE	eletroforese sensível à conformação, do inglês: Conformation Sensitive Gel Electrophoresis

LISTADE FIGURAS

Figura 1: Os principais tumores na NEM1 estão apontados (adaptado de: NIH, USA).....	8
Figura 2: Modelo de dois eventos mutacionais para genes supressores de tumor, como o <i>MEN1</i> (Knudson, 1971; Agarwal, 1999).....	15
Figura 3: O produto do gene <i>MEN1</i> é a proteína supressora de tumor chamada menin. Por causa de exercer funções essenciais, como controle do ciclo e do crescimento celular, regulação da transcrição gênica através de interações com a JunD, entre tantas outras funções fundamentais, a menin é considerada uma proteína guardiã do genoma. ...	22
Figura 4: de localização das mutações, colorida: Figura esquemática da região codificadora do gene <i>MEN1</i> (éxons 2-10) ilustrando a localização das 12 mutações germinativas identificadas nesse estudo.	39
Figura 5: Seqüenciamento automático do gene <i>MEN1</i> . Foram encontradas alterações em heterozigose no padrão do seqüenciamento do gene <i>MEN1</i> (éxons 2, 7 e 8), como as mostradas nesta figura. Essas alterações foram causadas por pequenas deleções de 1 a 4 nucleotídeos em um dos alelos do gene <i>MEN1</i> dos pacientes, provocando uma mudança no quadro de leitura da transcrição gênica. Assim, aminoácidos diferentes da seqüência normal são inseridos. Essas deleções também causam uma sinalização precoce de parada da transcrição. Dessa forma, é previsto que essas mutações codifiquem proteínas truncadas, menores do que a proteína menin normal. Um padrão de mudança de leitura do seqüenciamento também foi causado por uma grande deleção de 21 nucleotídeos.	40
Figura 6: Esquema predito das proteínas menin transcritas pelas mutações <i>MEN1</i> de quadro de leitura, identificadas nesse estudo. Mutações que levam à transcrição de proteínas truncadas são alterações genéticas clássicas para genes supressores de tumor.....	41
Figura 7: Seqüenciamento automático do gene <i>MEN1</i> . Foram identificadas mudanças de um único nucleotídeo no gene <i>MEN1</i> (éxons 2, 9 e 10; e íntron 3). Trata-se de alterações de ponto que podem levar a) a uma troca de aminoácido (<i>missense</i>); b) a inserção precoce um códon de parada da transcrição (<i>nonsense</i>); ou c) a alteração na fronteira éxon/íntron (<i>splicing</i>).	41

Figura 8: Esquema das proteínas mutantes menin, preditas de serem transcritas pelas mutações *MEN1* pontuais identificadas nesse estudo. Mutações pontuais não são alterações genéticas clássicas de genes supressores de tumor, assim mais análises são geralmente necessárias para ligar essas alterações à doença.....42

Figura 9: Análise da conservação evolutiva dos sítios nos quais as mutações pontuais foram encontradas. Os aminoácidos 147, 413, 414 e 471 da menin são conservados na escala evolutiva e por esse motivo, é provável que possuam resíduos com características importantes para a manutenção da função anti-tumorigênica dessa proteína. 42

Figura 10: Seqüenciamento automático do gene *MEN1* mostrando o polimorfismo D418D (éxon 9) que foi encontrado em dez dos quatorze (71%) pacientes índices com NEM1. 44

Figura 11: Experimentos de CSGE foram utilizados para a detecção de mutações no gene *MEN1*. Acima, dois géis de poliacrilamida (MDE) corados com brometo de etídeo. Abaixo, dois géis corados com nitrato de prata. As setas indicam padrões eletroforéticos diferentes, encontrados nos pacientes portadores de deleções de nucleotídeos no gene *MEN1*.....46

Figura 12: Diagrama do rastreamento clínico-genético realizado nos pacientes NEM1. 51

LISTADE TABELAS

Tabela 1: Penetrância (%) de tumores na NEM1	9
Tabela 2: Diferenças das manifestações clínicas da NEM1 com diagnóstico precoce e com diagnóstico tardio e os tratamentos recomendados.....	11
Tabela 3: Aspectos clínicos dos 14 pacientes-índices com NEM1 estudados.....	28
Tabela 4: Lista dos oligonucleotídeos utilizados para estudo genético do <i>MEN1</i>	31
Tabela 5: Mudanças das características bioquímicas geradas pelas mutações pontuais <i>MEN1</i> identificadas nesse estudo	43
Tabela 6: Resumo dos aspectos clínicos e genéticos dos 14 casos-índices com NEM1 estudados nesse projeto	43
Tabela 7: Resumo dos aspectos clínicos dos 141 familiares sob-risco genicamente rastreados para mutações <i>MEN1</i>	52
Tabela 8: Prevalência dos principais tumores NEM1 identificados nos casos índices (grupo I), familiares NEM1 diagnosticados por rastreamento clínico (grupo II) e familiares NEM1 diagnosticados por rastreamento genético (grupo III)	53
Tabela 9: Documentação das manifestações clínicas NEM1 nos casos índices (grupo I), familiares NEM1 diagnosticados por rastreamento clínico (grupo II) e familiares NEM1 diagnosticados por rastreamento genético (grupo III) visando analisar se há diferenças em respeito à gravidade da doença nesses três grupos de pacientes NEM1	54

RESUMO

Toledo RA. *Identificação de mutações e rastreamento gênico familiar em famílias brasileiras com neoplasia endócrina múltipla tipo 1* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 142p.

A Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (NEM1, OMIM 131100) é uma doença essencialmente caracterizada por sua complexidade clínica. A NEM1 afeta tanto tecidos endócrinos quanto tecidos não-endócrinos; apresenta tanto tumores malignos quanto tumores benignos; e apresenta extensa variabilidade clínica inter e intra-familiar quanto aos tipos de tumores e quanto à ordem de desenvolvimento e detecção clínica desses tumores. Em sua forma familiar, a NEM1 é transmitida por um padrão de herança autossômico dominante com elevada penetrância e é identificada pela presença de um parente de primeiro grau apresentando ao menos um tumor NEM1-relacionado. A realização do diagnóstico de NEM1 pode ser: a) clínico, pelo reconhecimento em único paciente de tumores em pelo menos duas das três glândulas endócrinas-alvo principais (paratireóides, hipófise e pâncreas endócrino) e/ou b) genético, pela identificação de mutação germinativa no gene responsável pela doença (*MEN1*). A grande maioria dos casos NEM1 (90%) apresentam mutações inativadoras no gene *MEN1*. Não há correlações descritas até o momento entre o genótipo e o fenótipo. Não há também regiões preferenciais ("hot-spots") para as mutações no gene *MEN1*. Além disto, há perda de heterozigose nos tumores NEM1, corroborando com a hipótese que o *MEN1* seja um gene supressor de tumor. No presente trabalho, objetivamos a) identificar mutações germinativas no gene *MEN1* em pacientes índices com NEM1 típica; b) rastrear parentes dos pacientes que se apresentavam sob-risco para NEM1; c) adicionalmente, estimamos preliminarmente alguns dos possíveis impactos deste do rastreamento gênico familiar no seguimento clínico desses pacientes no Hospital das Clínicas, SP. Para identificação das mutações nos casos-índices com NEM1, foi realizado seqüenciamento automático de todas as regiões codificadoras (éxons 2-10) e fronteiras éxon/intron do gene *MEN1*. Para o rastreamento gênico dos familiares, foi realizado seqüenciamento direcionado ao éxon mutado no casos-índices. Quatorze (14) famílias brasileiras com NEM1 e 141 familiares sob risco foram estudados clínica e geneticamente. Doze (12) diferentes mutações *MEN1* causadoras de doença foram aqui identificadas, sendo que sete (7) dentre estas mutações não haviam sido previamente descritas: 308delC, 375del21, 1243del1, I147F, L413R, L414P e W471C. As famílias com as mutações recorrentes, 360del4 e L413R, não eram relacionadas. Pela análise evolutiva, viu-se que as quatro mutações novas de ponto aqui relatadas estavam localizadas em resíduos altamente conservados, enquanto que as três novas mutações do tipo deleção ocorriam em regiões repetitivas ricas em GCs. Estas mutações são preditas codificarem proteínas truncadas, o que leva a inativação da ação anti-tumorigênica

da proteína menin, e portanto, à doença NEM1. Cento e quarenta e um (141) parentes de pacientes sob-risco de apresentarem NEM1 participaram desse rastreamento. Ao todo, 53 indivíduos foram documentados serem portadores de mutação germinativa no *MEN1*. Os casos geneticamente diagnosticados foram convidados a aderirem ao rastreamento clínico para NEM1. De modo preliminar, estimamos também os eventuais impactos do rastreamento gênico familiar na conduta clínica da NEM1. Assim, os casos afetados foram subdivididos em 3 grupos e analisados separadamente: casos-índices (grupo I), familiares diagnosticados clinicamente (grupo II) e genicamente (grupo III). A idade média ao diagnóstico no grupo III ($27 \pm 14,0$ anos) foi significativamente menor que a dos grupos II (39.5 ± 15.7 ; $p = 0.03$) e III (42.4 ± 15.0 ; $p = 0.01$). A maioria dos pacientes dos grupos I e II apresentou 2 ou 3 tumores, enquanto que 81,8% dos casos do grupo III apresentavam 1 ou nenhum tumor relacionado à NEM1. Além disto, 45,4% dos casos no grupo III eram assintomáticos, não sendo observados nenhuma metástase ou óbito. Contrariamente, nos grupos I e II havia ocorrência de metástases provindas de tumores NEM1-relacionados e quatro mortes ligadas a tumores NEM1-relacionados foram relatadas. Os 102 familiares que não herdaram mutação *MEN1* foram excluídos do rastreamento clínico. Um caso de fenocópia NEM1 foi também localizado. Em conclusão, relatamos no presente trabalho, a) a identificação de sete (7) novas mutações causadoras de doença no gene *MEN1*, todas elas localizadas ou em regiões evolutivamente conservadas ou em áreas repetitivas em GCs. b) foi aqui relatado o primeiro rastreamento genético sistemático de famílias com NEM1 na América do Sul, no qual 141 parentes de pacientes com NEM1 foram genotipados. Ao todo, 53 pacientes foram caracterizados como portadores de mutações germinativas no gene *MEN1*. c) estimamos preliminarmente os eventuais impactos do rastreamento gênico familiar na conduta clínica da NEM1. Os dados desse trabalho suportam a necessidade de se implementação de um sistemático programa de rastreamento na NEM1 em nosso País.

Descritores: 1.Neoplasia endócrina múltipla tipo 1, 2.Genes neoplásicos, 3.Genética médica, 4.Genes supressores de tumor, 5.Diagnóstico.

SUMMARY

Toledo RA. *Identification of germline mutations and familial genetic screening in brazilian families with multiple endocrine neoplasia type 1* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 142p.

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1; OMIM 131100) is a high-penetrance tumor syndrome mainly characterized by the triad: parathyroid (95-100%), pituitary (30%) and enteropancreatic tumors (50%). MEN1 is clinically diagnosed by the occurrence of MEN1-related tumors in at least two of these endocrine glands in a same patient. The familial form of the disease has an autosomal dominant pattern of inheritance and it is identified when a first-degree relative presents at least one MEN1-related tumor. High prevalence of inactivating mutations in the *MEN1* has been reported leading to MEN1 syndrome. No mutation hot-spots or genotype-phenotype correlations have been observed. In addition, loss of heterozygosity has been found, indicating that MEN1-tumorigenesis is in accordance with Knudson's classical hypothesis for tumor suppressor genes. This study aimed to characterize clinical features and identify *MEN1* germline mutations in Brazilian families with MEN1. Fourteen Brazilian families with MEN1 and 141 at-risk relatives were clinically and genetically studied. Twelve (12) different *MEN1* disease-causing mutations were identified, seven of them were previously unreported: 308delC, 375del21, 1243del1, I147F, L413R, L414P and W471C. Families with the recurrent mutations 360del4 and L413R were shown to be unrelated. The four novel missense mutations were found to be located at highly conserved residues by evolutionary analysis, whereas the three novel deletion/frameshift mutations occurred at GC-rich repetitive regions. Familial genetic screening was performed by direct sequencing. Taken together, 53 subjects were found to carry *MEN1* germline mutation. To gain preliminary insights on the possible impacts of such familial genetic screening on clinical management of these MEN1 cases, they were separated in three groups: MEN1 index-cases (group I), MEN1 clinically diagnosed at-risk relatives (group II) and genetically diagnosed at-risk family members (group III). The age at the diagnosis in group III (27.0 ± 14.0 y-old) was significantly lower than in groups I (39.5 ± 15.7 ; $p = 0.03$) and II (42.4 ± 15.0 ; $p = 0.01$). Patients in groups I-II mostly presented two or three MEN1 tumors, while 81.8% of cases in group III presented one or no one MEN1-related tumor. Further, in group III 45.4% of cases were asymptomatic and no metastasis or death were verified. Conversely, in groups I and II, metastases from MEN1-related tumors were frequent and four deaths due to MEN1-related tumors were reported. Moreover, one hundred and two (102) no mutation carriers were excluded of MEN1 surveillance, including one MEN1 phenocopy. In conclusion, it is reported the first systematic genetic screening of MEN1 families in South America and seven novel *MEN1* disease-causing mutations

were identified. Also, this study underscores the need for implementing a systematic MEN1 screening program in Brazil. At our Institution, we have begun to establish such program.

Descriptors: 1.Multiple endocrine neoplasia type 1, 2.Gene, neoplasm, 3.Genetics, medical, 4.Genes, suppressor tumor, 5.Diagnostic.

1. INTRODUÇÃO

1.1 NEOPLASIAS ENDÓCRINAS MÚLTIPLAS

As Neoplasias Endócrinas Múltiplas (NEMs) são doenças hereditárias caracterizadas pela presença de pelo menos dois tumores envolvendo glândulas endócrinas em um mesmo indivíduo (Hoff, 2000). Os primeiros casos isolados com NEM foram descritos ao redor do ano de 1900 e a primeira família descrita foi em 1954 (Wermer). Este autor descreveu uma genealogia com cinco familiares afetados com múltiplos tumores endócrinos, sendo esse foi o estudo original que mostrou a existência de predisposição familiar para NEM.

As principais NEMs são: Neoplasias Endócrinas Múltiplas tipo 1 (NEM1); Neoplasias Endócrinas Múltiplas tipo (NEM2); von Hippel-Lindau, síndrome de Carney e Neurofibromatose (Hoff, 2000; Marx, 2005). Elas são classificadas de acordo com as glândulas afetadas. Dentre elas, as NEM1 e NEM2 são as mais estudadas, tanto em seus aspectos clínicos quanto em seus aspectos genéticos. Ambas possuem suas etiologias moleculares já conhecidas, o que viabiliza estudos de identificação de mutações em pacientes clinicamente afetados e rastreamento gênico de seus familiares sob-risco. Esses estudos buscam caracterizar melhor os aspectos genéticos dessas síndromes e também oferecer diagnósticos moleculares capazes de auxiliar no seguimento clínico e tratamento cirúrgico e/ou medicamentoso dos indivíduos sob-risco.

1.2 NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 1

A Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (NEM1, OMIM 131100) é uma doença essencialmente caracterizada por sua complexidade clínica. A NEM1 afeta tanto tecidos endócrinos quanto tecidos não-endócrinos; apresenta tanto tumores malignos quanto tumores benignos; e apresenta extensa variabilidade clínica inter e intra-familiar quanto aos tipos de tumores e quanto à ordem de desenvolvimento e detecção clínica desses tumores. A NEM1 é denominada múltipla por apresentar vários tecidos concomitantemente afetados. Além disso, apresenta freqüentemente múltiplos tumores em cada um dos tecidos comprometidos. Em sua forma familiar, a NEM1 é transmitida por um padrão de herança autossômico dominante e apresenta elevada penetrância. O diagnóstico de NEM1 pode ser a) clínico, pelo reconhecimento de tumores em pelo menos duas das três glândulas endócrinas-alvo principais (paratireóides, hipófise e pâncreas endócrino / duodeno) e/ou b) genético, pela identificação de mutação germinativa no gene responsável pela doença (*MEN1*) (Hoff, 2000; Brandi, 2001; Marx, 2005).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA NEM1

Hiperparatireoidismo

O hiperparatireoidismo primário (HPT) é geralmente a primeira e mais freqüente manifestação clínica nos pacientes NEM1, sendo relatado em 73-100% dos casos (Tabela 1; Trump, 1996).

As características do HPT em pacientes NEM1 (HPT/NEM1) diferem das características clássicas do HPT primário esporádico (HPTe) em vários aspectos. O HPT/NEM1 a) usualmente apresenta hiperplasia de paratireóides e mais raramente adenomas; b) apresenta comprometimento de múltiplas glândulas paratireoideanas; c) a idade média de sua manifestação é menor que no HPTe (20 anos nos HPT/NEM1 vs. 40 anos, nos HPTe); d) afeta homens e mulheres na mesma proporção (1:1), enquanto o HPTe ocorre 3 vezes mais em mulheres e; e) apresenta maiores taxas de recorrência após paratireoidectomia (Bilezikian, 2002; Metz, 1994).

O HPT/NEM1 usualmente apresenta evolução clínica menos agressiva do que a observada no HPTe, sendo que as dosagens do hormônio paratireoideano (PTH) e do cálcio sérico são freqüentemente pouco elevadas: a) os valores de PTH geralmente não superam 2-3 vezes o limite superior da normalidade; e b) a calcemia geralmente se eleva pouco acima dos valores de corte (Katai, 2001). Entretanto, a presença de freqüentes calculoses renais, cólicas renais e doença renal grave são documentadas em casos com diagnóstico tardio (Metz, 1994). Nesses casos, a diálise renal ou até mesmo um transplante renal podem ser necessários.

O tratamento para o HPT/NEM1 é geralmente cirúrgico, entretanto ainda não existe um consenso claro sobre o melhor momento para a cirurgia. Nesse sentido, os critérios utilizados para o manejo clínico-cirúrgico dos casos HPT/NEM1 são os mesmos estabelecidos no último consenso sobre HPTe (Bilezikian, 2002).

A cirurgia indicada no tratamento do HPT/NEM1 é diferente daquela usualmente realizada no HPTe. Paratireoidectomia total com implante de tecido paratireoideano no antebraço (para eventual fácil remoção em casos com recorrência) é uma das técnicas mais preconizadas para o HPT/NEM1, enquanto que a adenomectomia unifocal é usualmente recomendada no tratamento cirúrgico do HPTe (Brandi, 2001). Simultaneamente à retirada das paratireóides, é preconizada a realização de tirectomia total preventiva nos casos NEM1 (Brandi, 2001; Malleto, 1994; Burgess, 1999; Thompson, 1995; Carling, 2005).

As informações acima destacam a necessidade do diagnóstico pré-cirúrgico preciso nos casos de NEM1, afim de se atingir o tratamento adequado do HPT/NEM1. Na ausência do diagnóstico de NEM1, esses pacientes eventualmente poderão ser submetidos à adenomectomia, com menores chances de cura. Assim, ao serem diagnosticados pré-cirurgicamente, esses pacientes com NEM1 possuem maiores oportunidades de cura do HPT.

Tumores entero-pancreáticos na NEM1

Os tumores entero-pancreáticos (TEPs) ocorrem em 30-80% dos pacientes com NEM1, com sua penetrância variando bastante dependendo da população estudada (Trump, 1996; Marx, 2005; Grama, 1992. Os TEPs podem ser a primeira manifestação clínica da doença em cerca de 10% dos casos (Metz, 1994). O gastrinoma na NEM1 (GA/NEM1) é o TEP mais freqüente, sendo encontrado em 30-75% dos casos (Tabela 1). O GA/NEM1 é usualmente multi-focal, contrastando com a manifestação unifocal verificada nos casos esporádicos (GAe) (Metz, 1994). Os GA/NEM1 são predominantemente duodenais e múltiplos, apresentam alto potencial maligno (60%; esse assunto será abordado novamente mortalidade na NEM1); e possuem menores taxas de cura que o GAe. Os procedimentos cirúrgicos preconizados para o tratamento dos GA/NEM1 são mais extensos (pancreatectomia subtotal ou mesmo total, associadas à duodenomectomia) do que os usualmente realizados nos GAe (pancreatectomia parcial). A estratégia cirúrgica prioriza reduzir a ocorrência de metástases (Akerstrom, 2002 e 2005).

Surpreendentemente, até 25% dos gastrinomas “esporádicos” foram vistos serem relacionados à NEM1 (Glascock, 2002; Norton, 1999). Dessa forma, antes de ser indicado o tratamento cirúrgico para o gastrinoma, é recomendado uma avaliação clínica mais completa na busca de eventual NEM1.

O insulinooma é o segundo TEP com maior penetrância em casos com NEM1 (10-30%). Os insulinoomas na NEM1 diferem-se dos esporádicos por

serem: geralmente múltiplos; terem um maior potencial maligno; e por apresentarem maiores taxas de recorrência pós-cirúrgica. A mesma abordagem feita acima, referente à cirurgia no GA/NEM1, deve ser lembrada quanto ao insulinoma associado à NEM1. Assim, a pancreatectomia parcial é recomendada para os casos esporádicos, enquanto a pancreatectomia subtotal (ou mesmo total) é preconizada para os casos com NEM1 (Brandi, 2001; Metz, 1994).

Tumores hipofisários na NEM1

A penetrância de tumores hipofisários na NEM1 (HIP/NEM1) é bastante variável, oscilando entre 18-40% (Verges, 2002; Benson, 1987; Samaan, 1989; Burgess, 1989). Aproximadamente 80% dos HIP/NEM1 são macroadenomas, em contraste com 42% de macroadenomas encontrados nos casos com HIP esporádicos (HIPe) (Verges, 2002). Outra característica específica dos HIP/NEM1 é se apresentarem como multi-cêntricos e pluri-hormonais (Verges, 2002).

O prolactinoma é o tumor mais freqüente entre os HIP/NEM1 (70%), entretanto os adenomas hipofisários não-secretores também podem ser freqüentemente encontrados (20%; Verges, 2002; Burgess 1996). Os tumores co-secretores, secretores de GH, e secretores de ACTH são menos freqüentes, ocorrendo em 10%, 9% e 4% dos casos, respectivamente (Verges, 2002). Outros tumores hipofisários, como o FSHoma e TSHoma, raramente ocorrem na NEM1 (Tabela1).

Os HIP/NEM1 podem ser a primeira manifestação clínica de pacientes com NEM1 em até de 20% dos casos. Interessante notar que a idade de diagnóstico dos casos HIP/NEM1 (~ 37 anos) é similar à encontrada nos casos com predisposição familiar a tumores hipofisários isolados (FIPA) e nos casos com HIPe (Verges, 2002; Daly, 2006).

Figura 1: Os principais tumores na NEM1 estão apontados (adaptado de: NIH, USA).

Outros tumores na NEM1

Além dos tumores clássicos acima descritos, vários outros foram descritos relacionados à NEM1. Ao total, cerca de 20 tumores endócrinos e não-endócrinos encontram-se no painel de possíveis tumores que podem estar associados à NEM1 (Tabela 1; Marx, 2005). Devido à ampla variabilidade de tumores e manifestações clínicas nesta síndrome, a NEM1 é hoje considerada uma doença complexa e multi-sistêmica (Marx, 2005). Por essa razão, é plausível que a NEM1 seja uma doença eventualmente ainda sub-diagnosticada em várias regiões do globo.

Tabela 1: Penetrância (%) dos principais tumores na NEM1 *

<u>Tumores Endócrinos</u>	
<u>Adenoma de paratireóides</u> (73 - 100)	<u>Adenoma pituitário</u> (20 - 40)
	Prolactinoma (62 - 76)
<u>Tumores entero pancreáticos</u> (30 - 80)	NS (14 - 24)
Gastrinoma ** (30 - 75)	Co-secretor (10)
Insulinoma (10 - 30)	GHoma (9)
	ACTHoma (4)
<u>Carcinóides</u> ** (> 10)	TSHoma (raro)
	<u>Córtex adrenal NS</u> (12 – 40)
<u>Tumores não Endócrinos</u>	
<u>angiofibroma</u> (40 – 80)	

*= Referências utilizadas: Brandi, 2001; Trump, 1996; Verges, 2002; Benson, 1987; Samaan, 1989; Burgess, 1989; Marx, 1986.

**= Tumores com potencial maligno (> 25%); NS, não secretor/funcionante.

Mortalidade na NEM1

Os tumores carcinóides e gastrinomas são as principais causas de morte em pacientes com NEM1 (Teh, 1997 e 1998). Mais de 90% dos tumores carcinóides associados à NEM1 (geralmente afetando timo e brônquios) são malignos (Teh, 1997 e 1998; Gibril, 2003). Entretanto, estes tumores são relativamente raros na NEM1, com penetrância de aproximadamente 10% (Tabela 1). Por outro lado, apesar de os gastrinomas terem menor prevalência de malignidade comparada a dos carcinóides (60%; Kouvaraki, 2006), os GA podem estar presentes em até 75% dos casos com NEM1, dependendo da população analisada (Tabela 1). Assim, o gastrinoma é considerado o principal tumor associado à mortalidade na NEM1 (Kouvaraki, 2006).

A ocorrência de metástases nesta síndrome é 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 à expectativa de vida da população não afetada (> 70 anos; Geerdink, 2003).

Seguimento clínico da NEM1 / Consenso NEM1

É amplamente reconhecido que quanto mais cedo o diagnóstico de NEM1 for feito, melhor e mais eficiente poderá ser o tratamento e seguimento de casos com esta síndrome (Skogseid, 1991 e 1996). O Consenso sobre NEM recomenda que o seguimento clínico periódico para NEM1 deve ser iniciado entre 5-20 anos de idade, dependendo da patologia glandular a ser estudada (Brandi, 2001). Este seguimento é recomendado

para todos os casos diagnosticados com NEM1 e também para os seus familiares sob-risco. Este seguimento compreende dosagens hormonais anuais e realização de exames de imagens a cada 3 anos (Brandi, 2001). Dessa forma, o seguimento clínico adequado de um paciente com NEM1 é processo trabalhoso, demorado, e que envolve altos custos, pois há recomendação que deva ser realizado por tempo indeterminado. Por outro lado, o seguimento clínico para NEM1 é capaz de identificar e tratar as neoplasias relacionadas à doença e auxiliar para um aumento da qualidade de vida dos pacientes, além de reduzir a morbi-mortalidade nestes pacientes (Teh, 1997 e 1998; Skogseid, 1996).

Tabela 2: Diferenças das manifestações clínicas da NEM1 com diagnóstico precoce e com diagnóstico tardio e os tratamentos recomendados

Principais manifestações clínicas NEM1	Diagnóstico precoce		Diagnóstico tardio	
	Aspectos clínicos	Tratamento	Complicações clínicas	Tratamento
Hiperparatireoidismo	? PTH ? Ca ⁺⁺	PTX	complicações renais, osteoporose, cálculo renal, insuficiência renal	diálise ou transplante renal
Insulinoma	? insulina ? glycemia, hypoglycemic symptoms	Cirurgia	choque hipoglicêmico (morte), distúrbios neuropsíquicos	cirurgia
Gastrinoma	? gastrina, gastrite, úlcera hipersecreção de ácido gástrico	Tratamento medicamentoso, cirurgia	úlcera gastroduodenal, metastases (60%)	cirurgia, quimioterapia
Prolactinoma	microadenoma	tratamento medicamentoso	infertilidade, osteoporose, hipogonadismo, macroadenoma, defeitos visuais	Tratamento medicamentoso, radioterapia, cirurgia
Carcinóides	-	tiectomia profiláctica	metastases	cirurgia, quimioterapia, radioterapia

PTX= paratireoidectomia total com implante no antebraço, PTH= paratormônio, Ca=cálcio sérico,

1.4 RASTREAMENTO GENÉTICO

Segundo os critérios do Consenso sobre NEM (Brandi, 2001), há recomendação para a análise de mutação no gene *MEN1* dos seguintes casos: a) pacientes-índices com NEM1 (>2 tumores NEM1-relacionados); b) parentes de primeiro grau de casos-índices com NEM1; e c) casos que apresentem tumores múltiplos de paratireóide antes de 30 anos de idade, ou tumores neuro-endócrinos pancreáticos múltiplos em qualquer idade.

1.5 CONSENSO SOBRE NEMs / 2001

Brandi et al. (2001) relataram resultados do Consenso sobre NEM1 e NEM2, no qual são propostos os critérios básicos para o diagnóstico e as condutas terapêuticas para essas entidades. Quanto à NEM1, neste Consenso propõe-se: a) seguimento anual bioquímico associado a seguimento com exames de imagem a cada três anos; b) paratireoidectomia total ou subtotal e timectomia preventiva; c) a cirurgia deve ser o tratamento de escolha nos casos de hipoglicemia devido a insulinoma; d) há controvérsias quanto à indicação de tratamento cirúrgico dos gastrinomas; e) o diagnóstico gênico na NEM1 é importante, mas não orienta diretamente a conduta cirúrgica.

1.6 ASPECTOS MOLECULARES DA NEM1

CLONAGEM E IDENTIFICAÇÃO DO GENE *MEN1*

Tumores hereditários geralmente são causados pela ativação de um proto-oncogene ou então pela inativação de um gene supressor de tumor. Os primeiros transcrevem fatores que induzem à duplicação e crescimento celular, enquanto os segundos transcrevem proteínas que regulam e controlam esses processos (chamadas proteínas guardiãs do genoma) (Hoff, 2000).

A NEM1 é uma doença autossômica dominante causada pela inativação do gene supressor de tumor *MEN1* (U93236, Genbank). A localização do gene *MEN1* foi realizada por análise de perda de heterozigose (LOH) em tumores entero-pancreáticos de pacientes com NEM1. O material genético de insulinomas foi estudado através de sondas de DNA que abrangiam todos os cromossomos humanos. Esse estudo revelou a ausência de bandas do cromossomo 11 (Larsson, 1988). Estudos de ligação subsequentes reduziram para 2 centiMorgan (~2 Megabases de DNA) a região cromossômica envolvida (Lubensky, 1996; Bale, 1989; Janson, 1991; Courseaux, 1996; Nakamura, 1989; Thakker, 1989).

Aproximadamente 10 anos após o trabalho original de Larsson et al (1998), estudos utilizando técnicas de clonagem posicional isolaram o gene *MEN1* no braço longo do cromossomo 11, região 1, sub-região 3 (11q13) (Lemmens, 1997; Chandrasekharappa, 1997). Análises do gene *MEN1* em pacientes com NEM1 familiar e esporádica documentaram mutações

germinativas e somáticas, confirmando a associação desse gene com a doença. Os resultados observados de mutações germinativas associadas à LOH em tumores NEM1 suportam a hipótese que o *MEN1* é um gene supressor de tumor (Knudson, 1971).

O desenvolvimento de tumores em pacientes com NEM1 ocorre por uma sequência de dois eventos mutacionais, causando predisposição genética à doença e levando à formação de tumores relacionados. O primeiro evento refere-se a uma mutação que é herdada (mutação germinativa). Assim, todas as células do corpo dos indivíduos que possuem mutações germinativas *MEN1* já possuem um alelo desse gene inativado desde a embriogênese. O segundo evento mutacional ocorre nos tecidos afetados pela doença (glândulas paratireóides, hipófise e pâncreas endócrino), geralmente a partir dos 20 anos de idade. Assim, as glândulas dos pacientes com NEM1 acumulam duas mutações que causam inativação do gene *MEN1* e conseqüentemente inativação da proteína supressora de tumor codificada por ele, a *menin* (Figura 2). Assim, essas glândulas desenvolvem hiperplasia, adenoma, carcinóides, etc, relacionados à NEM1 (Tabela 1).

Segundo esse processo de tumorigênese, o indivíduo que herdar a mutação germinativa herda também a predisposição aos tumores NEM1-relacionados. Esses indivíduos geralmente apresentam tumores em idades menores do que os casos esporádicos com NEM1, no quais os tumores se desenvolvem somente após a ocorrência de duas mutações somáticas (Marx, 2005).

Knudson, 1971 Marx, 1998

Figura 2: Tumorigênese na NEM1. Modelo de dois eventos mutacionais para genes supressores de tumor, como o *MEN1* (Knudson, 1971; Agarwal, 1999).

ANÁLISES DAS MUTAÇÕES NO *MEN1*

A identificação do gene *MEN1* possibilitou principalmente: a) detecção mutações causadoras da NEM1; b) confirmação do diagnóstico clínico em pacientes com NEM1; e c) identificação dentre os familiares assintomáticos os que possuem e os que não possuem predisposição genética à doença.

Mutações germinativas no gene *MEN1* são encontradas em cerca de 70-90% dos casos NEM1 familiares estudados (Stenson, 2003; Marx, 2005). A ausência de mutações nesses 10-30% dos casos é atribuída à: a) variação de sensibilidade dos métodos laboratoriais empregados; b) à presença de mutações fora da região codificadora do gene; e c) à presença de grandes deleções, que impossibilitam a amplificação do alelo mutado (Cavaco, 2002).

Já foram descritas mais de 400 diferentes mutações no gene *MEN1* (Stenson, 2003; Marx, 2005). Não foram encontradas correlações claras entre genótipo e fenótipo. Pelo contrário, uma extensa variabilidade inter e intra-familiar é geralmente relatada na *NEM1* (Lemmens, 1997; Chandrasekharappa, 1997).

O gene *MEN1* parece não possuir sítios específicos que agrupem um grande número de mutações (Chandrasekhappa, 2003). Entretanto alguns tipos de mutações ocorrem mais freqüentemente que outros (Chandrasekhappa, 2003). Estas mutações recorrentes usualmente estão localizadas em regiões do gene que apresentam repetições de nucleotídeos; como regiões ricas em GCs, por exemplo. Algumas destas regiões, como os códons 119, 209-211 e 514-516, parecem ser regiões susceptíveis para ocorrência de mutações, e apresentam, respectivamente, freqüências de 2%, 4% e 7% das mutações descritas (Pannett, 1999; Kytölä, 2001). Estas regiões do DNA são consideradas seqüências instáveis, predispondo a um "deslizamento" da enzima DNA polimerase que podem causar pequenas inserções ou deleções de nucleotídeos (Weitzmann, 1997). Somadas, as mutações nestes códons representam 19-25% das mutações germinativas já identificadas (Thakker, 1998; Hoff, 2000). Outras regiões, como por exemplo a que envolve os nucleotídeos 359-360, foram também sugeridas como susceptíveis a mutações, entretanto esses dados ainda requerem confirmação (Teh, 1998).

A maioria das mutações *MEN1* identificadas é formada por alterações inativadoras clássicas, como: a) mutações pontuais que inserem um sinal de parada da transcrição no códon mutado, ou b) mutações de mudança de quadro (deleções ou inserções), que alteram a seqüência de aminoácidos

sintetizados e podem também inserir um sinal precoce de parada da transcrição gênica. Frequentemente, essas mutações codificam proteínas que não possuem sinais de localização celular (SLN). Esses domínios são localizados na porção 3' (carbóxi-terminal) e são responsáveis pela localização da menin no núcleo celular (Agarwal, 1999). Há estudos mostrando que linfócitos "mutantes" para SLN tipo 1 (SLN1) apresentam significativa quantidade de menin no citoplasma e não no núcleo, local onde a menin realiza suas funções anti-tumorigênicas (Figura 3 funções MENIN; Ikeo, 2000). Assim, as proteínas menin truncadas - além de possuírem uma conformação espacial anômala - podem estar inativadas por estarem fora do núcleo celular. Mutações que alteram as fronteiras éxon-íntron e íntron-éxon também levam a proteínas truncadas, porém são mais raras do que os tipos de mutação acima descritos (Stenson, 2003).

As mutações pontuais, que alteram somente um aminoácido, também podem ser encontradas em casos NEM1. Elas não causam o truncamento precoce da menin, porém podem provocar mudanças significativas na conformação espacial da molécula e conseqüentemente na função da menin (Pannet, 2001). As proteínas menin resultantes de mutações pontuais também podem sofrer ubiquitinação e assim serem degradadas e inativadas (Yaguchi, 2004).

Resumindo, a presença do grande número de mutações inativadoras no gene *MEN1*, em conjunto com a documentação da ocorrência do segundo evento mutacional somático (LOH), confirmam esse gene como sendo um supressor de tumor, envolvido em funções anti-tumorigênicas.

MODELO ANIMAL DA NEM1

Um modelo animal que se mostrou interessante para o estudo da NEM1 foi o camundongo com inativação do gene *MEN1* (*knock-out*). Os camundongos duplo homozigotos apresentam um fenótipo embriológico letal entre os dias 11,5 – 12,5. Já os heterozigotos, apresentam tumores de pâncreas (insulinomas), paratireóide (adenomas) e hipófise (prolactinomas) que são características bastante semelhantes às encontradas em pacientes com NEM1; exceção feita à ausência de gastrinomas no modelo animal (Crabtree, 2001 e 2003).

O estudo de linhagens de camundongos provenientes do cruzamento de animais *MEN1* *-/-* e JunD *-/-* proporcionou um melhor entendimento sobre a interação entre essas duas proteínas. A JunD é um fator de transcrição da família de proteínas ativadoras – 1 (AP-1) e está envolvida na indução da transcrição gênica e da mitose (Agarwal, 1999). Estudos funcionais mostraram que a *menin* pode ser encontrada associada à JunD, formando um complexo *menin/JunD*. Quando associadas, a *menin* reverte o efeito da JunD na indução ao crescimento e ao início do ciclo celular (Yazgan, 2001). Foi mostrado que quando isolada, a JunD tem características de proteína promotora de crescimento, entretanto quando associada à *menin*, passa a ter características de supressora de crescimento (Agarwal, 2003). Assim, ficou demonstrado que a proteína *menin* exerce importante função anti-tumorigênica através de sua associação com a JunD.

PROTEÍNA MENIN

O gene *MEN1* possui 9,2 Kb e consiste de 10 *exons*. Codifica uma proteína de 610 aminoácidos chamada menin. Essa proteína possui alta homologia entre humanos, camundongo (98%), rato (97%), peixes (75%) e insetos (47%) (Guru, 1999; Karges, 1999; Khodaei, 1999; Manickam, 2000; Maruyama, 2000); entretanto não foi achado um gene homólogo em fungos. As principais diferenças estruturais encontradas entre a menin das diferentes espécies estão na região carboxi-terminal. Análises das seqüências clonadas mostraram não haver motivos repetitivos nessa proteína, porém 28 pontos de fosforilação foram encontrados; dentre eles 2 foram identificados em mutações causadoras da doença. A menin é uma proteína muito diferente de todas outras proteínas já clonadas em humanos até o momento. Por esse motivo, existe significativa dificuldade em traçar paralelos para obtenção de informações sobre a função dessa proteína. O que se sabe a respeito de sua função é oriundo de estudos *in vitro* (Marx SJ, 2005).

A menin é expressa de forma variável tanto em tecidos endócrinos, como em tecidos não-endócrinos. Em adultos, a menin parece ser expressa de forma mais intensa em certos tecidos como o endométrio uterino (Ikeo, 2000). Este fato, juntamente com estudos em células de ovário de hamster chinês (Ikeo, 2000) e células de hipófises de rato (Kaji, 1999), sugere que a menin estaria envolvida na regulação do ciclo celular. Estudos em ratos revelaram a presença de expressão da menin no dia 7 de vida uterina, seguido de um padrão de expressão mais restrito (Guru, 1999; Maruyama, 1999; Stewart, 1998). Em humanos também foi verificada a expressão da menin no início do desenvolvimento embrionário (Wautov, 2000).

A menin se localiza no núcleo celular, porém pode também ser encontrada no citoplasma durante a divisão celular HEK 293, (Huang, 1999). Pode também ser achada em células HeLa e NIH3T3, entretanto não necessariamente durante a divisão celular (Wautot, 2000). Alguns trabalhos localizaram a menin no citoplasma de células de testículos de camundongos e em embriões de peixes (Stewart, 1998; Manickam, 2000). Outras proteínas supressoras de tumor, como a da doença de Von-Hippel-Lindau, apresentam regulação semelhante (Lee, 1996)

Um modelo de célula NIH3T3 Ras-transformada no qual a menin se encontrava superexpressa, reverteu o fenótipo das células transformadas. Isto sugere que a função da menin está fortemente associada à diminuição da taxa de proliferação celular. Outro estudo que aponta para esse fato revelou que a superexpressão (7 a 27 vezes maior do que o normal) da menin inibiu o crescimento de tumores em camundongos fenótipo *nude*. Entretanto, quando o modelo inverso de estudo foi elaborado, a subexpressão não induziu aumento da proliferação de células CHO (Ikeo, 2000).

Há evidências que a menin interfira no sistema de reparo de DNA. Tratamentos químicos em células de pacientes com NEM1 apresentaram maiores taxas de alterações cromossômicas espontâneas e mitoses com divisão centromérica prematuras (Scappaticci, 1991). Outro estudo demonstrou que células que superexpressavam menin apresentavam um atraso em seu ciclo celular, quando expostas a tratamentos químicos (Ikeo, 2000b). A maneira como a proteína menin estaria agindo no controle do ciclo celular e no reparo de DNA ainda não foi esclarecido.

O mecanismo que medeia a proliferação celular sob ação da menin parece se dar através de interações com fatores de transcrição, tais como o AP-1. Estudos utilizando fungos duplo-híbridos mostraram ligação e acoplamento entre menin e Jun-D. A proteína Jun-D dimeriza com outras proteínas da sua família ou com proteínas da família Fos para formar o fator de transcrição AP-1 (Agarwal, 1999).

Recentemente, interações entre a menin e outras proteínas nucleares foram relatadas (Wayne, 2002). Interações com Pem, Nm23 e os genes homeoboxes hPEPP1 e hPEPP2 foram descritas (Balogh, 2006). Interações da menin com RPA2 (uma proteína necessária na replicação, recombinação e reparo de DNA) também foram verificadas. Foi mostrado também que a menin interage diretamente em promotores de genes, regulando sua expressão (Marx, 2005). Essas novas interações da menin com outras proteínas nucleares poderão trazer novos esclarecimentos sobre o seu papel celular (revisto por Marx, 2005 e Balogh, 2006).

Atualmente, a menin é considerada uma proteína “guardiã” do genoma, por estar envolvida em processos celulares essenciais, como: a) controle do crescimento celular, b) ciclo celular, c) regulação da transcrição gênica, d) regulação da apoptose, d) estabilidade genômica e e) reparo de DNA (Balogh, 2006).

Funções e interações da proteína MENIN

Figura 3: O produto do gene *MEN1* é a proteína supressora de tumor chamada menin. Por exercer funções essenciais, como controle do ciclo e do crescimento celular, regulação da transcrição gênica através de interações com a JunD, a menin é considerada uma proteína guardiã do genoma.

Estado da arte da NEM1 no Brasil

A NEM1 é doença relativamente pouco estudada no Brasil. O mais extenso rastreamento clínico da NEM1 vem sendo realizado no Hospital das Clínicas (HC) da FMSUP de São Paulo. Esse rastreamento teve início em 1997 na Disciplina de Endocrinologia (Unidade de Endocrinologia Genética) e vem sendo realizado desde então em pacientes do HC e de outros centros

que indicam casos para essa Disciplina (Jorge, 2001; Lourenço-Jr, 2002, 2006a, 2006b; Toledo 2006a, 2006b).

Entretanto, não há instaurado no Brasil nenhum programa sistemático de rastreamento de mutações do gene *MEN1* e dessa forma muito pouco se conhece sobre o sobre os aspectos genéticos da NEM1 em nosso País. Até o momento do início desse projeto, apenas uma mutação germinativa havia sido descrita em pacientes brasileiros (Matsuzaki, 2004). Como ocorre para outras doenças para as quais ainda não há um programa de rastreamento específico no País, como por exemplo em relação ao HPT esporádico primário (Ohe, 2005), é provável que a grande maioria dos casos com NEM1 já se apresentem sintomáticos ao diagnóstico.

2. OBJETIVOS

- 1 – Identificação de mutações germinativas no gene *MEN1* em pacientes-índices com NEM1.
- 2 – Realização de rastreamento gênico de parentes sob-risco.

3. MÉTODOS

Um total de 14 casos-índices com NEM1 foram estudados (10 mulheres, 4 homens, idade média $41 \pm 15,5$ anos e com idades variando entre 18-74 anos). A maioria desse pacientes índices foi clinicamente diagnosticada pelo grupo clínico da Unidade de Endocrinologia Genética LIM 25, de acordo com o critério do mais recente Consenso para NEM1 (Brandi, 2001). Todos os casos-índices apresentavam HPT, 8 apresentavam prolactinoma, 6 insulinooma e 6 apresentavam gastrinoma (Tabela 3).

Um total de 141 familiares sob-risco foram identificados em seis dessas famílias e encaminhados para o rastreamento gênico familiar.

Dentre essas famílias estudadas, a Família 1 se destaca por ser bastante extensa, possuindo aproximadamente 1.100 familiares. Trata-se de uma família com origens italianas da Zona do Vêneto. Um casal dessa região imigrou para o Brasil ao redor de 1890, tendo-se estabelecido inicialmente na região de Mócoca-SP, a cerca de 300 km de São Paulo. Hoje essa família possui sete gerações. Essa família vem sendo seguida por vários anos pela UEG-FMUSP foram levantados dados clínicos de aproximadamente 50 familiares afetados dessas sete gerações, dentre esses, 25 pacientes das gerações VI-VII estão vivos. No presente estudo, 115 familiares sob-risco de serem geneticamente afetados foram incluídos.

Todos os 155 casos incluídos nesse projeto são pacientes do Hospital das Clínicas da FMUSP, SP.

Tabela 3: Aspectos clínicos dos 14 pacientes-índices com NEM1 estudados.

Caso índice	sexo / idade	Paratireóides	Hipófise	Pâncreas endócrino
1	M / 37	Hiperparatireoidismo		Gastrinoma
2	M / 18	Hiperparatireoidismo		Insulinoma
3	M / 51	Hiperparatireoidismo	Prolactinoma	Gastrinoma
4	M / 55	Hiperparatireoidismo	Prolactinoma	Insulinoma
5	H / 55	Hiperparatireoidismo	Nf-Ad	
6	M / 30	Hiperparatireoidismo		Insulinoma
7	M / 51	Hiperparatireoidismo	Prolactinoma	Gastrinoma, Insulinoma
8	M / 39	Hiperparatireoidismo	Prolactinoma	Insulinoma
9	H / 45	Hiperparatireoidismo		Insulinoma
10	H / 28	Hiperparatireoidismo	Prolactinoma	
11	H / 42	Hiperparatireoidismo	Prolactinoma	Gastrinoma
12	M / 74	Hiperparatireoidismo		Gastrinoma
13	M / 20	Hiperparatireoidismo	Prolactinoma	
14	M / 29	Hiperparatireoidismo	Prolactinoma	Gastrinoma

Nf-Ad= adenoma de hipófise não secretor, M= mulher, H= homem

3.1 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi isolado a partir de leucócitos de sangue periférico através do “método do sal” (Miller, 1988), conforme as seguintes etapas:

1- coleta de material

Foram coletados 5 mL de sangue venoso periférico em tubos tampa roxa contendo EDTA 25 mM, pH 8,0. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL.

2- Lise de hemácias

A este material, foram adicionados 10 mL do tampão A (1mM de NH_4HCO_3 , 144 mM NH_4Cl). Após agitação por vórtex as amostras foram deixadas a 4 °C durante 10 min. O material foi então centrifugado a 4 °C por 10 min. a 3000 RPM para separação dos leucócitos.

3- Lavagem

O sobrenadante (com hemácias lisadas) foi descartado e mais 20 mL do tampão A foram adicionados ao sedimento leucocitário. O material foi novamente agitado, incubado por 10 min. a 4°C e centrifugado 4°C por 10 min. a 1500 RPM. Novamente o sobrenadante com hemácias lisadas foi descartado.

4- Lise de leucócitos

O sedimento leucocitário foi ressuspenso em 3 mL de tampão B (10 mM Tris-Hcl pH 8,0, 400mM Nacl, 2 mM Na_2EDTA pH 8,0); 200 µl de SDS 10%; 500 µl de tampão C (50 µl de SDS a 10%, 2 µl Na_2EDTA 0,5 M pH 8,0, 488 mL de água destilada) com 2 µl de proteinase K (20 mg/ mL). A seguir, este material foi incubado por 18 h. a 37 °C.

5- Precipitação

Após incubação, foi adicionado 1 mL de solução D (Nacl 6 M) ao material que submetido à agitação vigorosa durante 1 min. (vórtex), seguido de centrifugação a 4 °C a 3000 RPM por 20 min.. Então, o sobrenadante foi transferido para tubo de 15 mL e foi adicionado 1 volume de etanol 100% (mantido a -20°C). O DNA precipitado foi "pescado", transferido para tubo de 1,5 mL contendo 1 mL de etanol 70% (mantido a -20°C), com posterior

centrifugação a 4 °C por 15 min a 13500 RPM (microcentrífuga EBA 12 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha). O sobrenadante foi então descartado, o tubo foi deixado secar à temperatura ambiente. O sedimento (DNA) foi ressuspenso em 0,5 - 1 mL de TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0).

A integridade das moléculas de DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. A concentração das amostras de DNA foi obtida por espectrofotometria. Depois da quantificação, foi realizada a diluição das amostras para que a concentração final de DNA destas amostras ficasse em torno de 100 ng/μl.

3.2 PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO GÊNICA

As reações de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) realizadas nesse estudo envolveram toda a região codificadora do gene *MEN1*, éxons: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10. As fronteiras éxon/íntron também foram amplificadas.

A reação de PCR foi otimizada sob as seguintes condições: 200 ng de DNA genômico; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase, Buffer 1 X (200 mmol Tris-HCl com pH 8.4 e 500 mmol/l de KCl) e $MgCl_2$ 1,5 mM (Invitrogen, Brasil); 10 mM de cada dNTP (Invitrogen, Brasil) e 0,2 μM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (senso ou reverso).

As reações foram realizadas em termociclador Minicycler™ (MJ Research, USA). Os oligonucleotídeos utilizados estão listados na Tabela 1.

Um único programa de 30 ciclos foi padronizado para todas PCRs: 30 s 94 °C ; 30s 65-60 °C (temperatura de anelamento/hibridização foi programada para diminuir em 1 °C por ciclo até 60 °C) e 1 min 72 °C, seguidos por uma extensão final de 10 min 72°C.

Tabela 4: Lista dos oligonucleotídeos utilizados para estudo genético do *MEN1*.

Exon	oligonucleotídeos - PCR (5' - 3')	Produto (pb)	oligonucleotídeos - seqüenciamento
2 F	GGAACCTTAGCGGACCCTGGGAG	287	GGTGAGCTCGGGAACGTTGGTAG
2 R	GGTGAGCTCGGGAACGTTGGTAG		
2 F	ATCGACGACGTGGTGCGCCTGTTTG	625	GGCTGTCAACCGCGTCAT CGAACCTCACAAGGCTTACAGTTC
2 R	GAGGTGAGGTTGATGATTTGGAG		
2A F	TGGAGCATTTTCTGGCTGTC	294	TGGAGCATTTTCTGGCTGTC
3 – 4 F	AGTGTGGCCCATCACTACCT	677	TGGGTGGCTTGGGCTACTACAG GGGCCATCATGAGACATAATG
3 – 4 R	GGTCCACAGCAAGTCAAGTCTGG		
5 – 6 F	CCTGTTCCGTGGCTCATAACTCTC	305	ATAATTCAGGCTGCCACC GGAAGTGGCCAGGCTGCG
5 – 6 R	CCCTGCCTCAGCCACTGTTA		
7 F	CCTCAGCCAGCAGTCCTGTAGA	403	GGCTGCCTCCCTGAGGAT
7 R	GGACGAGGGTGGTTGGAACTG		
8 F	AACCACCATCATCCAGCAGTGG	457	TGGTGAGACCCCTTCAGACCCTAC
8 R	CCATCCCTAATCCCGTACATGC		
9 – 10 F	CTGCTAAGGGGTGAGTAAGAGAC	1000	GTCTGACAAGCCCGTGGCTGCTG AGCCACTGGCCGGCAACC
9 – 10 R	GGTTTGATACAGACTGTACTCGG		

pb= nucleotídeos

3.3 PROTOCOLO DE ELETROFORESE EM GEL SENSÍVEL À CONFORMAÇÃO (CSGE)

O método de eletroforese em gel sensível à conformação (CSGE) foi aplicado de acordo com o descrito por (GANGULY, 1993, 1998). Um gel com 48 poços foi preparado na proporção de 15% de poliacrilamida, 99:1 de poliacrilamida para 1 de 1,4- bis, 10% de etileno glicol, 15% de formamida, 0,1% de persulfato de amônio e 0,07% de TEMED. Também foi utilizado, como outra opção, um gel com alta sensibilidade para detecção de mutação, chamado *Mutation Detection Enhancer* (MDE). O tampão TTE 0,5X foi utilizado para a eletroforese. As amostras (produtos de PCR) foram pré-tratadas antes de serem aplicadas no gel: foram denaturadas a 94 °C por 10 min. e depois deixadas na bancada à temperatura ambiente por 45 min. Nesse intervalo, ocorreu a pré-corrida do gel sem amostras, para posterior aplicação das mesmas. Os géis foram corridos a 10W por 12h. com a temperatura da sala controlada (aprox. 20 °C) e então corados com nitrato de prata ou brometo de etídeo para visualização das bandas.

O CSGE é uma variação da técnica de SSCP (anteriormente descrita por Orita et al. 1989), que busca analisar os diferentes padrões de migração eletroforética de produtos de PCR em gel não-denaturante. O seguinte princípio é seguido: duas moléculas de DNA com mesmo número de nucleotídeos, entretanto com seqüências diferentes não podem ser identificadas em géis comuns de agarose ou poliacrilamida. Porém, quando esses produtos de PCR são denaturados e renaturados assumem

conformações específicas, de acordo com a sequência dos nucleotídeos que possuem. Dessa forma, caso ocorra um polimorfismo ou uma mutação nessa amostra, ela provavelmente terá um padrão de migração diferenciado da amostra sem alteração. Assim, um padrão alterado de uma banda no CSGE reflete uma sequência de DNA alterada.

3.4 PROTOCOLO DE SEQÜENCIAMENTO GÊNICO

Os produtos amplificados por PCR foram utilizados para o seqüenciamento gênico automático, em aparelho Seqüenciador ABI - PE 310, com um capilar (Perkin Elmer, USA).

A preparação da reação de seqüenciamento incluiu:

- 1- Purificação dos produtos de PCR utilizando kit (Invitrogen);
- 2- Preparo da reação de seqüenciamento com os produtos de PCR purificado; nucleotídeos fluorescentes (kit Big dye, Applied Biosystems), tampão de seqüenciamento e um oligonucleotídeo.

O kit Big dye é constituído de nucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), buffer, cloreto de magnésio, Ampli Taq DNA polimerase FS e os dideoxynucleotídeos (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 moléculas aceptoras de fluorescência e são ligadas por sua vez a moléculas doadoras de fluorescência, a 6-carboxi-fluoresceína (6 FAM).

As reações de seqüenciamento foram realizadas para um volume final de 10 µL contendo: 1 µL de Big dye, 2 µL de tampão 5X, 1 µL do oligonucleotídeo senso ou reverso (5 pmol/µL), 4-6 µL do produto de PCR purificado completando-se o volume final para 10 µL com água MilliQ.

3- Reação de seqüenciamento:

O programa de PCR utilizado para o seqüenciamento foi o seguinte:

- 1^a fase - temperatura de denaturação: 94° C 3 min.;
- 2^a fase - temperatura de denaturação: 94° C 30 seg.;
- 3^a fase - temperatura de anelamento: 50° C 4 min.;
- 4^a fase - 29 ciclos repetitivos, partindo da 2^a até a 3^a fase

4- Reação de precipitação com isopropanol/etanol:

- A- Foram acrescentados 80 µL de isopropanol a 75% à amostra de reação de seqüenciamento;
- B- A solução foi homogeneizada, submetida a um "spin" e deixada a temperatura ambiente por no mínimo 20 min. protegida da luz.
- C- O material foi então submetido à centrifugação (13.000 RPM por 25 min.) a 25°C, seguido de remoção de todo o isopropanol;
- D- Foram adicionados 250 µL de etanol 70% e o material foi centrifugado por 5 min. a 13.000 RPM. Após isto, todo o etanol foi removido. Esta etapa do etanol foi realizada 2 vezes.
- E- As amostras foram secas em "speed vac";

F- As amostras foram eluídas em uma solução denominada "Template reagent supression" (TSR), que é uma solução denaturante. A solução foi então homogeneizada e submetida a uma temperatura de 95°C por 5 min. para denaturação e em seqüência colocada no gelo.

As amostras foram colocadas no seqüenciador, que aspira as amostras por um sistema de condução elétrica (injeção eletrocinética) para um capilar que apresenta em seu interior um polímero (POP-6^{TM} polymer - Applied Biosystems, USA), que permite que as moléculas de DNA migrem ao longo do mesmo, quando submetidas à eletroforese. As moléculas são "aspiradas" pelo sistema capilar em ordem crescente de tamanho, uma vez que moléculas menores têm maior facilidade de migrarem pelo polímero. No capilar há uma região denominada de "janela" que permite que um feixe de laser passe pelo capilar e atinja diretamente as moléculas. Quando o laser incide sobre as moléculas de rodaminas ligadas ao di-deoxinucleotídeos, estas emitem fluorescência que é captada por um sistema de filtros virtuais. Como cada uma das rodaminas apresenta capacidade de emitir fluorescência em comprimentos de onda diferentes, o filtro virtual consegue diferenciá-las e determinar a cada um destes espectros uma coloração específica. Assim, o ddATP (R6G) é representado como verde, o ddCTP (ROX) como azul, o ddGTP (R110) como preto e ddTTP (TAMRA) como vermelho e são apresentados nestas mesmas cores no eletro-ferograma para identificação da seqüência gênica analisada.

3.5 ESTATÍSTICA

Para análise do impacto do diagnóstico genético, os testes T, Kruskal Wallis e Mann Whitney foram aplicados quando adequados.

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES *MEN1*

Após seqüenciamento automático de toda a região codificadora e também das fronteiras “íntron/éxon” do gene *MEN1*, foram encontradas mutações germinativas em todos os 14 casos-índices NEM1 estudados. Doze diferentes mutações foram identificadas: quatro do tipo mudança de quadro (*frameshift*), 308del1, 360del4, 1059del1 e 1243del1; quadro mutações de ponto (*missense*), 549A>C (I147F), 1348T>G (L413R), 1351T>C (L414P) e 1523G>T (W471C); duas causando sinal de parada precoce da transcrição (*nonsense*), R415X e R527X; uma na fronteira íntron/éxon (*splicing*), IVS3+1; e uma grande deleção, 375del21. As famílias 4 e 5 compartilhavam a mutação 360del4 e as famílias 8 e 9 compartilhavam a mutação L413R. Amostras desses pacientes-índices e/ou de seus irmãos ou pai apresentavam haplótipos diferentes para o mtDNA e do cromossomo Y, sugerindo que se trata de famílias sem parentesco.

Quanto à localização dessas mutações, cinco (35,7%) foram encontradas no éxon 2, sendo que três delas entre os códons 84-88; quatro mutações (28,5%) foram encontradas no éxon 9, sendo que todas estavam restritas aos códons 413-415; duas mutações (14,2%) foram encontradas no éxon 10; uma mutação (7,1%) foi encontrada no éxon 7, uma no éxon 8 e outra no íntron 3 (Figura 4, de localização das mutações).

Cinquenta indivíduos brasileiros sem história de NEM1 foram incluídos como controle. Os éxons 9 e 10 desses pacientes foram seqüenciados e os alelos 549A>C (I147F), 1348T>G (L413R), 1351T>C (L414P) e 1523G>T (W471C) não foram encontrados nessas amostras. Vinte e três controles (46%) apresentavam o polimorfismo D418D (éxon 9).

Mutações *MEN1* identificadas:

- 5 - mudança de quadro de leitura
- 5 - de ponto
- 2 - sem sentido
- 1 - deleção maior
- 1 - fronteira éxon / íntron

Localização das mutações:

- espalhadas pela região codificadora e não codificadora do gene
- 2 recorrentes: 360del4 e L413R
- identificação de possível "warm-spot" *MEN1*

Figura 4: Ilustração esquemática da região codificadora do gene *MEN1* (éxons 2-10) indicando a localização das 12 mutações germinativas identificadas nesse estudo.

De acordo com o banco de dados de mutações HUMAN MUTATION DATABASE (Stenson, 2003), 7 novas mutações no gene *MEN1* foram identificadas (Tabela 5). As alterações de DNA identificadas nesse estudo são citadas de acordo com nomenclatura clássica para mutações, usando

como referência para o gene *MEN1* a sequência U93236 (Genbank, NCBI, NIH).

Mutações *MEN1* – deleções / mudança de quadro

Figura 5: Seqüenciamento automático do gene *MEN1*. Foram encontradas alterações em heterozigose no padrão do seqüenciamento do gene *MEN1* (éxons 2, 7 e 8), mostradas nesta figura. Essas alterações foram causadas por pequenas deleções de 1 a 4 nucleotídeos em um dos alelos do gene *MEN1* dos pacientes, provocando uma mudança no quadro de leitura da transcrição gênica; assim, aminoácidos diferentes da seqüência normal são inseridos. Essas deleções também causam uma sinalização precoce de parada da transcrição. Dessa forma, é previsto que essas mutações codifiquem proteínas truncadas, menores do que a proteína menin normal. Um padrão de mudança de leitura do seqüenciamento também foi causado por uma grande deleção de 21 nucleotídeos.

Figura 6: Esquema das proteínas menin transcritas pelas mutações *MEN1* de quadro de leitura, identificadas nesse estudo. Mutações que levam à transcrição de proteínas truncadas são alterações genéticas inativadoras clássicas para genes supressores de tumor.

Mutações *MEN1* - pontuais

Figura 7: Seqüenciamento automático do gene *MEN1*. Foram identificadas mudanças de um único nucleotídeo no gene *MEN1* (éxons 2, 9 e 10; e íntron 3). Trata-se de alterações de ponto que podem levar a) a uma troca de

aminoácido (*missense*); b) a inserção prococe um códon de parada da transcrição (*nonsense*); ou c) a alteração na fronteira éxon/intron (*splicing*).

Figura 8: Esquema das proteínas mutantes menin transcritas pelas mutações *MEN1* pontuais identificadas nesse estudo. Mutações pontuais não são alterações genéticas clássicas de genes supressores de tumor, assim mais análises são geralmente necessárias para associar essas alterações à doença.

	Codon 147	Codon 413/414	Codon 471
homem	...LFSF I TGTK...	...FAH L LRFY...	...EEP W GEE...
camundongo	...LFSF I TGTK...	...FAH L LRFY...	...EEP W GDE...
rato	...LFSF I TGTK...	...FAH L LRFY...	...EEP W GDE...
peixe	...LFS L ITGTK...	...FAH L LRFY...	...DDQ S SED...
anfíbio	...LFSF V TGTK...	...FAN L LRFY...	...- - - -DD...
inseto	...LYSY L SGNK...	...FAN L LRFY...	...- - - -LE...

Figura 9: Análise da conservação evolutiva dos sítios nos quais as mutações pontuais foram encontradas. Os aminoácidos 147, 413, 414 e 471 da menin são conservados na escala evolutiva e por esse motivo é provável que possuam resíduos importantes para a manutenção da função anti-tumorigênica dessa proteína.

Tabela 5: Mudanças das características bioquímicas geradas pelas mutações pontuais *MEN1* identificadas nesse estudo

Família	Mutação	Aminoácido
3	I147F	hidrofóbico ? aromático
8, 9	L413R	hidrofóbico ? positivamente carregado
10	L414P	alifático ? não alifático
12	W471C	positivamente carregado ? não carregado

Tabela 6: Resumo dos aspectos clínicos e genéticos dos 14 casos-índices com *NEM1* estudados nesse projeto

Família	Sexo/ Idade	Tumor	Éxon - códon	Mutação*	Mudança	Tipo	Referências	Polimorfismo
1	F / 37	HPT GA	2 – 66	308del1	delC	MQ	esse estudo	D418D
2	F / 18	HPT INS	2 – 88	375del21	Del21bp	deleção de 7aa	esse estudo	D418D
3	F / 51	HPT PRL GA	2 – 147	549 A>T	I147F	pontual	esse estudo	D418D
4	F / 55	HPT PRL INS	2 – 84	360del4	delTCTA	MQ	Lemmens 1997	D418D
5	M / 55	HPT INS	2 – 84	360del4	delTCTA	MQ	Lemmens 1997	D418D
6	F / 30	HPT PRL INS	7 – 317	1059del1	delC	MQ	Morelli 2000	D418D
7	F / 51	HPT GA	8 – 378	1243del1	delA	MQ	esse estudo	-
8	F / 39	HPT PRL INS	9 – 413	1348 T>G	L413R	pontual	esse estudo	A541T
9	M / 45	HPT INS	9 – 413	1348T>G	L413R	pontual	esse estudo	D418D
10	M / 28	HPT PRL GA	9 – 414	1351 T>C	L414P	pontual	esse estudo	D418D
11	M / 42	HPT PRL GA	9 – 415	1353 C>T	R415X	pontual	Lemmens 1997	-
12	F / 74	HPT GA	10 – 471	1523 G>T	W471C	pontual	esse estudo	-
13	F / 20	HPT PRL	10 – 527	1689 C>T	R527X	pontual	Chandra 1997	D418D
14	F / 29	HPT PRL GA	-	IVS3+1	G>T	pontual	Teh 1998	D418D

*=localização em relação à sequência U93236; HPT= hiperparatireoidismo; PRL= prolactinoma; GA= gastrinoma; INS= insulínoma; MQ= mudança de quadro de leitura da transcrição / deleção.

Polimorfismos no gene *MEN1*

Dez dos quatorze 10/14 (71%) casos índices com NEM1 apresentavam o polimorfismo silencioso D418D (Figura 10). Um paciente apresentava o polimorfismo A541T (éxon 10).

Figura 10: Seqüenciamento automático do gene *MEN1* mostrando o polimorfismo D418D (éxon 9) que foi encontrado em dez dos quatorze (71%) pacientes índices com NEM1.

Utilização do método CSGE no estudo gênico da NEM-1

A utilização de métodos de detecção de mutação através de análise de padrões eletroforéticos em gel, tais como o SSCP, DGGE e CSGE, entre outros, é bastante comum. Recentemente, esses métodos foram utilizados com sucesso na identificação de mutações no proto-oncogene *RET*, em casos com NEM2 (Santos, 2006).

Nesse projeto, testamos o CSGE para detecção de mutações no gene *MEN1*. Após a identificação das mutações por seqüenciamento direto, os produtos PCR mutantes e não mutantes foram rastreados por CSGE. Com o uso desse método, foi possível detectar as mutações causadas por deleções de 1, 4 ou 21 nucleotídeos, identificadas nesse estudo. As mutações pontuais, com mudança de apenas um nucleotídeo, não foram detectadas pelo método CSGE mesmo após várias alterações nas condições do experimento. Para as análises dessas mutações pontuais, o SSCP também foi utilizado, entretanto também não foi capaz de distinguir adequadamente as amostras com mutação pontual das amostras sem mutação.

Figura 11: Experimentos de CSGE foram utilizados para a detecção de mutações no gene *MEN1*. Acima, dois géis de poliacrilamida corados com brometo de etídeo. Abaixo, dois géis corados com nitrato de prata. As setas indicam padrões eletroforéticos diferentes, encontrados nos pacientes portadores de deleções de nucleotídeos no gene *MEN1*.

Rastreamento gênico familiar

O rastreamento gênico familiar foi realizado por PCR e seqüenciamento direto para as regiões onde as mutações nos casos-índices tinham sido encontradas. Amostras de DNA foram analisadas para a fita senso e reverso.

Ao total, 155 indivíduos foram genicamente estudados. Dos 141 familiares sob-risco estudados, 39 (27,7%) haviam herdado mutação. Dentre estes, os que ainda não haviam participado do rastreamento clínico para tumores NEM1, foram convidados para se matricularem no HC, para serem submetidos a exames hormonais e radiológicos.

Cento e dois familiares (102) sob-risco de NEM1 foram informados que não possuíam predisposição familiar à doença, sendo excluídos do rastreamento clínico anual para NEM1.

Impacto do rastreamento gênico na clínica

Para avaliar se o rastreamento gênico para *MEN1* gerou algum impacto positivo, e para analisar se a implementação de tal rastreamento teria relevância ao Serviço Clínico, os 53 pacientes identificados como portadores de mutação *MEN1* foram distribuídos em 3 grupos e analisados separadamente:

- No grupo I foram separados os pacientes-índices (N = 14).
- No grupo II foram separados os pacientes que foram primeiramente diagnosticados pelo rastreamento clínico (N = 28).
- No grupo III foram separados os pacientes que foram primeiramente diagnosticados pela genética (N = 11).

a) Idades médias

As idades médias dos grupos I ($39,5 \pm 15,7$ anos) e II ($42,4 \pm 15,0$ anos) não apresentaram diferença significativa ($p > 0.05$), entretanto ao serem analisadas em relação à idade média do grupo III ($27,0 \pm 14,0$ anos) a comparação apresentou significância estatística ($p = 0,03$; $p = 0,01$; respectivamente).

b) Co-existência de tumores NEM1 relacionados

A ocorrência de dois tumores NEM1 principais foi observada mais freqüentemente nos grupos I e II (53,8% e 32,2%, respectivamente) do que

no grupo III (9,1%; $p=0,06$). O mesmo foi visto para a presença de três tumores NEM1 relacionados, ao diagnóstico clínico: 38,5% dos casos do grupo I e 21,4% dos casos do grupo II apresentavam três tumores, enquanto apenas 9,1% dos casos do grupo III já apresentavam três tumores NEM1 ($p=0,22$). A presença de somente um tumor associado à NEM1 ocorreu em 46,4% dos casos do grupo II e em 72,7% dos casos do grupo III (Tabela 9).

c) Malignidade nos pacientes NEM1

Quanto à malignidade relacionada à NEM1, ela foi documentada em 8 casos, por achados patológicos e/ou pela presença de metástases locais ou à distância. Tumores malignos foram igualmente encontrados nos grupos I (23,1%) e grupo II (17,9%). As metástases identificadas originaram-se de gastrinomas (75,5%) ou de tumores carcinóides (25%). Nenhum caso do grupo III apresentava tumores malignos/metástases ($p<0,005$).

Todos os 4 casos com tumores carcinóides eram assintomáticos. O primeiro caso tinha um carcinóide gástrico que foi identificado e removido por endoscopia. O segundo, apresentava um carcinóide brônquico com metástases para linfonodos regionais. O terceiro caso apresentava um carcinóide pulmonar metastático que era múltiplo e atípico. O quarto caso apresentava um tumor carcinóide pulmonar.

d) Mortalidade nos pacientes NEM1

Mortes relacionadas à NEM1 ocorreram em 4 pacientes: dois deles dentre os 13 casos do grupo I e dois dentre os pacientes do grupo II. Três deles morreram devido a gastrinoma metastático e o último por

complicações secundárias na cirurgia de um macroadenoma pituitário não secretor. Não foram registradas mortes no grupo III.

e) Prevalência de tumores NEM1

Quanto à prevalência de tumores nesses 3 grupos, o HPT foi diagnosticado em todos os casos dos grupos I e II (100%) e em 8 casos (72,7%) do grupo 3.

A prevalência dos TEPs nos grupos I e II (76,9% e 67,9%, respectivamente) eram maiores que no grupo III (27,3%). Dentre os TEPs, o gastrinoma estava majoritariamente presente nos grupo I (60%) e II (57,9%), sendo menos observado no grupo III (33%). A maioria dos insulinomas foi documentada nos grupos I (50%) e II (15,8%) e estavam ausentes no grupo III ($p<0,005$). Por outro lado, os TEPs não secretores foram somente detectados nos grupos III (67%) e no grupo II (26,3%).

Os adenomas pituitários foram diagnosticados principalmente no grupo I (69,2%) e igualmente representados nos grupos II (46,4%) e III (45,5%). Em todos os 3 grupos de pacientes NEM1, o prolactinoma foi altamente prevalente (77,9%; 61,6%; 60%, respectivamente), seguido por adenomas não secretores (22,2%; 38,5%; 20%, respectivamente).

f) Casos sintomáticos e assintomáticos

Casos de HPT assintomáticos ocorreram nos grupos I (7,7%) e II (21,4%), mas prevaleceu no grupo III (55%). Por outro lado, casos sintomáticos de HPT (nefrolitíase) foram encontrados principalmente nos grupos I e II (87,8%) e eram menos representados no grupo II (45%),

($p < 0,005$).

Considerando em conjunto os pacientes dos 3 grupos, a maioria dos casos NEM1 (73,1%) foi reconhecida após o diagnóstico de HPT sintomático.

Os casos sintomáticos de TEP foram significativamente mais freqüentes nos grupos I e II (50%;76,9%, respectivamente) do que no grupo III (9%; $p < 0,05$). Além disso, tumores pituitários sintomáticos foram documentados em todos os 3 grupos: 61,5%; 28,6%; 36,4%, respectivamente.

Figura 12: Diagrama do rastreamento clínico-genético realizado nos pacientes NEM1.

Tabela 7: Resumo dos aspectos clínicos dos 141 familiares sob-risco genicamente rastreados para mutações *MEN1*

Família	Mutação	Individ	Idade	Sexo	Tumores NEM1			Outros	Diagnóstico
					Paratireóide	Hipófise	Pâncreas		
1	308delC	1	37	F	HPT	-	GA	GC	Caso 1
	portador	2	15	F	-	-	-	-	asintomático
	portador	3	16	F	-	PRL	-	-	Tu NEM1
	portador	4	16	M	-	PRL	-	-	Tu NEM1
	portador	5	18	M	HPT	-	-	-	Tu NEM1
	portador	6	21	M	HPT	PRL	INS GA	HANS	Tu NEM1
	portador	7	22	F	HPT	PRL	GA	-	Tu NEM1
	portador	8	23	M	HPT	-	-	HANS	Tu NEM1
	portador	9	24	F	HPT	-	-	-	Tu NEM1
	portador	10	24	M	HPT	-	-	-	Tu NEM1
	portador	11	26	F	HPT	-	-	-	Tu NEM1
	portador	12	33	M	HPT	-	GA	HANS	Tu NEM1
	portador	13	34	M	-	-	-	-	asintomático
	portador	14	39	M	HPT	NF-Ad	NF-Ad	-	Tu NEM1
	portador	15	44	M	HPT	NF-Ad	GA	HANS	Tu NEM1
	portador	16	47	M	HPT	-	INS	HANS	Tu NEM1
	portador	17	48	M	HPT	PRL	GA	HANS	Tu NEM1
	portador	18	49	F	HPT	-	GA	HANS	Tu NEM1
	portador	19	49	F	HPT	-	-	BC	Tu NEM1
	portador	20	50	M	HPT	-	-	HANS	Tu NEM1
	portador	21	54	M	HPT	-	-	-	Tu NEM1
	portador	22	55	M	HPT	PRL	-	-	Tu NEM1
	portador	23	55	F	HPT	-	-	-	Tu NEM1
	portador	24	56	M	HPT	-	-	-	Tu NEM1
	portador	25	59	M	HPT	-	NF-Ad	HANS BC	Tu NEM1
	portador	26	61	M	HPT	-	-	-	Tu NEM1
	portador	27	61	M	HPT	-	-	HANS	Tu NEM1
	portador	28	61	F	HPT	PRL	GA	HANS BC	Tu NEM1
	não portadores	29-116			-	-	-	-	todos normais
2	375del21	117	18	F	HPT	-	INS	-	Caso 2
	portador	118	29	F	HPT	PRL	GA	-	Tu NEM1
	portador	119	54	M	HPT	-	GA	HANS	Tu NEM1
	não portadores	120-122							todos normais
3	11e147Phe	123	51	F	HPT	PRL	GA	HANS	Caso 3
	portador	124	18	F	HPT	PRL	NF-Ad	-	Tu NEM1
	portador	125	23	M	HPT	-	-	-	Tu NEM1
	portador	126	30	F	HPT	NF-Ad	NF-Ad	-	Tu NEM1
	portador	127	52	M	HPT	NF-Ad	NF-Ad	HANS	Tu NEM1
	portador	128	55	F	HPT	-	NF-Ad	-	Tu NEM1
	não portadores	129-132							todos normais
4	360del4	133	55	F	HPT	PRL	INS	HANS	Caso 4
	portador	134	18	F	HPT	-	-	-	Tu NEM1
	não portadores	135-139			HPT				1 fenocópia
5	360del4	140	55	M	HPT	NF-Ad	-	-	Caso 5
	portador	141	30	F	HPT	-	-	-	Tu NEM1
	não portadores	142-144							todos normais
6	1059del1	145	30	F	HPT	-	INS	-	Caso 6
	portador	146	32	F	HPT	PRL	INS	-	
	portador	147	58	M	HPT	PRL	GA	HANS	
7-14*	portadores	148-155							Caso 7-14

HPT= hiperparatireoidismo; PRL= prolactinoma; GA= gastrinoma; HANS= adenoma não secretor da adrenal; BC= carcinóide brônquico; CG= carcinóide gástrico; NF-Ad= adenoma não secretor; Tu= tumor; *= as famílias 7 a 14 não tinham amostras dos familiares disponíveis ou ainda não tinham sido rastreadas.

Tabela 8: Prevalência dos principais tumores NEM1 identificados nos casos índices (grupo I), familiares NEM1 diagnosticados por rastreamento clínico (grupo II) e familiares NEM1 diagnosticados por rastreamento genético (grupo III)

	grupo I (n=13) (%)	grupo II (n=28) (%)	grupo III (n=11) (%)	Total (n= 52) (%)	Referências *
Paratireóides (HPT)	100	100	72.7	94.2	73 -100
Pâncreas (PETs)	76.9	67.9	27.3	63.5	30 – 80
gastrinoma	60 *	57.9	33	54.6	30 – 75
insulinoma	50 *	15.8	0	24.2	10 -30
NS	0	26.3	67	21.2	
Hipófise	69.2	46.4	45.5	52	20 – 40
prolactinoma	77.8	61.6	60	66.7	62
adenoma NS	22.2	38.4	20	29.6	15
GHoma	0	0	20	3.7	9
ACTHoma	0	0	0	0	4
Co-secretor	0	0	0	0	10
Carcinóides	7.7	10.7	0	7.7	> 10

HPT, hiperparatireoidismo; NS, não secretor;

*, Referências: Burgess, 1996; Teh, 1998; Brandi, 2001; Verges, 2002.

Tabela 9: Documentação das manifestações clínicas NEM1 nos casos índices (grupo I), familiares NEM1 diagnosticados por rastreamento clínico (grupo II) e familiares NEM1 diagnosticados por rastreamento genético (grupo III) visando analisar se há diferenças em respeito à gravidade da doença nesses três grupos de pacientes NEM1

	grupo I (n=13)	grupo II (n=28)	grupo III (n=11)
Idade média ao diagnóstico	39.5 (18-74)	42.4 (18-61)	27 (14-56) *
sem tumor	-	-	1 (9.1%)
1 tumor	-	13 (46.4%)	8 (72.7%)
2 tumores	7 (53.8%)	9 (32.2%)	1 (9.1%) *
3 tumores	6 (46.2%)	6 (21.4%)	1 (9.1%)
Estágio do tumor	avançado	precoce/ avançado	assintomático / precoce
Malignidade	3 (23%)	5 (17.9%)	Não ocorreram metastases nesse grupo
Mortalidade	2 (15.4%)	2 (7.1%)	Não ocorreram mortes nesse grupo

Idades dadas em anos; *= p<0.05.

5. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Identificação de mutações

Este estudo é provavelmente o primeiro rastreamento genético sistemático para NEM1 realizado na América do Sul. A primeira parte do projeto tratou-se de identificação de mutações germinativas em pacientes-índices com NEM1. Quatorze (14) famílias brasileiras afetadas com NEM1 foram aqui estudadas. De acordo com o HUMAN GENOME MUTATION DATABASE (Stenson 2003), cinco (5) mutações *MEN1* previamente descritas e sete (7) outras mutações novas foram aqui identificadas. Os mecanismos patogênicos destas novas mutações permanecem desconhecidos. Entretanto, dados relativos aos estudos de segregação, bioquímico e evolutivo puderam oferecer informações capazes de associar essas novas mutações à predisposição para NEM1, como descrito nos parágrafos seguintes.

Duas novas mutações de mudança de quadro de leitura da transcrição, 308del1 e 1243del1, foram identificadas nos pacientes-índices 1 e 2, respectivamente. Estas mutações codificam proteínas truncadas e são as classicamente encontradas em genes supressores de tumor. Assim, as mutações 308del1 e 1243del1 podem ser apontadas como mutações inativadoras da proteína supressora de tumor menin, e conseqüentemente, causadoras de tumores NEM1-relacionados.

Concordantemente, o alelo 308del1 co-segregou com as manifestações clínicas da doença NEM1 em 27 familiares que herdaram esta mutação (família 1, Tabela 7).

A mutação 375del21 (paciente-índice 2) leva à deleção dos aminoácidos 89-95 da proteína menin; entretanto os dois sinais de localização nuclear (SLN1 e SLN2) e as regiões de interação com o fator de transcrição JunD permanecem inalterados (Agarwal, 2005). Além disso, não foi encontrada nenhuma outra alteração deletéria no gene *MEN1* desse paciente-índice, e esse alelo afetado co-segregou com a doença nesta família. Dois familiares que herdaram a mutação 375del21 apresentaram a) HPT, prolactinoma e gastrinoma (caso 118), e b) HPT e gastrinoma (caso 119); enquanto outros três parentes que não herdaram esse alelo (casos 120-122), não apresentaram características clínicas relacionadas à NEM1 (Tabela 7). Dessa forma, esses resultados permitem concluir que a deleção dos aminoácidos 89-95 da menin causa uma inativação desta proteína, levando ao desenvolvimento de tumores NEM1-relacionados.

Interessante notar que todas as três (3) novas mutações do tipo deleção ocorreram em regiões do gene *MEN1* que possuem repetições dos nucleotídeos G e C (posições: 299 a 386 e 1241 a 1250). Estas seqüências podem predispor a enzima DNA polimerase a deslizamentos durante a replicação do DNA, levando a deleções/inserções de nucleotídeos (Weitzmann, 1997). Esse mecanismo de deslizamento da polimerase foi sugerido ocorrer na NEM1 em estudos genéticos prévios (Giraud, 1998; Basset, 1998).

Segundo informações contidas no banco de mutações do gene *MEN1*, as mutações de ponto I147F, L413R, L414P e W471C, encontradas nesse estudo, não haviam sido anteriormente associadas à NEM1. Dessa forma, análises evolutivas e bioquímicas foram realizadas para o melhor entendimento patogênico dessas novas mutações. O alinhamento dos aminoácidos da menin de várias espécies mostrou que os quatro códons que foram observados estarem mutados em pacientes brasileiros com NEM1 de fato contém resíduos conservados (Figura 9). Isto sugere que eles estejam envolvidos em importantes funções biológicas (ligadas à supressão de tumores) da proteína menin. As características bioquímicas destes aminoácidos foram modificadas pelas mutações de ponto (Tabela 5) e assim é provável que causem inativação da menin.

De fato, o rastreamento gênico mostrou que a mutação I147F segrega com as características clínicas da NEM1 na família 3. Nove (9) familiares sob-risco foram geneticamente testados, cinco (5) deles eram portadores da mutação e tinham desenvolvido pelo menos um tumor NEM1-relacionado (Tabela 7).

Amostras de DNA para a análise de segregação das outras três (3) mutações de ponto encontradas nesse estudo não estavam disponíveis. Entretanto, amostras de 50 indivíduos-controle foram seqüenciadas e pode-se excluir os alelos L413R, L414P e W471C de serem polimorfismos ainda não reportados. Um possível mecanismo patogênico para as mutações de ponto é a rápida degradação da proteína mutante por meio da via de ubiquitinação, como previamente descrito (Yaguchi, 2004).

É importante notar que 4/14 (28,6%) pacientes-índices apresentavam mutações de ponto entre os aminoácidos 413 e 415. Esta é uma região do gene *MEN1* altamente conservada desde *Drosophila* até humanos (Figura 9), e esta é localizada no terceiro domínio de ligação com a JunD (Chandraseharappa & Teh, 1998). Assim, modificações que ocorram nesses aminoácidos provavelmente levam à inativação do complexo menin/JunD, supressor de tumor.

As outras cinco (5) mutações que foram identificadas no presente estudo já haviam sido relatadas associadas à doença NEM1. A mutação 360del4 tem sido freqüentemente observada em pacientes Europeus, sugerindo que esta mutação pode ser relativamente freqüente (Lemmens, 1997). Pudemos observar que duas famílias brasileiras não relacionadas (famílias 4 e 5) compartilhavam a mutação 360del4. Teh et al (1998) verificaram que outras cinco (5) famílias com NEM1 apresentavam uma deleção do nucleotídeo 359. Os autores sugeriram que esta região apresentasse elevada susceptibilidade para ocorrência de mutações (Teh, 1998). Interessante notar que, as mutações 359-360 estão localizadas na mesma região que as duas outras deleções, 308del1 e 375del21, foram encontradas. Dessa forma, os resultados genéticos desse estudo suportam a hipótese de que essa região do gene *MEN1* (rica em nucleotídeos GC) possua alta susceptibilidade a deleções de nucleotídeos.

A mutação de mudança de quadro de leitura da transcrição 1059del1, identificada na família 6, foi previamente descrita em uma genealogia Italiana afetada com NEM1 (Morelli, 2000). A família 6 reportou ter parentes

morando na Itália, entretanto, amostras de DNA desses parentes não estavam disponíveis para haplotipagem (análise de parentesco).

Os pacientes-índices 11 e 13 apresentavam mutações de sinalização precoce de parada da transcrição R415X e R527X, respectivamente. Essas mutações codificam proteínas truncadas, desprovidas do segundo sinal de localização nuclear (SLN2) e foram relacionados a tumores NEM1 (Chandraseharappa, 1997; Lemmens, 1997).

A mutação IVS3+1, identificada no paciente-índice 14, afeta a região íntron/éxon-3 e foi anteriormente reportada em pacientes NEM1 (Teh, 1998). Mutações ocorrendo nas regiões íntron/exon no gene *MEN1* foram previamente descritas como sendo patogênicas (Stenson, 2003; Turner, 2002).

O polimorfismo D418D (GAC ? GAT) no éxon 9 é a alteração silenciosa mais freqüente do gene *MEN1*, tendo sido observado em 42-47% de casos NEM1 do USA e Europa (Chandraseharappa, 1997; Giraud, 1998; Agarwall 1997; Basset, 1998; Mutch 1999; Jager, 2006). No presente estudo, uma freqüência ainda mais alta (71%) desse polimorfismo foi detectada em casos-índices brasileiros. Esse achado pode ser devido ao número limitado de famílias incluídas nesse projeto, entretanto, outros estudos relataram freqüências mais baixas (25% e 0%) em genealogias Asiáticas com NEM1 (Tso, 2003; Jap, 2005), sugerindo que pode ocorrer uma grande variação da freqüência desse polimorfismo dependendo da população estudada.

Em conclusão, 14 famílias com NEM1 foram estudadas e doze (12) diferentes mutações no gene *MEN1* foram identificadas, incluindo sete (7)

novas mutações. Estas novas mutações ocorreram ou em regiões ricas em GC, propensas a apresentar deleção/inserção durante a replicação do DNA ou em sítios evolutivamente conservados da proteína menin.

Além disso, a identificação de mutações possibilitou a implementação de rastreamento gênico familiar (segunda parte do projeto).

Rastreamento gênico

A segunda parte desse projeto tratou-se da realização de rastreamento gênico de familiares sob-risco de NEM1 através de seqüenciamento direto. Amostras de cento e quarenta e um (141) familiares foram incluídos. Levando-se em conta as partes 1 e 2 do projeto, 53 indivíduos foram detectados com mutações no gene *MEN1*. Esses pacientes foram divididos em três grupos para análise do eventual impacto do rastreamento gênico no seguimento clínico.

As manifestações clínicas nos 53 casos afetados com NEM1 aqui estudados estavam de acordo com as referidas na literatura (Tabela 8). Em conjunto, o HPT foi o achado clínico achado mais freqüente (94,2%) e também a primeira manifestação da doença em 60% dos casos, suportando dados de Trump et al (1996). A prevalência dos TEPs foi de 63,5%. Já as prevalências de TEP nos grupos I (76,9%) e II (67,9%) foram claramente maiores do que no grupo III (27,3%). A prevalência dos adenomas pituitários (52%) nos casos estudados foi levemente maior que a encontrada na literatura (20%-40%, Tabela 8). Entretanto, a amostra aqui estudada é

relativamente pequena para permitir conclusões mais definitivas. Finalmente, a prevalência de tumores carcinóides foi semelhante à reportada em outros estudos (Tabela 8).

O rastreamento gênico familiar foi capaz de indicar a) quais casos deveriam ser incluídos no rastreamento clínico anual de tumores associados à NEM1 e b) quais casos deveriam ser excluídos de tal rastreamento, por não terem herdado predisposição genética para a doença. Ambos os resultados foram importantes e altamente informativos na conduta nos casos sob-risco para NEM1. Assim, os 39 parentes que herdaram o alelo *MEN1*-afetado foram encaminhados para o rastreamento clínico. Além disto, o teste genético permitiu a exclusão de 102 familiares não portadores de mutação. Dessa forma, a realização desnecessária do extenso rastreamento clínico para NEM1 de todos esses familiares foi evitada, economizando recursos para a Instituição (Sistema Único de Saúde, SUS).

O diagnóstico gênico foi também importante para confirmar o diagnóstico clínico de NEM1. Dentre os casos previamente diagnosticados com essa doença, identificamos um parente sob-risco que apresentava HPT primário, mas não era portador de mutação germinativa *MEN1*. De acordo com os critérios clínicos (Brandi, 2001), este paciente deveria ser diagnosticado como um caso afetado, entretanto, o teste genético mostrou que esse paciente na realidade apresentava um HPT esporádico e não relacionado à NEM1. Estes raros casos (aproximadamente 1%) são chamados de fenocópias e não necessitam de rastreamento clínico para as demais manifestações hereditárias (Toledo, 2006; Burgess, 2000; Hai,

2000). Adicionalmente, o tratamento cirúrgico indicados para as fenocópias NEM1 é o mesmo indicado para os casos esporádicos, com abordagens menos agressivas (Brandi, 2001).

Por outro lado, o teste genético para *MEN1* pode também identificar casos hereditários dentre pacientes “esporádicos” apresentando ou HPT em baixa idade (<30 anos) ou HPT recorrente. Estes casos específicos devem ser geneticamente testados para o *MEN1* e se for detectada uma mutação germinativa, a paratireoidectomia total seguida de implante no antebraço deve ser recomendada, ao invés da adenomectomia (Brandi, 2001).

É geralmente aceito que quanto mais cedo for a detecção das neoplasias associadas à NEM1, melhor pode ser a conduta clínica nesses casos. Isto porque pacientes NEM1 com um quadro clínico sintomático, geralmente requerem cirurgias mais agressivas e arriscadas, além de um maior número de exames (Tabela 2). Além disso, a chance de cura é geralmente menor em casos diagnosticados tardiamente (Akerstrom, 2002 e 2005; Teh, 1997). Os resultados do presente estudo mostraram um importante impacto do rastreamento gênico no manejo dos familiares sob risco. De relevância, casos que foram diagnosticados através da análise genética (grupo III) tinham apresentações clínicas consideravelmente mais suaves (Tabela 9), distintas das encontradas nos pacientes diagnosticados através do rastreamento clínico (grupos I e II). Assim, os pacientes do grupo III, a) eram claramente mais jovens (11-15 anos a menos); b) eram 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) não foram a óbito (Tabela 9). Esses achados corroboram os resultados encontrados em um estudo prospectivo que documentou que pacientes diagnosticados geneticamente apresentam manifestações clínicas mais brandas, que podem preceder em 10 anos os sinais e/ou sintomas da NEM1 (Lairmore, 2004).

Portanto, a implementação de um programa de rastreamento genético para a NEM1 em um centro de referência como o HC-FMUSP seria um importante avanço para a melhoria do seguimento e tratamento dessa doença em nosso País. Além disso, tal programa poderia levar a uma economia importante de recursos, que eventualmente poderiam ser gastos no rastreamento clínico de casos que não herdaram a predisposição genética para a doença.

6. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1) Todos os quatorze (14) pacientes-índices brasileiros com NEM1 aqui estudados possuíam mutações inativadoras no gene *MEN1*.

2) As sete (7) novas mutações no gene *MEN1* aqui identificadas encontram-se ou em regiões repetitivas GC ou em sítios conservados que provavelmente estão envolvidos em funções supressoras de tumor da proteína menin.

3) Os resultados do presente estudo mostraram que o rastreamento gênico familiar é uma ferramenta que pode ajudar o seguimento de famílias com NEM1, favorecendo o diagnóstico precoce das neoplasias envolvidas.

7. REFERÊNCIAS

Agarwal S.K., Kester, M.B., Debelenko, L.V., Heppner, C., Emmert-Buck, M.R., Skarulis, M.C., Doppman, J.L., Kim, Y.S., Lubensky, I.A., Zhuang, Z., Green, J.S., Guru, S.C., Manickam, P., Olufemi, S.E., Liotta, L.A., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., Burns, A.L., Marx, S.J. Germline mutations of the *MEN1* gene in familial Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 and related states. *Hum Mol Genet.* 1997; 6: 1169-1175.

Agarwal SK, Guru SC, Heppner C, et al. Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell* 1999; 96:143–152

Agarwal S.K., Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; 100: 10770-10775

Agarwal SK, Kennedy PA, Scacheri PC, Novotny EA, Hickman AB, Cerrato A, et al. Menin molecular interactions: insights into normal functions and tumorigenesis. *Horm Metab Res.* 2005; 37 (6):369-74.

Akerstrom G, Hessman O, Skogseid B. Timing and extent of surgery in symptomatic and asymptomatic neuroendocrine tumors of the pancreas in MEN 1. *Langenbecks Arch Surg.* 2002; 386 (8):558-69.

Akerstrom G, Hessman O, Hellman P, Skogseid B. Pancreatic tumours as part of the MEN-1 syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005; 19 (5):819-30.

Asteria C, Anagni M, Persani L, Beck-Peccoz P. Loss of heterozygosity of the *MEN1* gene in a large series of TSH-secreting pituitary adenomas. *J Endocrinol Invest.* 2001; 24 (10):796-801.

Bale SJ, Bale AE, Stewart K, et al. Linkage analysis of multiple endocrine neoplasia type 1 with INT2 and other markers on chromosome 11. *Genomics.* 1989; 4:320-322.

Balogh K, Racz K, Patocs A, Hunyady L. Menin and its interacting proteins: elucidation of menin function. *Trends Endocrinol Metab.* 2006; 17 (9):357-64.

Basset J.H., Forbes, S.A., Pannett A.A., Lloyd, S.E., Christie, P.T., Wooding, C., Harding, B., Besser, G.M., Edwards, C.R., Monson, J.P., Sampson, J., Wass, J.A., Wheeler, M.H., Thakker, R.V. Characterization of mutations in patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Am J Hum Genet*, 1998; 62, 232-244.

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 J.P., Meng, X., Shi, Y. Silverberg, S.J. Primary hyperparathyroidism in women: a tale of two cities: New York and Beijing. *Int J Fertil Women's Méd*. 2000; 45, 158-165.

Bilezikian JP, Potts JT Jr, Fuleihan Gel-H, Kleerekoper M, Neer R, Peacock M, et al. Summary statement from a workshop on asymptomatic primary hyperparathyroidism: a perspective for the 21st century. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87 (12): 5353-61.

Brandi. M.L., Marx, S.J., Aurbach, G., Fitzpatrick, L. Familial Multiple Endocrine Neoplasia type 1: a new look at pathophysiology. *Endocr Rev*. 1987; 8: 391-405.

Brandi M.L., Gagel R.F., Angeli A., Bilezikian J.P., Beck-Peccoz P., Bordi C., Conte-Devolx B., Falchetti A., Gheri R.G., Libroia A., Lips C.J., Lombardi G., Mannelli M., Pacini F., Ponder B.A., Raue F., Skogseid B., Tamburrano G., Thakker R.V., Thompson N.W., Tomassetti P., Tonelli F., Wells S.A. Jr., Marx S.J. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 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; 81 (7):2642-6.

Burgess JR, Greenaway TM, Shepherd JJ. Expression of the MEN-1 gene in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1. *J Intern Med*. 1998; 243 (6):465-70.

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; 134 (10):1119-23.

Burgess J.R., Nord B., David R., Greenaway T.M., Parameswaran V., Larsson C., Shepherd J.J., Teh B.T. Phenotype and phenocopy: the relationship between genotype and clinical phenotype in a single large family with multiple endocrine neoplasia type 1 (*MEN1*). *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2000; 53, 205-211.

Callegari-Jacques, S.M., Grattapaglia D., Salzano F.M., Salamoni S.P., Crossetti S.G., Ferreira M.E., Hutz M.H. Historical genetics: Spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol.*, 2003; 15, 824-834.

Carling T, Udelsman R. Parathyroid surgery in familial hyperparathyroid disorders. *J Intern Med.* 2005; 257 (1):27-37.

Carty. S.E., Helm, A.K., Amico, J.A., Clarke, M.R., Foley, T.P., Watson, C.G., Mulvihill, J.J. The variable penetrance and spectrum of manifestations of multiple endocrine neoplasia type 1. *Surgery*, 2003; 124, 1106–1114.

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.

Cavenee W, Hansen M, Scrable H, James C. Loss of genetic information in cancer. In: Bock G. Marsh J, eds. Genetic analysis of tumor suppression. *Chichester*, UK: Wiley. 1989; 79-92

Cebrian A, Lorente SR, Cascon A, Osorio A, Delgado-Martinez B. A rapid easy method for multiple endocrine neoplasia type 1 mutation detection using conformation-sensitive gel electrophoresis. *J Hum Genet.*, 2002; 47:190-195

Chabre O, Niccoli P., Leprat F, Duron F, Emperauger B, Cougard P., Goudet P., Sarfati E., Riou J.P., Guichard S., Rodier M., Calender A. Germline mutation analysis in patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 and related disorders. *Am J Hum Genet.*1998; 63, 455-467.

Chandrasekharappa S.C., Guru S.C., Manickam P., Olufemi S.E., Collins F.S., Emmert-Buck M.R., Debelenko L.V., Zuang Z., Lubensky I.A., Liotta L.A., Crabtree J.S., Wang Y., Roe B.A., Weisemann J., Boguski M.S., Agarwal S.K., Kester M.B., Kim Y.S., Heppner C., Dong Q., Spiegel A.M., Burns A.L., Marx S.J. (1997) Positional cloning of the gene for Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Science*, 276, 404-407.

Chandrasekharappa S C, Teh. B.T. Functional studies of the *MEN1* gene. *J Intern Med.*, 1998; 256, 606-615.

Chung-Ya, L; King-Yi, L, Sheung-TAT F. Surgical strategy for insulinomas in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Amer J Surg.* 1998; 175:307.

Cote G.J., Lee J.E., Evans D.B., Huang E., Schultz P.N., Dang G.T., Qiu H., Shetelbine S., Sellin R.V., Gagel R.F. Five novel mutations in the familial multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. *Hum Mutat.*, 1998;12, 219.

Coursaeux A., Grosgeorge J., Gaudray P. et al. Definition of the minimal MEN 1 candidate area based on a 5-Mb integrated map of proximal 11q13. The European Consortium on MEN 1. *Genomics.* 1996; 37:354-365

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.

Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ciccarelli A, Valdes-Socin H, Rohmer V, Tamburrano G, et al. Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91 (9):3316-23.

Dean. P.G., Van Heerden, J.A., Farley, D.R., Thompson, G.B., Grant, C.S., Harmsen, W.S., Ilstrup, D.M. Are patients with Multiple Endocrine Neoplasia type 1 prone to premature death? *World J Surg.*, 2000; 24, 1437–1441.

Dotzenrath, C.; Goretzki, P. E.; Cupisti, K.; Yang, Q.; Simon, D.; Röher, H. D. Malignant endocrine tumors in patients with MEN 1 disease. *Surgery.* 2001; 129:91-95.

Doherty G.M, Olson J.A., Frisella M.M., Lairmore T.C., Wells S.A. Jr., Norton J.A. Lethality of multiple endocrine neoplasia type 1. *World J Surg.*, 1998; 22, 581–587.

Emmert-Buck MR. Lubensky IA. Dong Q. et al. Localization of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1) gene based on tumor loss of heterozygosity analysis. *Cancer Res.* 1997; 57:1855-1858

Ellard S, Hattersley A.T., Brewer C.M, Vaidya B. Detection of an *MEN1* gene mutation depends on clinical features and supports current referral criteria for diagnostic molecular genetic testing. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2005; 62, 169-175.

Forbes S.A, Bassett J.H, Thakker R.V. Identification of the Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1) gene. *Hum Mol Genet.*, 1997; 6, 1177-1183.

Friedman E., Sakaguchi K., Bale A.E., Falchetti A., Streeten E., Zimering M.B., Weinstein L.S., McBride W.O., Nakamura Y., Brandi M.L. Clonality of parathyroid tumors in familial multiple endocrine neoplasia type 1. *N Engl J Med.*, 1989; 321, 213-218.

Ganguly, A. Rock, M.J. and Prockop, D.J. Conformation sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993; 90: 10325 - 10329.

Ganguly T. Dhulipala, R. Godmilow, L. and Ganguly, A. High Throughput Fluorescence Based Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (F-CSGE) Identifies Six Unique BRCA2 Mutations and An Overall Low Incidence of BRCA2 Mutations In High Risk BRCA1 Negative Breast Cancer Families. *Hum Genet.* 1998; 102, 549-556.

Geerdink EA, Van der Luijt RB, Lips CJ. Do patients with multiple endocrine neoplasia syndrome type 1 benefit from periodical screening ? *Eur J Endocrinol.* 2003;149 (6):577-82.

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.

Giraud S., Zhang, C.X., Serova-Sinilnikova, O., Wautot V., Salandre J., Buisson N., Waterlot C., Bauters C., Porchet N., Aubert J.P., Emy P., Cadiot G., Delemer B., Grattapaglia D., Kalupniek S., Guimaraes C.S., Ribeiro M.A., Diener P.S., Soares C.N. Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian populations. *Forensic Sc Intern.*, 2005; 149, 99-107.

Glascock MJ, Carty SE. Multiple endocrine neoplasia type 1: fresh perspective on clinical features and penetrance. *Surg Oncol.* 2002; 11 (3):143-50.

Grama D, Skogseid B, Wilander E, Eriksson B, Martensson H, Cedermark B, et al. Pancreatic tumors in multiple endocrine neoplasia type 1: clinical presentation and surgical treatment. *World J Surg.* 1992; 16 (4):611-8.

Guru SC, Crabtree JS, Brown KD, et al. Isolation, genomic organization, and expression analysis of *MEN1*, the murine homolog of the MEN 1 gene. *Mamm Genome.* 1999; 10:592-596

Hai N, Aoki N, Shimatsu A, Mori T, Kosugi S. Clinical features of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) phenocopy without germline *MEN1* gene mutations: analysis of 20 Japanese sporadic cases with MEN1. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000; 52 (4):509-18.

Higgins D.G., Thompson J.D., Gibson T.J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Meth.Enzymol.*1996; 266, 383-402.

Hoff A.O., Cote G. J, Gagel R. F. Multiple Endocrine Neoplasias. *Annu Rev Physiol.*2000; 62: 377-411.

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

Ikeo Y.Sakurai A. Suzuki R. et al. Proliferation-associated expression of the *MEN1* gene as revealed by *in situ* hybridization: possible role of the menin as a negative regulator of the cell proliferation under DNA damage. *Lab Invest.* 2000; 80:797-804

Ikeo Y. Sakurai A. Hashizume K. Characterization of the *MEN1* gene produce, menin, by site-specific polyclonal antibodies. *Jpn J Cancer Res.* 2000; 90:1088-1095

Jäger A.C., Friis-Hansen L., Hansen T.V., Eskildsen P.C., Solling K., Knigge U., Hansen C.P., Andersen P.H., Brixen K., Feldt-Rasmussen U., Kroustrup J.P., Mollerup C.L., Rehfeld J.F., Blichert-Toft M., Nielsen, F.C. Characteristics of the Danish families with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Mol Cell Endocrinol.* 2006; 249, 123-132.

Janson M, Larsson C, Werelius B, et al. Detailed physical map of human chromosomal region 11q12-13 shows high meiotic recombination rate around the MEN 1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:10609-10613

Jap T.S., Chiu, C.Y., Won, J.G., Wu, Y.C., Chen, H.S. Novel mutations in the *MEN1* gene in subjects with Multiple Endocrine Neoplasia-1. *Clin Endocrinol.(Oxf)*, 2005; 62, 336-342

Jorge BH, Agarwal SK, Lando VS, Salvatori R, Barbero RR, Abelin N, et al. 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; 86 (2):542-4.

Kaji H, Canaff L, Goltzman D, Hendy GN. Cell cycle regulation of menin expression *Cancer Res*. 1999; 59:5097-5101

Karges W. Maier S. Wissmann A. Dralle H. Dosch HM. Boehm BO. Primary structure, gene expression and chromosomal mapping of rodent homologs of the *MEN1* tumor suppressor gene. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1446:286-294

Katai M, Sakurai A, Ikeo Y, Hashizume K. Primary hyperparathyroidism in patients with multiple endocrine neoplasia type 1: comparison with sporadic parathyroid adenomas. *Horm Metab Res*. 2001; 33 (8):499-503.

Khodaei S. O'Brien KP. Dumanski J. Wong FK. Weber G Characterization of the MEN 1 ortholog in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 264:404-408

Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 68:820-823.

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.

Larsson C., Skogseid, B., Oberg, K., Nakamura, Y., Nordenskjold, M. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature*, 1988; 332, 85-87.

Lairmore. T.C., Piersall, L.D., DeBenedetti, M.K., Dilley, W.G., Mutch, M.G., Whelan, A.J., Zehnbauer, B. Clinical genetic testing and early surgical intervention in patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1). *Ann Surg.*, 2004; 239, 637-645.

Lee S, Chen DY, Humphrey JS, Gnarr JR, Linehan WM, Klausner RD Nuclear/cytoplasmic localization of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product is determined by cell density. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:1770-1775

Lemmens, I.; Van De Ven, W. J. M.; Kas, K.; Zhang, C. X.; 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.

Lemmens. I., Van de Ven, W.J., Kas, K., Zhang, C.X., Giraud, S., Wautot, V., Buisson, N., De Witte, K., Salandre, J., Lenoir, G., Pugeat, M., Calender, A., Parente, F., Quincey, D., Gaudray, P., De Wit, M.J., Lips, C.J., Hoppener, J.W., Khodaei, S., Grant, A.L., Weber, G., Kytola, S., Teh, B.T., Farnebo, F., Phelan, C., Hayward, N., Larsson, C., Pannet, A.A., 8 Stenson. P.D., Ball. E.V., Mort. M, Phillips. A.D., Shiel. J.A., Thomas. N.S., Abeyasinghe. S, Krawczak. M., Cooper. D.N. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat.* 2003 ; 21, 577-581.

Lourenço, D. M. Montagnini, A. Cerqueira, M. C. M.; Toledo S. P. A; Insulinoma como primeira manifestação da Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM-1). *Arqu Bras Endocrinol Metab.* 1998a; , v.42,n.5 (suplem 1):72.

Lourenço, D. M. ; Abelin, N.; Ezabella, M. C.; Toledo S. P. A; Prolactinoma como primeira manifestação clínica de Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM-1). *Arqu Bras Endocrinol Metab.* 1998b; v.42, n.5 (suplem 1):72.

Lourenço D. M. Changling, D. Mackowiak, I. I. F. Levine, M. Toledo S. P. A. Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1: aspectos clínicos e genéticos. *Arqu Bras Endocrinol Metab.* 2000; v. 44 n.5 (suplem 1):208.

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

Lourenço D. M. Neoplasia endócrina múltipla Tipo 1: estudo clínico e gênico de uma grande família brasileira. Tese de Doutorado, FMUSP, 2002a.

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.

Lourenço-Jr DM, Toledo SPA, Toledo RA. Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1. In: Tratado de Clínica Médica.São Paulo: Roca Ed., 2006. p 3535.

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.

Lubensky I A, Debelenko LV, Zhuang Z, et al Allelic deletions on chromosome 11q13 in multiple tumors from individual MEN 1 patients. *Cancer Res.* 1996; 56:5272-5278

Mallette L E. Management of hyperparathyroidism in the multiple endocrine neoplasia syndromes and other familial endocrinopathies. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1994; 23 (1):19-36.

Manickam P. Vogel A M. Agarwal SK. et al. Isolation, characterization, expression and functional analysis of the zebrafish ortholog of MEN 1. *Mamm Genome.* 2000; 11:448-454

Maruyama K, Tsukada T, Hosono T, et al. Structure and distribution of rat menin mRNA. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 156:25-33

Maruyama K, Tsukada T, Honda M. et al Complemetary DNA structure and genomic organization of *Drosophila* menin. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 168:135-140

Marx SJ, Vinik AI, Santen RJ, Floyd JC Jr, Mills JL, Green J 3rd. Multiple endocrine neoplasia type I: assessment of laboratory tests to screen for the gene in a large kindred. *Medicine (Baltimore)* 1986; 65 (4):226-41.

Marx, S. J.; Agarwal, S. K.; Heppner, C.; Kim, Y. S.; Kester, M. B.; Goldsmith, P. K. et al. The Gene for Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Bone* 1999; 25:119-22

Marx SJ. Agarwal SK. Kester MB. et al. Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical and genetic features of the hereditary endocrine neoplasias. *Recent Prog Horm Res.* 1999a; 54:397-438

Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5:367-375

Matsuzaki LN, Canto-Costa MH, Hauache OM. Cushing's disease as the first clinical manifestation of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) associated with an R460X mutation of the *MEN1* gene. *Clin Endocrinol(Oxf)* 2004;60:142-3.

Metz, D. C.; Jensen, R. T.; Bale, A. E.; Skarulis, M. C.; Eastman, R. C.; Nieman, L. et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type I: clinical features and management. In: Bilezikian, J. P.; Levine, M. A.; Marcus, R. ed. The Parathyroids. New York, *Raven Press.* 1994; 591-646.

Metz DC, Jensen RT, Bale AE, Skarulis MC, Eastman RC, Nieman L, et al. In: *The Parathyroids: Raven Press*, New Your, 1994, p. 591-647

Miller S.A, Dykes D.D. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*1988; 16, 1215.

Morelli A., Falchetti A., Martineti V., Becherini L., Mark, M., Friedman, E., Brandi, M.L. *MEN1* gene mutation analysis in Italian patients with multiple endocrine neoplasia type 1 *Eur J Endocrinol.*, 2003;142, 131-137.

Mutch M.G., Dilley, W.G., Sanjurjo F., Debenedetti M.K., Doherty, G.M., Wells Jr., S.A., Goodfellow P.J., Lairmore T.C. Germline mutations in the Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 gene: evidence for frequent splicing defects. *Hum Mutat.* 1999; 13, 175-185.

Myers R. M, Maniatis T. Lerman L.S. Detection and localization of single base pair changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Meth Enzymol.* 1987; 155:501-527

Nakamura Y. Larsson C. Julier C. et al. Localization of the genetic defect in multiple endocrine neoplasia type 1 within a small region of chromosome 11. *Am J Hum Genet* 1989; 44:751-755

Norton JA, Fraker DL, Alexander HR, Venzon DJ, Doppman JL, Serrano J, et al. Surgery to cure the Zollinger-Ellison syndrome. *N Engl J Med.* 1999; 341 (9):635-44.

Olufemi, S. E.; Collins, F. S.; Emmert-Buck, M. R. et al. Positional cloning of the gene for Multiple Endocrine Neoplasia-Type 1. *Science* 1997; 276:404-407

Ohe MN, Santos RO, Barros ER, Lage A, Kunii IS, Abrahao M, et al. Changes in clinical and laboratory findings at the time of diagnosis of primary hyperparathyroidism in a University Hospital in Sao Paulo from 1985 to 2002. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38 (9):1383-7.

Pannett A. A. J., Thakker R. V. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Endoc Relat Cancer.* 1999; 6:449-73

Pannett AA, Thakker RV. Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson "two-hit" hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86 (9):4371-4.

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.

Santos MA, Nunes AB, Abelin N, Ezabella MC, Toledo Rde A, Toledo SP. Genetic screening of multiple endocrine neoplasia type 2: Experience of the USP Endocrine Genetics Unit. *Arqu Bras Endocrinol Metabol*. 2006; 50 (1):7-16.

Scappaticci S, Maraschio P, Del Ciotto N, Fossati GS, Zonta A, Fraccaro M. Chromosome abnormalities in lymphocytes and fibroblasts of subjects with multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 52:85-92

Schussheim, D. H.; Skarulis, M. C.; Agarwal, S. K.; Simonds, W. F.; Burns, A. L.; Spiegel, A. M.; Marx, S. M. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: new clinical and basic finding. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12 (4): 173-178.

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.

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.

Stewart C, Parente F, Piehl F. et al. Characterization of the mouse *MEN1* gene and its expression during development. *Oncogene* 1998; 17:2485-2493

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.

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

Teh. B.T., Kytölä. S, Farnebo F., Bergman L., Wong. F.K., Weber. G., Haymard N., Larsson. C. Mutation analysis of the *MEN1* gene in multiple endocrine neoplasia type 1, familial acromegaly and familial isolated hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.*, 1998; 83: 2621-2626.

Teh BT, Zedenius J, Kytola S, Skogseid B, Trotter J, Choplin H, et al. Thymic carcinoids in multiple endocrine neoplasia type 1. *Ann Surg.* 1998; 228 (1):99-105.

Thakker Rv. Bouloux P. Wooding C. et al. Association of parathyroid tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 with loss of alleles on chromosome 11 *N Engl J Med.* 1989; 321:218-224

Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000; 29 (3):541-67.

Thompson NW. The surgical management of hyperparathyroidism and endocrine disease of the pancreas in the multiple endocrine neoplasia type 1 patient. *J Intern Med.* 1995; 238 (3):269-80.

Toledo RA, Lourenco Jr DM, Coutinho FL, Cavalcanti MG, Quedas E, Silva MER, et al. A Importância do Diagnóstico Molecular na Identificação de Fenocópias em Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1. *Arqu Bras Endocrinol Metab* 2006;(50):S619.

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.

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

Trump D, Farren B, Wooding C, Pang JT, Besser GM, Buchanan KD, et al. Clinical studies of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *QJM.* 1996; 89 (9):653-69.

Tso A.K., Rong, R., Lo, C.Y., Tan, K.C., Tiu, S.C., Wat, N.M., Xu, J.Y., Villablanca, A., Larsson, C., Teh, B.T., Lam, K.S. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1): genetic and clinical analysis in the Southern Chinese. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003; 59, 129-135.

Turner J.J., Leotlela, P.D., Pannett A.A., Forbes, S.A., Bassett, J.H., Harding, B., Christie, P.T., Bowen-Jones, D., Ellard S., Hattersley A., Jackson C.E., Pope R., Quarrell O.W., Trembath R., Thakker R.V. Frequent occurrence of an intron 4 mutation in multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2002; 87; 2688-2693.

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

Wautov V. Khodaei S. Frappart L. et al. Expression analysis of endogenous menin, the product of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene in cell lines and human tissues. *Int J Cancer.* 2000; 85:877-881

Wautot. V., Vercherat, C., Lespinasse, J., Chambe, B., Lenoir, G.M., Zhang, C.X., Porchet, N., Cordier, M., Beroud, C., Calender, A. Germline mutation profile of MEN1 in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: search for correlation between phenotype and the functional domains of the MEN1 protein. *Hum Mutat* 2002; 20, 35-47.

Wayne CM. Maclean II JA. Cornwall G. Wilkinson MF. Two novel human X-linked homeobox genes, hPEPP1 and hPEPP2, selectively expressed in the testis *Gene* 2002; 301:1-11

Weitzmann M.N., Woodford K.J., Usdin K. DNA secondary structures and the evolution of hypervariable tandem arrays. *J Biol Chem* 1997; 272: 9517-9523.

Wermer P. Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands. *Am. J. Med* 1954;16:363-71.

Wilkinson S., Teh B.T., Davey K.R., McArdle J.P., Young, M., Shepherd J.J. Cause of death in multiple endocrine neoplasia type 1. *Arch Surg.*1993; 128: 683-690.

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.

Yazgan O, Pfarr C.M. differential binding of the menin tumor suppressor protein to JunD isoforms. *Cancer Res.* 2001; 61: 916-920.

Apêndices

APENDICE 1

Artigo 1 - Enviado para Revista *Clinical Endocrinology* (em revisão).

**Novel *MEN1* germline mutations in Brazilian families with
Multiple Endocrine Neoplasia type 1.**

**Rodrigo A. Toledo, Delmar M. Lourenco-Jr, Flavia L. Coutinho,
Elisangela Quedas, Ivone Mackowiack, Marcel C.C. Machado, Fabio
Montenegro, Malebranche B.C. Cunha-Neto, Bernardo Liberman, Maria
A.A. Pereira, Pedro H.S. Correa, Sergio P.A. Toledo*.**

Unidade de Endocrinologia Genética LIM-25, Endocrinologia, Hospital das
Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil.

Short title: Novel *MEN1* germline mutations in Brazilian families.

Key words: Multiple Endocrine Neoplasia type 1, MEN1, MEN1 gene,
mutations, genetic screening.

Figures: 1

Tables: 2

* Corresponding author: Sergio P.A. Toledo

Address: Av. Dr. Arnaldo, 455, 5º andar, 01246-903, São Paulo, SP, Brazil.

FAX: 55-11-3061-7252. Email: toldo@usp.br

ABSTRACT

Objective: To characterize clinical features and identify *MEN1* germline mutations in Brazilian families with Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1).

Settings: Non-profit academic center.

Patients: Fourteen Brazilian families with MEN1 and 141 at-risk relatives were clinically and genetically studied.

Results: We identified 12 different *MEN1* disease-causing mutations. Seven of them were previously unreported: 308delC, 375del21, 1243del1, I147F, L413R, L414P and W471C. Families with the recurrent mutations 360del4 and L413R were shown to be unrelated by mt-DNA and Y-chromosome haplotype analyses. The four novel missense mutations were found to be located at highly conserved residues by evolutionary analysis, whereas the three novel deletion/frameshift mutations occurred at GC-rich repetitive regions. Genetic screening was performed by direct sequencing and identified 38 *MEN1* mutation carriers, 37 (97.3%) of whom had already shown MEN1-related tumors at clinical investigation.

Conclusions: In conclusion, we report on the first clinical and genetic screening of MEN1 families in South America. We were able to identify seven novel *MEN1* disease-causing mutations and showed that the missense mutations occurred in evolutionary conserved regions, predicted to be functionally relevant domains of menin protein. Our results underscore the need for implementing a systematic MEN1 screening program in Brazil. At our Institution, we have begun to establish such program.

INTRODUCTION

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1; OMIM 131100) is a high-penetrance tumor syndrome mainly characterized by the triad: parathyroid (95-100%), pituitary (30%) and enteropancreatic tumors (50%). MEN1 is clinically diagnosed by the occurrence of MEN1-related tumors in at least two of these endocrine glands (1). The familial form of the disease presents autosomal dominant inheritance and it is identified when a first-degree relative presents at least one MEN1-related tumor (2).

The MEN1 syndrome locus was localized at 11q13 (3, 4) and the gene responsible for MEN1 (MEN1) was isolated by two different groups (5, 6). High prevalence of inactivating MEN1 mutations has been reported leading to MEN1 syndrome (7). To date, more than 400 MEN1 mutations have been identified (2, 8) and no mutation hot-spots or genotype-phenotype correlations have been observed (5, 9-12). In addition, loss of heterozygosity (LOH) has been found at 11q13 in inherited and sporadic MEN1-related tumors, showing that MEN1-tumorigenesis is in accordance with Knudson's classical hypothesis for tumor suppressor genes (13). MEN1 product, a 610-amino-acid protein named menin, binds to a variety of transcription factors, such as JunD, Smad1, Smad3, Runx2, Pem; binds to DNA processing factors, such as FANCD2, RPA2, ASK; a genome stability factor, nm23H1 and can also directly interact with gene promoters (2, 14). However, the full role of menin remains unknown.

Presently, MEN1 is considered a multi-spectrum disease, as more than 20 neoplasias involving benign and malignant; endocrine and non-endocrine;

functional and non-functional tumors have been associated with this syndrome (2). The malignant MEN1-related neoplasms constitute the main cause of death in this syndrome (15-18), leading to lower survival rates in MEN1 patients (19). There is no early surgical intervention proven to significantly improve the outcome of MEN1. Thus, periodic biochemical and imaging screenings are recommended for MEN1-related tumor surveillance (12). The proposed clinical follow-up for MEN1 is a laborious, cost-expensive and life-long procedure, although it enables the detection of MEN1-neoplasm evidence several years before its clinical manifestation, which is believed to decrease morbidity and mortality (12, 20). Presently, genetic screening constitutes an important double information tool for better management of MEN1 syndrome as it a) identifies mutation carriers, who should undergo clinical surveillance and b) rules out no-mutation carriers and their descendants from this clinical follow-up. At present, genetic screening for MEN1 is mostly available in developed countries.

To our knowledge, this study is the first screening of MEN1 families performed in South America, aiming at clinically and genetically investigating Brazilian patients with MEN1 and providing genetic diagnosis for at-risk relatives.

SUBJECTS AND METHODS:

Clinical approach

This study has been approved by local ethics committee. The diagnosis of MEN1 was based on the presence of tumors in at least two main

MEN1-related glands. Hyperparathyroidism (HPT) was identified based on the presence of hypercalcemia associated with inappropriately elevated/borderline PTH serum levels. Prolactinoma (PRL) was diagnosed by consistently high serum prolactin concentrations associated with pituitary adenoma, shown by MRI. Insulinoma (INS) was recognized verifying insulin/glucose ratios. Gastrinoma (GA) was diagnosed by the presence of repetitive gastro-duodenal ulcers, hypergastrinemia and endoscopic ultrasonography findings. Somatotropinoma was diagnosed through measurements of GH and IGF1, and pituitary MRI. Cushing syndrome was ruled out by clinical findings and ACTH/cortisol measurements. Other rare involvements such as carcinoids were also actively searched.

We clinically diagnosed 14 unrelated index-cases with MEN1 referred to our Unit at the Hospital das Clínicas, University of São Paulo, School of Medicine. Familial MEN1 was diagnosed when a MEN1-related tumor was found in a first-degree relative (12). All mutation carriers were subjected to the same clinical, hormonal and image procedures applied to index-cases.

Hormone measurements

The protocol included serum measurements of PTH, prolactin, GH, IGF-1, TSH, LH, FSH, ACTH, cortisol, gastrin, insulin, testosterone, estradiol, free T-4, as well as glucose and serum and urinary calcium. Immunofluorimetric assay was used for measuring LH, FSH, testosterone, GH, prolactin and free T-4. TSH was measured using ultra-sensitive immunofluorimetric assay. ACTH was measured by immunoradiometric assay and IGF-1 by using IRMA

after alcohol-acid extraction. Insulin and gastrin were evaluated by radioimmunoassay. Serum cortisol was measured by fluorimetric method. Serum total calcium, calciuria and glycemia were measured by spectrophotometry. Hormonal and biochemical measurements were all performed in the same laboratory.

DNA extraction and *MEN1* mutation analysis

After obtaining informed consent from each subject, peripheral blood was collected from 14 index-cases and 141 at risk family members, 115 of which came from an extended pedigree (family 1). In addition, DNA samples from 50 Brazilian healthy individuals were obtained as controls. Genomic DNA was extracted according to standard protocol (21) or GFX Genomic Blood DNA Kit (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA).

The entire coding regions (exons 2-10) and intron/exon boundaries of *MEN1* were amplified by PCR using primers reported previously (5,22). PCR reactions were performed in a total volume of 30 μ L containing 200 ng of genomic DNA, 1X reaction buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM of each dNTP, 0.5 pmol of each primer and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil). PCR thermocycling conditions were carried out as follows: 3 min at 94° C, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 45 s at 65-60 °C touch down annealing temperature program (minus 1 °C per cycle until 60 °C) and 1 min at 72 °C, followed by 10 min of final extension at 72 °C. PCR products were confirmed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and purified using a Concert Rapid PCR Purification System kit (Life Technologies, Bethesda, MD).

Sequencing reactions were directly performed from purified PCR products using internal primers (5, 22) and Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). All mutations were confirmed using a second DNA sample from an independently collected blood. Analyses were carried on an automated sequencer (ABI Prism 310 DNA Analyser, Applied Biosystems), according to the manufacturer's recommendations. The homology of generated sequences was obtained using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Two sequence editor softwares (Gene Studio™ Professional Edition, Suwanee, and Mutation Surveyor software, Softgenetics, PA) were used helping DNA abnormalities identification.

Haplotype analysis

To check possible kinship of index-cases which shared recurrent mutations, mt-DNA and Y-chromosome haplotype analyses were performed. Hypervariable segment (HVS-I), between nucleotide positions 16060 and 16362 (GenBank accession n. AF243627) of mtDNA, was amplified using previously described primers (23). PCR products were purified and directly sequenced following the same protocol used for *MEN1* mutation analysis. Y-chromosome haplotypes were automatically determined using fluorescent-labeled primers for seven microsatellite loci: DYS19, DYS389-I, DYS389-II, DYS390, DYS391, DYS392 and DYS393 (24). For Y-chromosome analysis, samples of a male first-degree relative (father or brother), when available, were used when proband was female.

Menin alignment analysis

To determine functional importance of the sites in which missense mutations have occurred, evolutionary conservation was investigated. Thus, menin amino acids sequences of human, mouse, rat, fish, amphibian and insect (GenBank Accession N# AAC51228, AAD37498, BAA82134, AAF25885, NP_001016361, NP_723252, respectively) were aligned using ClustalW (25).

RESULTS

Mutation analysis

Fourteen MEN1 probands reporting a family history of MEN1 were identified (10 females, 4 males; mean age 41 ± 15.5 years, range 18-74 years). All index cases presented HPT. PRL was diagnosed in 8 cases; INS was observed in 6 and GAs were identified in 6 cases (Table 1). Proband #1 presented a gastric carcinoid.

Twelve different germline mutations were identified: four frameshifts, 308delC, 360del4, 1059del1 and 1243del1, resulting in premature stop at codons 118, 117, 415 and 457, respectively; four missense mutations, 549A>T (I147F), 1348T>G (L413R), 1351T>C (L414P) and 1523G>T (W471C); two nonsense mutations, R415X and R527X; one splicing type, IVS3+1 and a large deletion, 375del21. Probands #4 and #5 shared the 360del4 mutation and probands #8 and #9 shared the L413R mutation. In total, five *MEN1* mutations were found in exon 2 (35.7%), three of them in

codons 84-88. Other four mutations (28.5%) were located in exon 9 and were restricted to codons 413-415. Two mutations were located in exon 10. In addition, one mutation was found in exon 7, one in exon 8 and another in intron 3 (Table 1).

Seven *MEN1* disease-causing mutations were previously unreported (Table 2). The novel deletion/frameshift mutations were located in two GC-rich regions between 299-386 and 1241-1250 nucleotides of the *MEN1* coding region (Genebank access number U93236). The novel missense mutations were located at conserved amino acids of the menin sequence (Figure 1).

Haplotype analysis

To rule out the hypothesis of an unreported kinship between families with recurrent mutations, informative samples were tested for mtDNA and Y-chromosome haplotype analyses. Distinct haplotypes identified in both paternal and maternal lineages of the probands (data not shown) are in accordance with the multi-ethnic population reported in Brazil and confirmed that these families did not share common ancestors (23, 24).

Genetic and clinical screening

Genetic screening performed by direct sequencing of 141 available at-risk relatives identified 38 *MEN1* mutation carriers (22 males, 16 females, mean age 39.6 ± 16.0 years; range 14-61 years). All mutation-positive individuals were invited to come for clinical, hormonal and image

investigations. It was shown that 37 of them (97%) already presented at least one MEN1-related tumor: 16 had one tumor, 8 had two tumors, 11 had three tumors and 2 had four tumors. HPT was found in 35 (94%) and PRL was observed in 11 cases (30%). Entero-pancreatic endocrine tumors were observed in 18 (48%): 10 (55%) of which were GAs, 6 (33%) were non-functional adenomas and 3 (16%) were INS. Mutation carrier #6 presented both INS and GA. Carcinoids were found at similar frequencies (~ 10%) both in probands and affected family members (Table 2).

The at-risk member #135 was shown to be a MEN1 phenocopy (Table 2, ref 26). He presented primary HPT with recurrent renal lithiasis, although he had not inherited the mutated allele identified in the proband (tested three times), thus suggesting a sporadic cause for HPT. Other non-carrier individuals reported no MEN1-related symptoms. Although there was a history of MEN1 in all studied families, relatives from families 7-14 were not available for genetic testing.

Of note, 27 of 38 mutation carriers belonged to family 1 and 26 of them (96%) already presented at least one MEN1-related tumor at clinical screening (Table 2). The couple that originated this family came from Veneto (Italy) to Brazil circa 1890 and to date it comprises six generations, including 115 at-risk family members (Table 2).

MEN1 polymorphisms

Ten of the 14 MEN1 probands (71%) presented the common *MEN1* polymorphism at codon 418 of exon 9 (D418D) which changes GAC to GAT

(5). Index-cases #7, 8, 11 and 12 did not carry this polymorphism (Table 1). The frequency of the D418D in the 50 Brazilian controls that were genotyped was 46% (data not shown). Additionally, case #8 had the benign A541T polymorphism (exon 10).

DISCUSSION

This study is the first systematic screening analysis of MEN1 syndrome performed in South America. Fourteen unrelated MEN1 Brazilian families were analyzed. According to the Human Genome Mutation Database (8), five previously reported and seven novel mutations were identified. The pathogenic mechanism of these novel mutations remains unknown; however, data from segregation, biochemical, evolutionary and functional studies may provide insights into menin functions potentially disrupted by these mutations.

Two novel *MEN1* frameshift mutations, 308del1 and 1243del1, were identified in probands #1 and 7, respectively. Frameshift mutations result in truncated proteins that can usually be appointed as the disease-causing change without further analysis. Accordantly, the 308del1 allele co-segregated with MEN1 disease in 27 relatives who were mutation carriers (family 1; Table 2).

The 375del21 mutation, identified in proband 2, deletes amino acids 89 to 95 of the predicted protein; however, its nuclear localization signals as well as JunD interacting regions are predicted to remain intact (14). No other deleterious DNA alteration was found and the affected allele co-segregated with the MEN1 disease in this family. Two family members who inherited the

375del21 mutation had HPT, PRL and GA (case #118) and HPT and GA (case #119), whereas three other relatives (cases #120-122), who did not inherit the affected allele, had no MEN1-related features (Table 2). Thus, the lack of the amino acids 89-95 of the menin protein is likely to disrupt menin and cause MEN1 disease.

Of note, these novel deletion/frameshift mutations occurred in GC-rich sequences, which are predisposed to slippage (27). This mechanism has been suggested in MEN1 in previous genetic studies (10, 28).

The I147F, L413R, L414P and W471C missense mutations were not previously associated with MEN1. Menin alignment has shown that these four codons contain a conserved amino acid (Figure 1A), suggesting that they may have retained an important evolutionary function. The biochemical characteristic of these amino acids is shifted (Figure 1B) and thus it is likely to be the cause of menin inactivation.

Indeed, the I147F mutation was found to co-segregate with MEN1 clinical features in family 3. Nine at-risk family members were genetically tested, five of them were mutation carriers and all presented at least one MEN1-related tumor (Table 2). No DNA samples were available for the segregation analysis of the three other missense mutations. However, we screened an additional 100 alleles from 50 Brazilian control individuals and were able to exclude the L413R, L414P and W471C changes as unreported polymorphisms. A possible pathogenic mechanism for these missense mutants is the rapid degradation of the resulting protein via ubiquitin-proteasome pathway, as previously described for other missense mutations (29).

Of note, three MEN1 probands studied had missense mutations within amino acids 413-414, a highly conserved region of menin sequences from drosophila to humans. Changes occurring in these codons are predicted to disrupt the menin/JunD interaction, as they are located at the third JunD-binding domain of menin (30).

The five other mutations reported in this study had been previously described in association with MEN1 disease. The 360del4 mutation has been frequently identified in European MEN1 patients, suggesting that this may be a common mutation (6). Interestingly, two unrelated Brazilian families (#4 and 5) were found to share the 360del4 mutation (Table 1). Teh et al (1998) studied five unrelated MEN1 families presenting nucleotide deletion at position 359, which indicated that this region is a mutation “warm spot” (31). Importantly, these 359-360 common mutations are located at the same GC-rich region, 299-386 nucleotides, in which both novel 308del1 and 375del21 mutations were also found. Our findings support the hypothesis of a mutational “warm spot” in this gene region, which would explain the reason for its higher mutation prevalence.

The 1059del1 frameshift mutation found in family 6 was previously described in an Italian MEN1 kindred (32). Family 6 has alleged Italian ancestors, although DNA samples from these Italian relatives were not available for haplotype testing.

Proband #11 and 13 had the R415X and R527X nonsense mutations, respectively (5, 6). Both mutations are predicted to result in truncated proteins lacking the second nuclear localization signal (NLS2) and thus are

likely to reduce or inactivate the anti-tumorigenic functions of menin. Proband 14 presented the IVS3+1 mutation that affect the donor splice site of intron 3 (31). Splicing mutations have been previously reported in MEN1 (8, 33).

The D418D polymorphism (GAC→GAT) at codon 9 is so far the most common benign nucleotide change identified in *MEN1* gene, observed in 42-47% of USA and European MEN1 kindreds (5,10,11,28,34,35). An even higher frequency (71%) of this polymorphism was detected in our index-cases (Table 1). This finding may be merely due to the limited number of families, however two different studies using direct sequencing approach (which eliminate false negatives known to occur in other mutation screening methods) reported low frequencies of 25% and 0%, respectively, of D418D in Asian MEN1 kindreds (36,37). Taken together, these findings suggest that frequencies of this common polymorphism may greatly vary in MEN1 kindreds with different genetic backgrounds.

Virtually all family members who were mutation carriers already presented MEN1-related tumors at clinical investigation, a situation likely to be related to the absence of a previous screening program. Accordingly, one may speculate that *MEN1* mutation carriers from areas where MEN1-screening programs are lacking could frequently present as symptomatic cases. Similarly, increased numbers of symptomatic primary HPT cases are still observed in areas where serum calcium screening is not routinely performed (38,39).

In conclusion, we report on the first clinical and genetic MEN1 screening in South America. We genetically investigated 14 families and

were able to identify seven novel *MEN1* disease-causing mutations, all of them occurring at regions prone to slippage during DNA replication or at evolutionary conserved sites of menin protein, predicted to be functionally relevant domains. Moreover, our familial genetic screening underscored the need for implementing a systematic MEN1 screening program in Brazil. At our Institution, we have begun to establish such program.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to patients and their families for participating in this study. We thank Dr. Gilbert Cote (MD Anderson Cancer Center, TX) for helping with genetic protocol; Dr. Dario Grattapaglia (Hereditas Tecnologia em DNA) for performing Y-chromosome assays and Dr. Cinthia Bachir for interesting comments. We also thank Maria G. Cavalcanti for excellent social support to patients. We thank Dr. Jonathan Liu (Softgenetics, PA, US) for assistance in mutation analysis. We acknowledge Dr. Berenice B. Mendonça, Head Professor of Endocrinology-FMUSP, for her constant support to the MEN1 screening project. This study was supported by São Paulo State Research Foundation, FAPESP grant N# 02/09860-8. S.P.A.T. is partially supported by Brazilian National Research Council, CNPq; R.A.T, S.P.A.T. and D.M.L are recipients of Fundação Faculdade de Medicina fellowships.

REFERENCES

- 1 Brandi. M.L., Marx, S.J., Aurbach, G., Fitzpatrick, L. (1987) Familial Multiple Endocrine Neoplasia type 1: a new look at pathophysiology. *Endocrine Reviews*, **8**, 391-405.
- 2 Marx. S.J., (2005) Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nature Reviews Cancer*, **5**, 367-375.

- 3 Larsson. C., Skogseid, B., Oberg, K., Nakamura, Y., Nordenskjold, M. (1988) Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature*, **332**, 85-87.
- 4 Friedman. E., Sakaguchi, K., Bale, A.E., Falchetti, A., Streeten, E., Zimering, M.B., Weinstein, L.S., McBride, W.O., Nakamura, Y., Brandi, M.L. (1989) Clonality of parathyroid tumors in familial multiple endocrine neoplasia type 1. *The New England Journal of Medicine*, **321**, 213-218.
- 5 Chandrasekharappa. S.C., Guru, S.C., Manickam, P., Olufemi, S.E., Collins, F.S., Emmert-Buck, M.R., Debelenko, L.V., Zuang, Z., Lubensky, I.A., Liotta, L.A., Crabtree, J.S., Wang, Y., Roe, B.A., Weisemann, J., Boguski, M.S., Agarwal, S.K., Kester, M.B., Kim, Y.S., Heppner, C., Dong, Q., Spiegel, A.M., Burns, A.L., Marx, S.J. (1997) Positional cloning of the gene for Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Science*, **276**, 404-407.
- 6 Lemmens. I., Van de Ven, W.J., Kas, K., Zhang, C.X., Giraud, S., Wautot, V., Buisson, N., De Witte, K., Salandre, J., Lenoir, G., Pugeat, M., Calender, A., Parente, F., Quincey, D., Gaudray, P., De Wit, M.J., Lips, C.J., Hoppener, J.W., Khodaei, S., Grant, A.L., Weber, G., Kytola, S., Teh, B.T., Farnebo, F., Phelan, C., Hayward, N., Larsson, C., Pannet, A.A., Forbes, S.A., Bassett, J.H., Thakker, R.V. (1997) Identification of the Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1) gene. *Human Molecular Genetics*, **6**, 1177-1183.
- 7 Ellard. S., Hattersley. A.T., Brewer. C.M., Vaidya. B. (2005) Detection of an *MEN1* gene mutation depends on clinical features and supports current referral criteria for diagnostic molecular genetic testing. *Clinical Endocrinology*, **62**, 169-175.
- 8 Stenson. P.D., Ball. E.V., Mort. M., Phillips. A.D., Shiel. J.A., Thomas. N.S., Abeyasinghe. S., Krawczak. M., Cooper. D.N. (2003) Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Human Mutation*, **21**, 577-581.
- 9 Wautot. V., Vercherat, C., Lespinasse, J., Chambe, B., Lenoir, G.M., Zhang, C.X., Porchet, N., Cordier, M., Beroud, C., Calender, A. (2002) Germline mutation profile of MEN1 in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: search for correlation between phenotype and the functional domains of the MEN1 protein. *Human Mutation*, **20**, 35-47.
- 10 Giraud. S., Zhang, C.X., Serova-Sinilnikova, O., Wautot, V., Salandre, J., Buisson, N., Waterlot, C., Bauters, C., Porchet, N., Aubert, J.P., Emy, P., Cadiot, G., Delemer, B., Chabre, O., Niccoli, P., Leprat, F., Duron, F., Emperauger, B., Cougard, P., Goudet, P., Sarfati, E., Riou, J.P., Guichard, S., Rodier, M., Calender, A. (1998) Germline mutation analysis in patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 and related disorders. *American Journal of Human Genetics*, **63**, 455-467.
- 11 Agarwal. S.K., Kester, M.B., Debelenko, L.V., Heppner, C., Emmert-Buck, M.R., Skarulis, M.C., Doppman, J.L., Kim, Y.S., Lubensky, I.A., Zhuang, Z., Green, J.S., Guru, S.C., Manickam, P., Olufemi, S.E., Liotta, L.A., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., Burns, A.L., Marx, S.J. (1997) Germline mutations of the MEN1 gene in familial Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 and related states. *Human Molecular Genetics*, **6**, 1169-1175.
- 12 Brandi. M.L., Gagel, R.F., Angeli, A., Bilezikian, J.P., Beck-Peccoz, P., Bordi, C., Conte-Devolx, B., Falchetti, A., Gheri, R.G., Libroia, A., Lips, C.J., Lombardi, G., Mannelli, M., Pacini, F., Ponder, B.A., Raue, F., Skogseid, B., Tamburrano, G., Thakker, R.V., Thompson, N.W., Tomassetti, P., Tonelli, F., Wells, S.A. Jr., Marx, S.J. (2001) Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 5658-5671.

- 13 Pannet. A.A., Thakker, R.V. (2001) Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson "two hit" hypothesis. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 4371-4374.
- 14 Agarwal. S.K., Kennedy, P.A., Scacheri, P.C., Novotny, E.A., Hickman, A.B., Cerrato, A., Rice, T.S., Moore, J.B., Rao, S., Ji, Y., Mateo, C., Libutti, S.K., Oliver, B., Chandrasekharappa, S.C., Burns, A.L., Collins, F.S., Spiegel, A. M., Marx, S.J. (2005) Menin molecular interactions: insights into normal functions and tumorigenesis. *Hormone and Metabolic Research*, **37**, 369-374.
- 15 Carty. S.E., Helm, A.K., Amico, J.A., Clarke, M.R., Foley, T.P., Watson, C.G., Mulvihill, J.J. (2003). The variable penetrance and spectrum of manifestations of multiple endocrine neoplasia type 1. *Surgery*, **124**, 1106–1114.
- 16 Wilkinson. S., Teh, B.T., Davey, K.R., McArdle, J.P., Young, M., Shepherd, J.J. (1993) Cause of death in multiple endocrine neoplasia type 1. *Archives of Surgery*, **128**, 683–690.
- 17 Doherty. G.M., Olson, J.A., Frisella, M.M., Lairmore, T.C., Wells, S.A.Jr., Norton, J.A. (1998) Lethality of multiple endocrine neoplasia type 1. *World Journal of Surgery*, **22**, 581–587.
- 18 Dean. P.G., Van Heerden, J.A., Farley, D.R., Thompson, G.B., Grant, C.S., Harmsen, W.S., Ilstrup, D.M. (2000) Are patients with Multiple Endocrine Neoplasia type 1 prone to premature death? *World Journal of Surgery*, **24**, 1437–1441.
- 19 Geerdink. E.A., Van der Luit R.B., Lips C.J. (2003) Do patients with multiple endocrine neoplasia syndrome type 1 benefit from periodical screening ? *European Journal of Endocrinology*, **149**, 577-582.
- 20 Lairmore. T.C., Piersall, L.D., DeBenedetti, M.K., Dilley, W.G., Mutch, M.G., Whelan, A.J., Zehnbauer, B. (2004) Clinical genetic testing and early surgical intervention in patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1). *Annals of Surgery*, **239**, 637-645.
- 21 Miller. S.A., Dykes, D.D. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **16**, 1215.
- 22 Cote. G.J., Lee, J.E., Evans, D.B., Huang, E., Schultz, P.N., Dang, G.T., Qiu, H., Shetelbine, S., Sellin, R.V., Gagel, R.F. (1998) Five novel mutations in the familial multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. *Human Mutation*, **12**, 219.
- 23 Callegari-Jacques. S.M., Grattapaglia, D., Salzano, F.M., Salamoni, S.P., Crossetti, S.G., Ferreira, M.E., Hutz, M.H. (2003) Historical genetics: Spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *American Journal Human Biology*, **15**, 824-834.
- 24 Grattapaglia. D., Kalupniek, S., Guimaraes, C.S., Ribeiro, M.A., Diener, P.S., Soares, C.N. (2005) Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian populations. *Forensic Science International*, **149**, 99-107.
- 25 Higgins. D.G., Thompson, J.D., Gibson, T.J., (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods in Enzymology*, **266**, 383-402.
- 26 Burgess. J.R., Nord, B., David, R., Greenaway, T.M., Parameswaran, V., Larsson, C., Shepherd, J.J., Teh, B.T. (2000) Phenotype and phenocopy: the relationship between genotype and clinical phenotype in a single large family with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Clinical Endocrinology*, **53**, 205-211.

- 27 Weitzmann. M.N., Woodford, K.J., Usdin, K. (1997) DNA secondary structures and the evolution of hypervariable tandem arrays. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 9517-9523.
- 28 Basset. J.H., Forbes, S.A., Pannett,A.A., Lloyd, S.E., Christie, P.T., Wooding, C., Harding, B., Besser, G.M., Edwards, C.R., Monson, J.P., Sampson, J., Wass, J.A., Wheeler, M.H., Thakker, R.V. (1998) Characterization of mutations in patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *American Journal of Human Genetics*, **62**, 232-244.
- 29 Yaguchi. H., Ohukura. N., Yakahashi. M., Nagumura. Y., Kitabayashi. I., Isukada., T. (2004) Menin missense mutants associated with multiple endocrine neoplasia type 1 are rapidly degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. *Molecular Cellular Biology*, **24**, 6569-6580.
- 30 Chandrasekharappa. S.C., & Teh. B.T. (1998) Functional studies of the *MEN1* gene. *Journal of Internal Medicine*, **256**, 606-615.
- 31 Teh. B.T., Kytöla. S., Farnebo. F., Bergman. L., Wong. F.K., Weber. G., Haymard. N., Larsson. C. (1998) Mutation analysis of the *MEN1* gene in multiple endocrine neoplasia type 1, familial acromegaly and familial isolated hyperparathyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83**, 2621-2626.
- 32 Morelli. A., Falchetti, A., Martineti, V., Becherini, L., Mark, M., Friedman, E., Brandi, M.L. (2000) *MEN1* gene mutation analysis in Italian patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *European Journal of Endocrinology*, **142**, 131-137.
- 33 Turner. J.J., Leotlela, P.D., Pannett, A.A., Forbes, S.A., Bassett, J.H., Harding, B., Christie, P.T., Bowen-Jones, D., Ellard, S., Hattersley, A., Jackson, C.E., Pope, R., Quarrell, O.W., Trembath, R., Thakker, R.V. (2002) Frequent occurrence of an intron 4 mutation in multiple endocrine neoplasia type 1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 2688-2693.
- 34 Mutch. M.G., Dilley, W.G., Sanjurjo, F., Debenedetti, M.K., Doherty, G.M., Wells Jr., S.A., Goodfellow,, P.J., Lairmore, T.C. (1999) Germline mutations in the Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 gene: evidence for frequent splicing defects. *Human Mutation*, **13**, 175-185.
- 35 Jäger. A.C., Friis-Hansen, L., Hansen, T.V., Eskildsen, P.C., Solling, K., Knigge, U., Hansen, C.P., Andersen, P.H., Brixen, K., Feldt-Rasmussen, U., Kroustrup, J.P., Møllerup, C.L., Rehfeld, J.F., Blichert-Toft, M., Nielsen, F.C. (2006) Characteristics of the Danish families with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **249**, 123-132.
- 36 Tso. A.K., Rong, R., Lo, C.Y., Tan, K.C., Tiu, S.C., Wat, N.M., Xu, J.Y., Villablanca, A., Larsson, C., Teh, B.T., Lam, K.S. (2003) Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (*MEN1*): genetic and clinical analysis in the Southern Chinese. *Clinical Endocrinology*, **59**, 129-135.
- 37 Jap. T.S., Chiu, C.Y., Won, J.G., Wu, Y.C., Chen, H.S. (2005) Novel mutations in the *MEN1* gene in subjects with Multiple Endocrine Neoplasia-1. *Clinical Endocrinology*, **62**, 336-342.
- 38 Ohe. M.N., Santos, R.O., Barros, E.R., Lage, A., Kunii, I.S., Abrahao, M., Cervantes, O., Hauache, O.M., Lazaretti-Castro, M., Vieira, J.G. Changes in clinical and laboratory findings at the time of diagnosis of primary hyperparathyroidism in a University Hospital in Sao Paulo from 1985 to 2002. (2005) *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, **38**, 1383-1387.

39 Bilezikian. J.P., Meng, X., Shi, Y. Silverberg, S.J. (2000) Primary hyperparathyroidism in women: a tale of two cities: New York and Beijing. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*, **45**, 158-165.

Table 1 – Clinical features and genetic analysis of 14 unrelated Brazilian patients with MEN1. Deleterious frameshift, large deletion, missense and splicing mutations were identified in *MEN1* gene of these cases. Seven novel mutations were reported in patients 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10 and 12. The D418D polymorphism at exon 9 was identified in 10 out of 14 cases (71%).

Patient	Sex/Age*	MEN1 Tumors	Exon-codon	Mutation**	Change	Effect	Reference	Polymorphism
1	F / 37	HPT, GA, GC	2 – 66	308del1	delC	frameshift	this study	D418D
2	F / 18	HPT, INS	2 – 88	375del21	del21bp	loss of 7aa	this study	D418D
3	F / 51	HPT, PRL, GA	2 – 147	549 A>T	I147F	missense	this study	D418D
4	F / 55	HPT, PRL, INS	2 – 84	360del4	delTCTA	frameshift	Ref 6	D418D
5	M / 55	HPT, NF-Ad	2 – 84	360del4	delTCTA	frameshift	Ref 6	D418D
6	F / 30	HPT, INS	7 – 317	1059del1	delC	frameshift	Ref 32	D418D
7	F / 51	HPT, PRL, GA, INS	8 - 378	1243 de11	delA	frameshift	this study	-
8	F / 39	HPT, PRL, INS	9 - 413	1348 T>G	L413R	missense	this study	A541T
9	M / 45	HPT, INS	9 - 413	1348 T>G	L413R	missense	this study	D418D
10	M / 28	HPT, PRL	9 – 414	1351 T>C	L414P	missense	this study	D418D
11	M / 42	HPT, PRL, GA	9 – 415	1353 C>T	R415X	nonsense	Ref 6	-
12	F / 74	HPT, GA	10 – 471	1523 G>T	W471C	missense	this study	-
13	F / 20	HPT, PRL	10 - 527	1689 C>T	R527X	nonsense	Ref 5	D418D
14	F / 29	HPT, PRL, GA	-	IVS3 +1	G>T	splicing	Ref 31	D418D

M, male; F, female; *, age of presentation (years); HPT, hyperparathyroidism; PRL, prolactinoma; GA, gastrinoma; INS insulinoma; NF-Ad, non-functional pituitary adenoma; GC, gastric carcinoid; aa, amino acid; -, absence or not applicable. The common polymorphism D418D is referred to a C >T nucleotide change in codon 418 at exon 9 of the *MEN1* gene (5).

**, Nucleotide position is numbered with reference to sequence U93236, GenBank accession number.

Table 2 – Collected data from *MEN1* genetic screening of at risk family members and subsequent clinical investigation of mutation-positive individuals. Almost all relatives harboring *MEN1* mutations (37/38, 97%) had at least one MEN1-related tumor: 16 had one MEN1-related tumor, 8 had two MEN1-related tumors, 11 had three MEN1-related tumors and 2 had four MEN1-related tumors; revealing an already advanced stage of the disease in this MEN1 at risk population.

Family	Mutation	Member	Age*	Sex	MEN1 Tumors			Other tumors	Diagnosis
					Parathyroid	Pituitary	Pancreas		
1	308del1	1	37	F	HPT	-	GA	GC	Proband 1
	Carrier	2	14	F	HPT	NF-Ad	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	3	16	F	-	PRL	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	4	16	M	-	PRL	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	5	18	M	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	6	21	M	HPT	PRL	INS GA	-	MEN1 Tu
	Carrier	7	22	F	HPT	PRL	GA	-	MEN1 Tu

	Carrier	8	23	M	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	9	24	F	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	10	24	M	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	11	26	F	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	12	33	M	HPT	-	GA	-	MEN1 Tu
	Carrier	13	34	M	-	-	-	-	asymptomatic
	Carrier	14	39	M	HPT	NF-Ad	NF-Ad	-	MEN1 Tu
	Carrier	15	44	M	HPT	NF-Ad	GA	-	MEN1 Tu
	Carrier	16	47	M	HPT	-	INS	-	MEN1 Tu
	Carrier	17	48	M	HPT	PRL	GA	-	MEN1 Tu
	Carrier	18	49	F	HPT	-	GA	-	MEN1 Tu
	Carrier	19	49	F	HPT	-	-	BC	MEN1 Tu
	Carrier	20	50	M	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	21	54	M	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	22	55	M	HPT	PRL	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	23	55	F	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	24	56	M	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	25	59	M	HPT	-	NF-Ad	BC	MEN1 Tu
	Carrier	26	61	M	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	27	61	M	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	28	61	F	HPT	PRL	GA	BC	MEN1 Tu
	non carriers	29-116							-
2	375del21	117	18	F	HPT	-	INS	-	Proband 2
	Carrier	118	29	F	HPT	PRL	GA	-	MEN1 Tu
	Carrier	119	54	M	HPT	-	GA	-	MEN1 Tu
	non carriers	120-22							-
3	1147F	123	51	F	HPT	PRL	GA	-	Proband 3
	Carrier	124	18	F	HPT	PRL	NF-Ad	-	MEN1 Tu
	Carrier	125	23	M	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	Carrier	126	30	F	HPT	NF-Ad	NF-Ad	-	MEN1 Tu
	Carrier	127	52	M	HPT	NF-Ad	NF-Ad	-	MEN1 Tu
	Carrier	128	55	F	HPT	-	NF-Ad	-	MEN1 Tu
	non carriers	129-32							-
4	360del4	133	55	F	HPT	PRL	INS	-	Proband 4
	Carrier	134	18	F	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	non carrier	135	47	M	HPT	-	-	-	phenocopy
	non carriers	136-39							-
5	360del4	140	55	M	HPT	NF-Ad	-	-	Proband 5
	Carrier	141	30	F	HPT	-	-	-	MEN1 Tu
	non carriers	142-44							-
6	1059del1	145	30	F	HPT	-	INS	-	Proband 6
	Carrier	146	32	F	HPT	PRL	INS	-	MEN1 Tu
	Carrier	147	58	M	HPT	PRL	GA	-	MEN1 Tu
7**	1243del1	148	51	F	HPT	PRL	GA, INS	-	Proband 7
8**	L413R	149	39	F	HPT	PRL	INS	-	Proband 8
9**	L413R	150	45	M	HPT	-	INS	-	Proband 9
10**	L414P	151	28	M	HPT	PRL	-	-	Proband 10
11**	R415X	152	42	M	HPT	PRL	GA	-	Proband 11
12**	W471C	153	74	F	HPT	-	GA	-	Proband 12
13**	R527X	154	20	F	HPT	PRL	-	-	Proband 13
14**	IVS3+1	155	29	F	HPT	PRL	GA	-	Proband 14

M, male; F, female; *, age at diagnosis (years); HPT, hyperparathyroidism; PRL, prolactinoma; GA, gastrinoma; INS, insulinoma; NF-Ad, non-functional adenoma; GC, gastric carcinoid; BC, bronchial carcinoid; Tu, tumor; -,

absence; **, samples of relatives were not available for genetic testing. Cases were considered asymptomatic when no biochemical or image MEN1-related features were found. Phenocopy is referred to an at risk individual who present MEN1-related symptoms but did not inherit the *MEN1* mutated allele (26).

A)

	Codon 147	Codon 413/414	Codon 471
human	... LFSF ITGTK ...	... FAHLLRFY ...	... EEPWGEE ...
mouse	... LFSF ITGTK ...	... FAHLLRFY ...	... EEPWGDE ...
rat	... LFSF ITGTK ...	... FAHLLRFY ...	... EEPWGDE ...
fish	... LFSL ITGTK ...	... FAHLLRFY ...	... DDQSSED ...
amphibian	... LFSFVTGTK ...	... FANLLRFY ...	... - - - - DD ...
drosophila	... LYSYLSGNK ...	... FANLLRFY ...	... - - - - LE ...

B)

FAMILY	MUTATION	AMINO ACID BIOCHEMICAL CHANGE
3	I147F	hydrophobic to aromatic
8,9	L413R	hydrophobic to positively charged
10	L414P	aliphatic to non-aliphatic
12	W471C	positively charged to polar noncharged

Figure 1: A – Menin alignment was performed to analyze evolutionary conservation and predict functional relevance of amino acids 147, 413, 414 and 471 (shaded) in which missense mutations were identified in probands 3, 8-9, 10 and 12, respectively. All amino acids were found to be conserved at these four sites in human, rat and mouse menin sequences; amino acid 147 also is conserved in fish and amino acids 413 and 414 are conserved in all species analyzed. Amino acid 471 was absent in sequences of amphibian and drosophila. B – The I147F, L413R, L414P and W471C missense mutations changed amino acids with different biochemical characteristics at evolutionary conserved regions and thus are likely to be the biological basis of the MEN1 disease in these families.

APENDICE 2

Artigo 2 - Enviado para Revista *Clinics* (aceito para publicação).

Clinical and Genetic Screenings of Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1) at Hospital das Clínicas, São Paulo.

Delmar Muniz Lourenco-Jr, Rodrigo Almeida Toledo, Flavia L. Coutinho e
Sergio P. A. Toledo.

Unitermos: Neoplasia Endócrina Múltipla, NEM1, gene *MEN1*, rastreamento, diagnóstico gênico.

Keywords: Multiple Endocrine Neoplasia, MEN1, *MEN1* gene, screening, genetic diagnosis.

Financiamento: FAPESP, CNPq, FFM.

RESUMO

Objetivos: Realizar rastreamentos clínico e gênico para Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (NEM1) e analisar seu impacto no seguimento clínico desses pacientes no Hospital das Clínicas, SP.

Métodos: O diagnóstico clínico de NEM1 foi realizado de acordo com o Consenso. A análise genética para identificação de mutações foi realizada por seqüenciamento automático de todas as regiões codificadoras e fronteiras exon/intron do gene *MEN1*. Os casos afetados foram sub-divididos em 3 grupos e analisados separadamente: casos-índices (grupo I), familiares diagnosticados clinicamente (grupo II) e genicamente (grupo III).

Resultados: Um total de 154 casos participou desse estudo, sendo 52 diagnosticados com NEM1: 13 do grupo I, 28 do grupo II e 11 do grupo III. A idade média ao diagnóstico no grupo III (27 anos) foi significativamente menor que a dos grupos II (39,5 anos; $p = 0,03$) e III (42,4 anos; $p = 0,01$). A maioria dos pacientes dos grupos I e II apresentou 2 ou 3 tumores, enquanto que 81,8% dos casos do grupo III apresentavam 1 ou nenhum tumor relacionado à NEM1. Além disto, 45,4% dos casos do grupo III eram assintomáticos, não sendo observados nenhuma metástase ou óbito. Os demais 102 familiares sob-risco estudados não herdaram mutação *MEN1* e foram excluídos do rastreamento clínico. Um caso de fenocópia NEM1 foi também localizado.

Discussão: Nossos dados demonstraram importantes benefícios no seguimento dos pacientes NEM1, obtidos pela implementação dos rastreamentos clínico e gênico para essa doença.

ABSTRACT

Purpose: To perform clinical and genetic screening of Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1) in patients at Hospital das Clínicas, SP, and analyze its impact on clinical management of MEN1 cases.

Methods: The clinical diagnosis of MEN1 was made in accordance with the Consensus. Mutation analysis of the entire *MEN1* tumor suppressor gene and genetic screening of at risk family members were performed by direct sequencing. To analyze the implementation of genetic diagnosis, the studied patients were separated in three groups: MEN1 index-cases (group I), MEN1 clinically diagnosed cases (group II) and genetically diagnosed cases (group III).

Results: In total, 154 individuals were clinically and genetically studied. We identified 12 different *MEN1* mutations. Fifty-two MEN1 cases were identified: 13 in group I, 28 in group II and 11 in group III. Mean age in group I (27 yr) was significantly lower than in groups II (39.5 yr) and III (42.4 yr; $p=0.03$ and $p=0.01$, respectively). Patients in groups I-II mostly presented two or three MEN1 tumors, while 81.8% in group III presented one or no one MEN1-related tumor. Further, in group III 45.4% of cases were asymptomatic and no metastasis or death were verified. One hundred and two non mutation carriers were excluded of MEN1 surveillance, including one MEN1 phenocopy.

Discussion: Our data underlined the benefits of a clinical and genetic MEN1 screening on the management of this disease.

INTRODUCTION

Clinical Aspects of MEN1 syndrome

Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1; OMIM 131100) is an autosomal dominant inherited tumor syndrome mainly characterized by parathyroid, endocrine pancreas and pituitary tumors^{1,2}. According to the Consensus on MEN1, the diagnosis of this condition is based on the concomitant occurrence in a patient of at least two of these three major MEN1-related tumors¹.

Hyperparathyroidism in MEN1

Primary hyperparathyroidism (HPT) is the most common clinical feature in MEN1 and it occurs in 73-100% of cases (Table 1). HPT is usually (80%) the first clinical manifestation of MEN1³. HPT due to MEN1 (HPT/MEN1) differs from primary sporadic HPT (sHPT) in several aspects, as it presents, a) multiglandular parathyroid hyperplasia or adenoma; b) age-onset occurring two decades earlier than sHPT (20 vs. 40 y-old); c) sex ratio of 1:1 in contrast to the 1:3 seen in sHPT; and d) higher recurrence rates of HPT after parathyroidectomy^{4,5}. Although HPT/MEN1 tends to be less aggressive than sHPT, usually presenting parathyroid hormone (PTH) ranging from 2-3 times over the upper normal limits and moderately high calcium levels⁶, “moans, groans and stones” and advanced kidney disease may occur in advanced stages of this disease⁵. In late diagnosed cases, renal dialysis and kidney transplantation may be necessary.

Surgical management in HPT/MEN1 includes near-total or total parathyroidectomy followed by autograph to the forearm, clearly differing from the adenomectomy recommended to sHPT. Further, in MEN1 cases, preventive thymectomy is recommended in association with parathyroidectomy in order to prevent thymic carcinoids^{1,7-10}. These facts underline the importance of performing the diagnosis of MEN1 to a better management of HPT in these patients⁷⁻¹⁰.

The penetrance of HPT in MEN1 in several series has been reported as high as 95% at 50 years of age, so it has been understood as the main clinical feature for the diagnosis of MEN1. Thus, screening for other MEN1-related diseases was considered less necessary for the MEN1 recognition. Screening for HPT in MEN1 was usually performed only until 50 year of age. However, recent series have shown lower prevalences (50-70%) of HPT as the first clinical characteristics in MEN1 and lower HPT penetrance (70%) than previously reported. These findings indicated that HPT surveillance should be performed for longer periods^{11,12}.

Endopancreatic tumors in MEN1

Pancreatic endocrine tumors (PETs) occur in up to 30-80% of patients with MEN1^{3,13,14}. Gastrinoma in MEN1 is the most prevalent PET seen in 30-75% of MEN1 cases and it is frequently multifocal, in contrast to unifocal sporadic gastrinomas⁵. Further, up to 25% of all gastrinomas are related to MEN1^{1,15}. Surgical procedures in gastrinoma associated with MEN1 are usually more extensive than those applied to its sporadic counterpart. Near-total or total pancreatectomy are recommended in MEN1, whereas partial pancreatectomy is usually performed in sporadic tumors^{16,17}. Thus, the pre-surgical MEN1 diagnosis offers to the surgeon important information for a better approach to PETs in MEN1 cases.

A similar statement was also applied to insulinoma associated to MEN1, which is the second more prevalent PET in MEN1 (10-30%). Partial pancreatectomy is usually the most common surgical approach to sporadic insulinomas, whereas subtotal or even total pancreatectomy are recommended to cases with insulinoma due to MEN1^{1,5}.

Pituitary tumors in MEN1

Pituitary adenomas have been documented in up to 40% of MEN1 patients reported in extended series¹⁸⁻²⁰. However, lower prevalences (18-23%) have been also documented by others^{21,22}. In 17% of MEN1 cases, a pituitary adenoma may be the initial lesion¹⁸. Interestingly, age at the

diagnosis is similar (~37 yrs) in MEN1, familial isolated pituitary adenomas and sporadic pituitary tumors^{18,23}. Pituitary adenomas in MEN1 are usually more aggressive and larger than in its sporadic counterpart. Thus, up to 85% of pituitary tumors associated with MEN1 are macroadenomas (32% invasive), in contrast to 42% in non-MEN1 cases¹⁸.

Prolactinoma is the most frequent pituitary disease in MEN1 and represents 62-76% of MEN1 cases with pituitary disease, although non-secreting pituitary adenomas are also frequent (14-24%)^{18,21}. Co-secreting, GH- and ACTH-secreting pituitary tumors are less frequent (10%, 9% and 4%, respectively)¹⁸, whereas FSH and TSH-secreting tumors are both very rare in MEN1²⁴.

In addition to the MEN1 major features mentioned above, up to 20 other endocrine and non-endocrine tumors have been described in association with MEN1 (Table 1, ¹³). Due to its extended and widely variable phenotype, MEN1 is presently considered a complex, multi-systemic disorder and its clinical diagnosis may turn to be a difficult task¹³.

Carcinoid tumors and gastrinoma are the major causes of death in MEN1 patients^{25,26}. More than 90% of MEN1-associated carcinoids, usually affecting bronchii and thymus, are malignant²⁵⁻²⁷, however these tumors are relatively rare. On the other hand, although gastrinomas are usually less malignant (60%) than carcinoids²⁸, it can be detected in up to 75% of MEN1 cases depending on series (Table 1). Malignancies are responsible for significant lowering ages of death verified in MEN1 (55.4 yrs for men and 46.8 yrs for women), as compared to life expectation in the general population (> 70 yrs)²⁹.

There is no preventive surgery approach proven to significantly improve the outcome of MEN1¹. However, it is accepted that the earlier the identification of MEN1 neoplasias the better the clinical management of this disease^{30,31}. As recommended by MEN Consensus, the suggested approach for MEN1 patients is based on periodical surveillance of MEN1-related neoplasias that should begin as early as 5-20 years of age¹. The MEN1-neoplasia surveillance is a time-consuming, laborious, cost-expensive and

lifelong procedure that includes clinical, biochemical and imaging investigations. However, it has been proven to be efficient in the identification of MEN1 tumors and in the reduction of morbidity³⁰ and mortality of MEN1 patients^{25,26,31}.

Therefore, the establishment of a structured and long-term follow up program aiming the screening of MEN1 would be a worthwhile effort²⁹.

Genetic Aspects of MEN1

Familial MEN1 is an autosomal dominantly inherited disease presenting almost complete penetrance¹³. The gene responsible for MEN1 (*MEN1*) was identified at 11q13 by two different research groups, one from NIH³² and another from the European *Consortium*³³. Since genetic screening of *MEN1* became available, more than 400 germline and somatic mutations have been identified in this gene¹³ (HUMAN GENOME MUTATION DATABASE). Most of *MEN1* mutations are inactivating, nonsense or frameshift variants. Although splicing mutations represent only 5% of the overall mutations identified in *MEN1* gene³⁴, some of these disease-causing variants can be frequently found³⁵. Furthermore, several missense *MEN1* mutations were identified, mostly occurring in evolutionary conserved sites, predicted to be related with retained relevant functions (Toledo RA 2006, data not shown).

No hotspots were found in *MEN1* gene, however patients from different genetic backgrounds have shown recurrent mutations in GC-rich regions which are prone to slippage, suggesting mutational “warm-spots” areas in *MEN1* gene^{26,33}. To date, no relevant genotype-phenotype correlation was reported³². Also, inter-familial and intra-familial phenotype variability has been reported^{32,33}. Thus, MEN1 relatives who harbor the same disease-causing mutation may present different clinical pictures³⁶.

It was reported that the false negative rates in genetic testing in the familial MEN1 syndrome may be as high as 30% of cases¹³. Technical limitations or the presence of mutations in the gene promoter region (which is not usually accessed in genetic screenings) may explain the finding of genetically negative MEN1 cases¹³. Such a *MEN1*-mutation profile makes

laborious its routine genetic investigation. At present, genetic screening for *MEN1* abnormalities is mostly available in developed countries.

MEN1 gene codifies for a 610-amino acid protein named menin³⁷. Several menin's tumor suppressor roles were so far disclosed as, a) cell cycle and cell growth control, b) transcription regulation, c) DNA repair, d) genome stability, e) apoptosis regulation and f) endocrine cell proliferation (revised in ^{37,38}). *MEN1* germline mutation predisposes to a second mutational event in *MEN1*-associated glands, causing loss of heterizogosity (LOH) of 11q13 locus. The inactivation of menin is predicted to disrupt its tumor suppressor molecular pathways thus leading to *MEN1* tumorigenesis³⁷. These findings are consistent with the Knudson's two-hit hypothesis for tumor suppressor genes³⁹.

State of art of *MEN1* in Brazil – Hospital das Clínicas, FM-USP

To date, little information is known about the clinical and genetic profile of *MEN1* patients in Brazil. As occurs in other syndromes, such as sporadic HPT, to which specific screening programs are not performed in Brazil⁴⁰, it is likely that most *MEN1* patients present as symptomatic, late diagnosed cases. To our knowledge, no public hospital in Brazil is routinely offering genetic testing for *MEN1* gene.

During the last 10 years, patients with *MEN1* (and also *MEN2*) have been followed at the Disciplina de Endocrinologia of the Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-FMUSP) at no charge, through the Brazilian National System of Health (*Sistema Único de Saúde, SUS*). Our Unit has developed expertise in diagnosis, management and treatment of *MEN1*, and it became one of the reference centers for this disease in Brazil⁴¹⁻⁴⁶.

In this study, we reported the results of clinical and genetic screenings of *MEN1*. We also evaluated the impact of *MEN1* genetic screening on the diagnosis and management of *MEN1* patients, before and after its implementation. As far as we know, this is the first systematic screening for *MEN1* disease performed in South America.

CASUISTIC AND METHODS:

This study has been approved by local ethics committee. Written informed consent was obtained from all cases submitted to genetic testing.

Briefly, the clinical screening of MEN1 patients at Hospital das Clínicas started in 1997 and presented the three following phases. *Phase 1* consisted in the systematic clinical identification of MEN1 patients at this Institution. In *phase 2*, MEN1 genealogies were expanded and the clinical screening was performed. In *phase 3*, the genetic testing for *MEN1* was routinely incorporated to the clinical practice in our Unit.

Phase 1 – Identification of patients with MEN1

Thirteen MEN1 index-cases were diagnosed at phase 1 of the study. The criteria for the diagnosis of MEN1 was the presence of at least two MEN1-related tumors in the index-cases¹. Hyperparathyroidism (HPT) was identified based on the presence of hypercalcemia associated with inappropriately elevated/borderline PTH serum levels. Prolactinoma was recognized by consistently high serum prolactin concentrations, menstrual irregularities and / or hypogonadism associated with pituitary adenoma shown by MRI. Insulinoma was verified by clinical signs and symptoms of hypoglycemia associated with abnormal insulin/glucose ratios. Gastrinoma was documented by the presence of repetitive gastro-duodenal ulcers, gastric acid hypersecretion, hypergastrinemia and endoscopic ultrasound findings. Somatotropinoma was searched through measurements of GH and IGF1; pituitary MRI was also performed. Cushing syndrome was investigated by clinical findings, ACTH/cortisol measurements and image studies. Other rare involvements such as carcinoid tumors were also actively searched using standard clinical, biochemical and image procedures.

Phase 2 – Clinical screening of MEN1 at risk relatives

Twenty eight MEN1 patients were diagnosed during the phase 2 of the study. Familial MEN1 was defined when at least one MEN1-related tumor was found in a first-degree relative. At risk family members were invited to come to the hospital for exams. Clinical screening for MEN1-related neoplasias was performed, as recommended by the MEN Consensus¹³. Annual biochemical exams and a tri-annual imaging investigation were performed. Those who presented biochemical or/and imaging abnormalities consistent with MEN1, and had complaints related to MEN1 symptoms, were diagnosed as affected. Relatives who had MEN1-related features at screening, but no clinical symptoms, were considered asymptomatic MEN1 cases. Relatives with no complaint and normal biochemical and imaging results were considered “not conclusive” and were invited to participate in the annual clinical screening.

Phase 3 – *MEN1* genetic analysis

The optimization and standardization of genetic protocols for *MEN1* mutation analysis were established in 2004. Laboratory procedures included, a) genomic DNA extraction from peripheral blood and oral swabs; b) PCR amplification of the entire *MEN1* coding region (exons 2-10) and also exon / intron boundaries; c) automated DNA sequencing, and d) *MEN1* mutation analysis.

Eleven MEN1 cases were disclosed during this period. These patients decided to undergo clinical screening only after knowing that they were *MEN1* mutation-positive cases.

After the identification of the disease-causing *MEN1* mutation in the index-case, DNA samples from relatives who participated of the clinical screening (phase 2) were analyzed. First degree relatives who did not

participate of phase 2 were contacted and invited to come to Hospital and adhere to the screening. To family members living far from São Paulo and arguing no conditions to travel, oral swabs were sent by mail. Further, during the period of the project, several local visits were made by a physician and a social assistant of our group. They visited MEN1 at risk relatives who were interested in participating but to whom previous procedures were not applicable. This last approach was also used to families with extended genealogies living in a small geographic area. A total of 154 samples, 13 from MEN1 index-cases and 141 from at risk MEN1 family members were available for investigation.

Clinical follow up and genetic counseling were offered to *MEN1* mutation-positive individuals. Further, genetic testing was also offered to their descents. Individuals who did not inherit the mutant allele were excluded from MEN1 clinical screening protocol and they were informed that their descents would not inherit the familial predisposition to MEN1-related tumors.

Statistics

ANOVA, Kruskal Wallis and Mann-Whitney tests were used when applicable.

RESULTS

Clinical Results

Thirteen MEN1 unrelated index-cases were clinically diagnosed. All index-cases reported familial history for MEN1.

MEN1 patients

Thirteen MEN1 families involving 52 affected MEN1 cases have been followed up during a 10-year period. The prevalences of HPT, pancreatic endocrine tumors (PETs) and pituitary tumors in these 52 MEN1 patients were 94.2% (49/52), 63.5% (33/52), and 51.9% (27/52), respectively. Symptomatic (77.5%) and asymptomatic (22.5%) HPT / MEN1 cases were diagnosed. Within cases with PET, gastrinomas were the most common disease (18/33; 54.5%) and 39% (7/18) of them were malignant, as documented by pathologic findings. Insulinomas (8/33; 24.2%) and non-secretory tumors (7/33; 21.2%) were also represented within PET cases. Further, prolactinomas were the most frequent pituitary tumor (18/27; 66.7%), whereas non-secretory pituitary adenomas (8/27; 29.6%) and acromegaly (1/27; 3.7%) were also present (Table 2).

MEN1 patient's groups

Data from groups I (13 MEN1 index cases), II (28 MEN1 cases diagnosed at the clinical screening) and III (11 MEN1 cases disclosed during the genetic screening) were analyzed. Mean ages at the diagnosis (clinical or genetic) in groups I (39.5 ± 15.7 SD y-old) and II (42.4 ± 15.0 y-old) did not significantly differ ($p > 0.05$). However, when both data were compared with group III (27.0 ± 14.0 y-old), significant differences were noticed ($p = 0.03$; $p = 0.01$, respectively). The occurrence of two major secreting MEN1-related

tumors in a single patient tended to be more prevalent in groups I and II, (7/13; 53.8% and 9/28; 32.2%, respectively) than in group III (1/11; 9.1%; $p=0.06$). Also, three coexisting MEN1-related tumors in a same patient although more frequently seen in groups I and II (5/13; 38.5% and 6/28; 21.4%) than in group III (1/11, 9.1%) no significant differences were noticed ($p=0.22$). One isolated MEN1-related tumor has occurred equally in groups II and III (13/28; 46.4% and 8/11; 72.7%, respectively), but it was absent in group I. Finally, the coexistence of symptomatic and/or functioning MEN1 tumors in a single patient was significantly different within the three groups ($p=0.001$).

Malignancy and Mortality

Malignancies in MEN1-related tumors were documented by the pathologic findings in 8 cases (data not shown) and / or by the presence of either local or at distance metastases in all of them. Malignant tumors were equally represented in groups I (3/13, 23.1%) and II (5/28, 17.9%). Metastases have been originated from gastrinomas (6/8, 75%) or carcinoid tumors (2/8, 25%). No case of group III exhibited malignant MEN1-related tumor.

All four patients with carcinoid tumors were asymptomatic. The first case had a gastric carcinoid which was identified and removed by endoscopy. The second had a bronchial carcinoid presenting local lymph node metastasis and was operated on. The third patient presented with an atypical, multiple metastatic pulmonary carcinoid and the fourth had a pulmonary carcinoid tumor but he refused any kind of treatment.

In a 10-year period (1997-2006), mortality related to MEN1 disease in our 52 cases has occurred in four patients: 2 out of the 13 cases of group I (15.4%) and 2 out of the 28 patients of group II (7.1%). Three of them died due to metastatic gastrinoma and the latter to secondary complications of a non-secretory pituitary macroadenoma. No death in group I has occurred.

MEN1-related tumor prevalence

HPT was diagnosed in all cases from groups I and II (100%) and in 8 cases (72.7%) of group III. Asymptomatic HPT cases were present in groups I (7.7%) and II (21.4%) but it has prevailed in group III (50%). Conversely, symptomatic HPT cases (nephrolithiasis) were seen mostly in patients of groups I and II (87.8%) and were less represented in group III (50%).

The prevalence of pancreatic endocrine tumors (PETs) in groups I-II (76.9% and 67.9%, respectively) were higher than in group III (27.3%). Within PET cases, gastrinoma was mostly present in groups I (60%) and II (57.9%) and less observed in group III (33%). Most insulinomas were documented in groups I (50%) and II (15.8%) and were absent in group III. Conversely, non-secretory PETs were only seen in groups III (67%) and II (26.3%).

Further, in our MEN1 cases pituitary adenomas were mostly diagnosed in group I (69.2%) and equally represented in groups II (46.4%) and III (45.5%). In all three groups of MEN1 patients, prolactinoma was highly prevalent (77.9%, 61.6%, 60%, respectively), followed by non-secretory adenomas (22.2%, 38.5%, 20%, respectively).

Taking into account patients from all three groups, most MEN1 cases (73.1%) have been recognized after the diagnosis of symptomatic HPT, as this condition was highly prevalent in all groups (92.3%, 78.6%, 50%, respectively). Moreover, symptomatic PET cases were significantly more frequent in groups I and II (50%: 76.9%) than in group III (9%; $p<0.05$). Further, symptomatic pituitary tumors were documented in all three groups (61.5%, 28.6%, 36.4%, respectively).

In summary, the annual clinical screening for MEN1 here reported allowed us to diagnose 29 undisclosed MEN1-related tumors, such as: 11 cases with asymptomatic HPT; 7 cases with non-secretory pancreatic endocrine tumors, 7 cases with pituitary tumors, as well as 4 patients harboring malignant, asymptomatic carcinoid tumors.

Further, after performing the genetic screening 11 *MEN1* mutation carriers were identified and included in the annual clinical follow up.

GENETIC RESULTS

Optimization and standardization of genetic protocols for *MEN1*

DNA extraction

After obtaining written informed consent, 10 mL of peripheral blood were collected (in two EDTA-containing tubes) from the 13 *MEN1* probands. Genomic DNA was extracted according to standard salting-out protocol or GFX Genomic Blood DNA Kit (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA). DNA from oral swab samples was obtained using Chelex method.

***MEN1* mutation analysis - Optimized protocol**

To perform the PCR amplification of the entire coding region (exons 2-10) and intron / exon boundaries of *MEN1*, we used specific primers as previously reported^{32,47}. To optimize PCR conditions, we used cycling temperatures and MgCl₂ gradient assays in a MJ PTC-200 thermocycling apparatus (MJ Research). Best results were obtained using 200 ng of genomic DNA, 1X reaction buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM of each dNTP, 0.5 pmol of each primer and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo) in a total volume of 30 µL. PCR thermocycling conditions were optimized as follows: 3 min at 94° C, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 45 s at 65-60 °C touch down annealing temperature program (minus 1 °C per cycle until 60 °C) and 1 min at 72 °C, followed by 10 min of final extension at 72 °C. PCR products were confirmed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and purified using a Concert Rapid PCR Purification System kit (Life Technologies, Bethesda, MD).

Sequencing reactions were directly performed from purified PCR products using internal primers for both strands and Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequencing was carried on an automated sequencer (ABI Prism 310 DNA Analyzer, Applied Biosystems, Foster City), according to the manufacturer's recommendations. The homology of generated sequences was obtained using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Two sequencing editor softwares (Gene Studio™ Professional Edition, Suwanee; and Mutation Surveyor, Softgenetics, PA, USA) were used to identify DNA abnormalities.

***MEN1* mutations in *MEN1* patients from HC - FMUSP**

The following disease-causing mutations were found through *MEN1* mutation analysis: 308del1 (exon 2) in proband 1; 375del21 (exon 2) in proband 2; I147F (exon 2) in case 3, 360del4 (exon 2) in probands 4 and 5; 1059del1 (exon 7) in case 6; proband 7 harbored the 1243del1 (exon 8); proband 8 had 1348T>G (exon 9); proband 9 had 1351T>C (exon 9); proband 10 had 1353C>T (exon 9); proband 11 had 1523G>T (exon 10); proband 12 had 1689C>T (exon 10); and proband 13 had IVS3+1 G>T (exon 2) (Figure 1). All mutations were confirmed using a second DNA sample from an independently collected blood sample.

No mutation hot-spot was found. *MEN1* mutations were found at exons 2, 7, 8, 9 and 10; also one splicing mutation was identified at intron 3. All identified *MEN1* mutations were predicted to cause disruption of menin's transcriptional regulation or menin's protein interactions and thus lead to *MEN1*-tumorigenesis (Toledo RA 2006, data not shown).

Also, we performed genetic testing of 141 *MEN1* at risk relatives. Thirty nine relatives were identified as mutation carriers: 28 have been previously submitted to of clinical exams (symptomatic cases), and 11 did not participate of the previous clinical screening (phase II). All these 11 *MEN1* positive-mutation relatives agreed to adhere to the clinical screening. One hundred and one (101/102, 99%) *MEN1* negative-mutation relatives did not present *MEN1*-related complaints or symptoms, whilst one (1%) developed sporadic primary HPT (*MEN1* phenocopy).

DISCUSSION

Multiple Endocrine Neoplasia type 1 is an inherited disorder with high penetrance to parathyroid, endocrine pancreas and pituitary tumors^{1,2}. Several other benign and malignant, endocrine and non-endocrine tumors have also been described in MEN1 patients. However, to date, very few data are available on MEN1 patients from countries out of North America, Europe, Japan and Australia. In this study, we presented the results of clinical and genetic MEN1 screenings performed in Brazil for a 10-year period. Also, we document important changes in the clinical presentation of MEN1 patients after the implementation of the *MEN1* genetic diagnosis.

Clinical manifestations in our MEN1 series are in accordance with the literature (Table 2). Thus, HPT was the most frequent (94.2%) and usually the first manifestation (60%) of MEN1, as reported by Trump et al (1996). The prevalence of PETs in our 52 MEN1 cases was as high as 63.5% and in groups I (76.9%) and II (67.9%) it was higher than in group III (27.3%). The prevalence of pituitary adenomas in our MEN1 series (52%) was slightly higher than previously reported (20-40%, Table 2), however our sample is still relatively limited for further conclusions. Finally, carcinoid tumors were equally presented in our patients and data from the literature (Table 2).

In this study, we were able to implement *MEN1* mutation analysis to clinical practice. The genetic screening has successfully identified *MEN1* mutations in all 13 MEN1 index-cases (Figure 1). Moreover, all twelve different *MEN1* germline disease-causing mutations we identified are predicted to inactivate the tumor suppressor functions of menin and lead to MEN1 tumorigenesis. Although probands 4 and 5 had recurrent *MEN1* mutations, no hot-spot was found out and mutations were spread throughout the coding and non-coding regions of the gene. This finding confirmed the need of searching the entire *MEN1*'s coding region and also its introns, which makes *MEN1* genetic screening a laborious routine procedure. So far, genetic screenings for *MEN1* have been performed in developed countries, whereas no such a program was so far implemented in South America. Our data should be useful to improve management of the MEN1 syndrome in Brazil.

The familial genetic screening has included 141 *MEN1* at risk family members and has defined who should undergo annual clinical surveillance of *MEN1*-related tumors and those who should be ruled out from the clinical screening. Both positive and negative genetic results were worthwhile and highly informative in the management of *MEN1* at risk individuals. The 39 at risk relatives who inherited the affected *MEN1* allele underwent complete surveillance of the *MEN1*-related tumors. Further, *MEN1* genetic testing ruled out 102 family members who did not harbor *MEN1* mutation (and had no susceptibility to develop *MEN1*-associated neoplasias) from unnecessary following-ups, avoiding unnecessary, expensive exams and lifelong surveillance.

Genetic testing was also important to confirm *MEN1* disease in previously diagnosed family members. Among such *MEN1* cases, we tested one relative presenting primary HPT, who did not harbor a germline *MEN1* mutation. According to *MEN1* clinical criteria, this patient should be diagnosed as *MEN1*-affected case. However, he was indeed a sporadic HPT case. Such rare cases are named *MEN1*-phenocopy and do not need further *MEN1* surveillance^{44,48,49}. In the other hand, *MEN1* genetic testing might disclose inherited cases within “sporadic” patients presenting either HPT at early ages (<30 y) or recurrent HPT. The latter cases should be genetic tested and if a germline mutation is detected, a total parathyroidectomy followed by autograph to the forearm should be performed, instead of adenomectomy¹.

It is largely accepted that the earlier the detection of neoplasias the better is its management, since symptomatic *MEN1* cases usually require more aggressive and risky surgeries and a higher number of exams (Table 4). Also, the chance of cure could be reduced in late diagnosed cases^{16,17,25}. Despite of that, the identification of *MEN1* mutations has been reported as having a limited influence in guiding early therapeutic surgery^{1,13}, however our data have shown a relevant impact of *MEN1* genetic screening in the management of at risk patients. Importantly, we noticed a shift towards milder clinical presentations in our 11 genetically diagnosed *MEN1* cases. These

patients (group III) presented different phenotypes from clinically diagnosed cases (groups I-II) as follows, a) they were significantly 11-15 years younger; b) they were usually asymptomatic cases; c) they mostly presented only one or no one *MEN1* tumor; d) they tended to present *MEN1* tumors at its early stages and e) they had no *MEN1* malignancies and no death were reported in these genetically diagnosed cases (Tables 2-3). Our present findings corroborated previous prospective study documenting that genetically diagnosed *MEN1* patients have biochemical evidences preceeding 10 years the signs and symptoms of the disease⁵⁰.

Therefore, the implementation of a genetic screening program for *MEN1* in a reference health center, as our hospital, would be an important step to improve the management of this complex disease in Brazil. This program is a new effort among many others in the study of cancer and cancer prevention in Brazil⁵¹⁻⁵⁶. Also, such program would save important amount of money spent in *MEN1* surveillance of *MEN1* mutation-negative cases.

In conclusion, we presented the first clinical and genetic *MEN1* screening trial performed in South America. Our study has shown that *MEN1* genetic testing greatly contributes to a more adequate clinical management of this complex syndrome, and may benefit patient care.

Legends:

Table 1: Prevalence (%) of clinical features in MEN1 disease *.

Table 2: Prevalence of major MEN1-related tumors in MEN1 index-cases (group I), MEN1 clinically-diagnosed cases (group II) and MEN1 genetically diagnosed cases (group III).

Table 3: MEN1 clinical manifestations in MEN1 index-cases (group I), MEN1 clinically-diagnosed cases (group II) and MEN1 genetically diagnosed cases (group III).

Table 4: Usual major MEN1 clinical manifestations at its early and late stages. Appropriate treatments for early and late diagnosed MEN1 cases are listed.

Figure 1: The coding region (exons 2-10) of the *MEN1* gene. *MEN1* mutations identified in 13 MEN1 index-cases are indicated. The mutation 360del4 was localized in two unrelated MEN1 patients.

Figure 2: MEN1 Screening program.

References:

- 1 - Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(12):5658-71.
- 2 - Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1. Endocrinol Metab Clin North Am. 2000;29(3):541-67.
- 3 - Trump D, Farren B, Wooding C, Pang JT, Besser GM, Buchanan KD, et al. Clinical studies of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). QJM. 1996;89(9):653-69.
- 4 - Bilezikian JP, Potts JT Jr, Fuleihan Gel-H, Kleerekoper M, Neer R, Peacock M, et al. Summary statement from a workshop on asymptomatic primary hyperparathyroidism: a perspective for the 21st century. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(12):5353-61.
- 5 - Metz DC, Jensen RT, Bale AE, Skarulis MC, Eastman RC, Nieman L, et al. In: The Parathyroids: Raven Press, New Your, 1994, p. 591-647
- 6 - Katai M, Sakurai A, Ikeo Y, Hashizume K. Primary hyperparathyroidism in patients with multiple endocrine neoplasia type 1: comparison with sporadic parathyroid adenomas. Horm Metab Res. 2001;33(8):499-503.
- 7 - Mallette LE. Management of hyperparathyroidism in the multiple endocrine neoplasia syndromes and other familial endocrinopathies. Endocrinol Metab Clin North Am. 1994;23(1):19-36.
- 8 - 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;134(10):1119-23.

- 9 - Thompson NW. The surgical management of hyperparathyroidism and endocrine disease of the pancreas in the multiple endocrine neoplasia type 1 patient. *J Intern Med.* 1995;238(3):269-80.
- 10 - Carling T, Udelsman R. Parathyroid surgery in familial hyperparathyroid disorders. *J Intern Med.* 2005;257(1):27-37.
- 11 - Glascock MJ, Carty SE. Multiple endocrine neoplasia type 1: fresh perspective on clinical features and penetrance. *Surg Oncol.* 2002;11(3):143-50.
- 12 - Burgess JR, Greenaway TM, Shepherd JJ. Expression of the MEN-1 gene in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1. *J Intern Med.* 1998;243(6):465-70.
- 13 - Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(5):367-75.
- 14 - Grama D, Skogseid B, Wilander E, Eriksson B, Martensson H, Cedermarck B, et al. Pancreatic tumors in multiple endocrine neoplasia type 1: clinical presentation and surgical treatment. *World J Surg.* 1992;16(4):611-8.
- 15 - Norton JA, Fraker DL, Alexander HR, Venzon DJ, Doppman JL, Serrano J, et al. Surgery to cure the Zollinger-Ellison syndrome. *N Engl J Med.* 1999;341(9):635-44.
- 16 - Akerstrom G, Hessman O, Skogseid B. Timing and extent of surgery in symptomatic and asymptomatic neuroendocrine tumors of the pancreas in MEN 1. *Langenbecks Arch Surg.* 2002;386(8):558-69.
- 17 - Akerstrom G, Hessman O, Hellman P, Skogseid B. Pancreatic tumours as part of the MEN-1 syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005;19(5):819-30.
- 18 - Verges B, Boureille F, Goudet P, Murat A, Beckers A, Sassolas G, et al. Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(2):457-65.
- 19 - 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.
- 20 - 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.

- 21 - 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;81(7):2642-6.
- 22 - Marx SJ, Vinik AI, Santen RJ, Floyd JC Jr, Mills JL, Green J 3rd. Multiple endocrine neoplasia type I: assessment of laboratory tests to screen for the gene in a large kindred. *Medicine (Baltimore).* 1986;65(4):226-41.
- 23 - Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ciccarelli A, Valdes-Socin H, Rohmer V, Tamburrano G, et al. Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(9):3316-23.
- 24 - Asteria C, Anagni M, Persani L, Beck-Peccoz P. Loss of heterozygosity of the MEN1 gene in a large series of TSH-secreting pituitary adenomas. *J Endocrinol Invest.* 2001;24(10):796-801.
- 25 - 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.
- 26 - Teh BT, Zedenius J, Kytola S, Skogseid B, Trotter J, Choplin H, et al. Thymic carcinoids in multiple endocrine neoplasia type 1. *Ann Surg.* 1998;228(1):99-105.
- 27 - Gibril F, Chen YJ, Schrupp 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.
- 28 - 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.
- 29 - Geerdink EA, Van der Luijt RB, Lips CJ. Do patients with multiple endocrine neoplasia syndrome type 1 benefit from periodical screening? *Eur J Endocrinol.* 2003;149(6):577-82.
- 30 - 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.
- 31 - 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.
- 32 - Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR, et al. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science.* 1997;276(5311):404-7.

- 33 - Lemmens I, Van de Ven WJ, Kas K, Zhang CX, Giraud S, Wautot V, et al. Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. Hum Mol Genet. 1997;6(7):1177-83.
- 34 - Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. Human Mutation. 2003; 21:577-581.
- 35 - Turner JJ, Leotlela PD, Pannett AA, Forbes SA, Bassett JH, Harding B, et al. Frequent occurrence of an intron 4 mutation in multiple endocrine neoplasia type 1. J Clin Endocrinol and Metab. 2002;87:2688-2693.
- 36 - 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. Arq Bras Endocrinol Metab. 2006;(50):S639.
- 37 - Agarwal SK, Kennedy PA, Scacheri PC, Novotny EA, Hickman AB, Cerrato A, et al. Menin molecular interactions: insights into normal functions and tumorigenesis. Horm Metab Res. 2005;37(6):369-74.
- 38 - Balogh K, Racz K, Patocs A, Hunyady L. Menin and its interacting proteins: elucidation of menin function. Trends Endocrinol Metab. 2006;17(9):357-64.
- 39 - Pannett AA, Thakker RV. Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson "two-hit" hypothesis. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(9):4371-4.
- 39 - Pannett AA, Thakker RV. Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson "two-hit" hypothesis. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(9):4371-4.
- 40 - Ohe MN, Santos RO, Barros ER, Lage A, Kunii IS, Abrahao M, et al. Changes in clinical and laboratory findings at the time of diagnosis of primary hyperparathyroidism in a University Hospital in Sao Paulo from 1985 to 2002. Braz J Med Biol Res. 2005;38(9):1383-7.
- 41 - Jorge BH, Agarwal SK, Lando VS, Salvatori R, Barbero RR, Abelin N, et al. 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;86(2):542-4.
- 42 - Lourenço Jr, DM, Toledo SPA. Neuroendocrinologia Clínica e Cirúrgica. In: Liberman & Cukier. Neuroendocrinologia Clínica e Cirúrgica. São Paulo : Lemos Editora, 2002. p.577.

- 43 - Lourenço-Jr DM, Toledo SPA, Toledo RA. Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1. In: Tratado de Clínica Médica. São Paulo: Roca, 2006. p.3535.
- 44 - Toledo RA, Lourenco Jr DM, Coutinho FL, Cavalcanti MG, Quedas E, Silva MER, et al. A Importância do Diagnóstico Molecular na Identificação de Fenocópias em Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1. Arq Bras Endocrinol Metab 2006;(50):S619.
- 45 - 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). Arq Bras Endocrinol Metab. 2006;(50):S608.
- 46 - 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). Arq Bras Endocrinol Metab. 2006;(50):S497.
- 47 - Cote GJ, Lee JE, Evans DB, Huang E, Schultz PN, Dang GT, et al. Five novel mutations in the familial multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. Human Mutation. 1998;(12):219.
- 48 - Burgess JR, Nord B, David R, Greenaway TM, Parameswaran V, Larsson C, et al. Phenotype and phenocopy: the relationship between genotype and clinical phenotype in a single large family with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). Clin Endocrinol (Oxf). 2000;53(2):205-11.
- 49 - Hai N, Aoki N, Shimatsu A, Mori T, Kosugi S. Clinical features of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) phenocopy without germline MEN1 gene mutations: analysis of 20 Japanese sporadic cases with MEN1. Clin Endocrinol (Oxf). 2000;52(4):509-18.
- 51 - 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;61(1):59-70.
- 52 - Santos MA, Nunes AB, Abelin N, Ezabella MC, Toledo Rde A, Toledo SP. Genetic screening of multiple endocrine neoplasia type 2: Experience of the USP Endocrine Genetics Unit. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006;50(1):7-16.
- 53 - Stabenow E, Tavares MR, Ab'Saber AM, Parra-Cuentas ER, de Matos LL, Eher EM, et al. Angiogenesis as an indicator of metastatic potential in papillary thyroid carcinoma. Clinics. 2005;60(3):233-40.
- 54 - Durazzo MD, de Araujo CE, Brandao Neto Jde S, Potenza Ade S, Costa P, Takeda F, et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in

women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases. Clinics. 2005;60(4):293-8.

55 - Silva RV, Garicochea B, Cotti G, Maranhão IC, Cutait R. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer identification and surveillance of high-risk families. Clinics. 2005;60(3):251-6.

56 - Waisberg J, de Matos LL, Dos Santos HV, Dos Santos AB, Reis GC, Capelozzi VL. Pancreatic carcinoid: a rare cause of diarrheogenic syndrome. Clinics. 2006;61(2):175-8.