RODRIGO DE ALMEIDA TOLEDO

Análise do gene *AIP* na acromegalia familiar isolada

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Toledo, Rodrigo de Almeida

Análise do gene *AIP* na acromegalia familiar isolada / Rodrigo de Almeida
Toledo. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de: Endocrinologia.

Orientadora: Maria Candida Barisson Villares Fragoso.

Descritores: 1.Acromegalia/genética 2.Adenoma hipofisário secretor de hormônio
do crescimento 3.Neoplasia endócrina múltipla/genética 4.Genes supressores de tumor
5.Perda de heterozigossidade 6.AMP cíclico

USP/FM/DBD-123/10

Este projeto foi realizado no Laboratório da Unidade de Endocrinologia Genética (UEG - LIM/25) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP).

Apoio: Bolsa de Doutorado da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Dedico esta Tese aos meus pais, Sergio e Maria Anita, por todo o esforço realizado em prol da educação dos filhos em detrimento de regalias pessoais.

Ao meu pai, em especial, por ter sido um constante exemplo de seriedade e compromisso com a pesquisa científica e com o tratamento dos pacientes com síndromes hereditárias. Apresentou-me um universo profissional fantástico que hoje me move em direção a um propósito apaixonante.

À minha mãe, em especial, por ser uma pessoa maravilhosa e sensível que me ensinou sobre as nuances da vida e por ter me aproximado de Deus. Apresentou-me um universo humano (e cristão) que hoje formam minha base pessoal.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por tudo o que É e pelo que Ele representa para mim.

Quero agradecer à minha orientadora Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso por seu constante apoio, por ter acreditado neste projeto e por ter-me incentivado sempre. No início deste estudo não a conhecia bem, hoje possuo um grande respeito, admiração e carinho pela Dra. Maria Candida e espero que nossos projetos se fortaleçam e continuem crescendo no Pós-Doutorado que se aproxima.

Gostaria de agradecer de forma especial ao meu pai, Prof. Dr. Sergio Pereira de Almeida Toledo. Homem que como poucos soube trilhar um caminho próprio, sempre baseado no trabalho, esforço e no respeito ao próximo. Conseguiu recursos e fez o improvável, construiu e fundou o grupo e o laboratório do grupo da Genética da Endocrinologia da FM-USP (Unidade de Endocrinologia Genética, LIM-25); onde essa Tese foi desenvolvida, em colaboração direta com o LIM-42, chefiado pela Profa. Dra. Berenice B. Mendonça. Visualizador e arquiteto do Programa de rastreamento clínico e genético para as Neoplasias Endócrinas Múltiplas tipo 1 e tipo 2 do HC-FMUSP; programa este que atualmente possui abrangência nacional. Ao conhecer sua trajetória, se observa que soube aproveitar os bons momentos, mas que também enfrentou tempestades que “abalaram as forças”. Seguiu firme e forte, trabalhando em silêncio, seguindo seu norte e esperança. É um exemplo de um vencedor para mim. Tanto nos aspectos profissionais como pessoais. Não tenho palavras para descrever o orgulho e respeito que tenho por você. Fico feliz por ter feito parte das vitórias que conquistamos juntos e das que ainda conquistaremos. Obrigado por ter aberto as portas do laboratório para mim e confiado em meu trabalho.

Quero agradecer à Profa. Dra. Berenice Bilharinho Mendonça, Professora Titular da Disciplina de Endocrinologia da FM-USP. Já conheci pessoas que são “chefes” e pessoas que são “líderes”. Impressiona-me como a Sra. consegue ser as duas coisas ao mesmo tempo, com tanta capacidade e legitimidade. Obrigado por ter me encaminhado a família com acromegalia isolada que segue clinicamente. Sua paixão por trabalhos bem feitos e seu incentivo à produtividade serviu de grande impulso para o desenvolvimento desta Tese.

Ao médico assistente do HC-FMUSP, companheiro de pesquisa e meu amigo, Dr. Delmar Muniz Lourenço-Jr, pelo qual possuo grande respeito por sua conduta íntegra durante estes anos de convivência na UEG. Sua seriedade e persistência são marcas de sua personalidade que o move rumo aos seus objetivos; muitos já conquistados e outros tantos em andamento acelerado. Combina em si características do médico de família dedicado e do pesquisador de ponta em uma área tão complexa como a Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1. Nossa colaboração já vem de longa data, desde o meu Mestrado e sua participação nesta Tese de Doutorado foi fundamental para as vitórias que tivemos. Sem sua prontidão no estudo clínico dos pacientes, nosso sucesso teria sido menor. Conte sempre com minha colaboração para o estudo gênico de seus pacientes.

Presto aqui meus sinceros agradecimentos à Maria das Graças Cavalcanti, por ser o que é. Eu a conheço a mais de 10 anos e até hoje continua a me surpreender. Seu carinho e atenção com os pacientes é uma das coisas mais humanas e fantásticas que já vi. Tem cada um deles em sua mente e em seu coração. Foi um prazer e uma honra poder ter participado com ela das viagens que fizeram parte dos trabalhos de campo para Minas Gerais, Alagoas, Sergipe e Paraná. Saiba que não esquecerei jamais o que aprendi com você e com os pacientes em cada uma dessas viagens. Sempre me lembrarei de sua identificação com os pacientes e do amor que eles demonstram por você. Guardo em minha memória a lembrança de nós dois montando aquela “mula xucra” e de você coletando o

sangue da Dona Olindrina (paciente *RET* positivo) com uma mão só, pois ela tinha agarrado sua outra mão e não largou mais. Sem seu trabalho junto aos pacientes essa Tese teria perdido muito. *רבה תודה!*

Meus agradecimentos também são dirigidos à Profa. Dra. Patricia L. Dahia, pesquisadora que fez Doutorado na UEG e que trilhou uma carreira internacional fantástica. Considero-a minha “Tutora”, alguém a quem busco me espelhar. Obrigado pela oportunidade de nossas colaborações em *AIP* e *Feocromocitoma*.

Ao Prof. Dr. Marcello Delano Bronstein, por ter encaminhado um paciente analisado nesta Tese, por seu entusiasmo pelos estudos dos tumores hipofisários e por seus comentários pertinentes durante a qualificação.

À Profa. Dra. Margaret de Castro, Profa. Titular da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da USP – Riberão Preto, por ter encaminhado uma família com acromegalia isolada, incluída nesse projeto de Tese.

Ao Dr. Bernardo Liberman e Dr. Malebranche Berardo da Cunha-Neto pela constante colaboração na área clínica referente a esse projeto e aos projetos envolvendo NEM-1.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves e Dr. Iberê Cauduro Soares por terem colaborado com as análises de imunohistoquímica.

Às alunas da UEG, Viviane Longuini, Michelle Buscarilli, Elisangela Quedas, Flavia Coutinho, Tomoko Sekiya e Tatiana Denck, pela convivência e amizade nesses vários anos de UEG. Espero que possamos continuar crescendo juntos em nossa jornada científica e profissional.

À Beatriz Mariano pela amizade e pela convivência agradável.

Ao Madson Almeida Queiroz e Luciana Brito pelo auxílio nas análises de qPCR.

À Eliete Helena e Geni Mendonça por toda ajuda e apoio logístico que me deram. Obrigado pelo clima profissional, mas descontraído na secretaria.

Aos pacientes e seus familiares que concordaram em participar desse estudo e colaborando para ampliar nosso conhecimento científico. Fico satisfeito e orgulhoso que nossos projetos conseguiram por várias vezes mudar o curso das doenças malignas nas gerações mais novas com mutação genética, proporcionando menor morbidade a estes pacientes.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de pesquisa e à Disciplina de Endocrinologia da FM-USP e FFM (Fundação Faculdade de Medicina) pelo apoio financeiro às apresentações dos dados dessa Tese em âmbito internacional.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Introdução geral	2
1.1.1	Tumores como doenças genéticas	2
1.1.2	Tumorigênese	3
1.1.3	Genes supressores de tumor	3
1.1.4	Oncogenes e proto-oncogenes	5
1.1.5	Associação entre TSG e proto-oncogenes potencializam a tumorigênese	7
1.2	Introdução circunstanciada	8
1.2.1	Glândula hipófise	8
1.2.2	Tumores hipofisários	10
1.2.2.1	Acromegalia	11
1.2.2.2	Tumorigênese hipofisária e a genética dos tumores hipofisários	13
1.3	Tumores hipofisários familiares	15
1.3.1	Neoplasia endócrina múltipla tipo 1	17
1.3.2	Neoplasia endócrina múltipla tipo 1-símile (NEM4 ou NEM-1- <i>like</i>)	19
1.3.2.1	Mutações germinativas no gene <i>p27(Kip1)/CDKN1B</i>	20
1.3.2.2	Genes <i>CDKN2B/p15</i> , <i>CDKN2C/p18</i> e <i>CDKN1A/p21</i>	21
1.3.3	Complexo de Carney	22
1.3.4	Acromegalia familiar isolada	23
1.3.4.1	Aspectos clínicos	23
1.3.4.2	Aspectos genéticos	24
1.3.4.3	Mutações <i>AIP</i>	25

1.3.4.4	Análise do potencial de IHQ como ferramenta diagnóstica para guiar o rastreamento de mutações <i>AIP</i>	39
1.3.4.5	A proteína AIP (XAP2 / ARA9).....	39
1.3.4.6	Possível envolvimento de AIP na tumorigênese...	40
2	OBJETIVOS	43
3	PACIENTES	45
4	TUMORES.....	55
5	MÉTODOS.....	57
5.1	Extração de DNA	58
5.2	Rastreamento de mutações	58
5.3	Análises de microssatélites	59
5.4	Análises de possíveis moduladores genéticos de fenótipo	59
5.5	Análise de expressão gênica	63
5.6	Análise da expressão proteica	66
6	RESULTADOS	67
6.1	Análise de mutação <i>AIP</i> em famílias brasileiras com acromegalia isolada	68
6.2	Análise de fatores moduladores de fenótipo na família Acro-1, com acromegalia isolada, mutação no gene <i>AIP</i> e variabilidade fenotípica.....	78
7	DISCUSSÃO	84
7.1	Mutações <i>AIP</i> em famílias brasileiras com acromegalia isolada....	87
7.2	Moduladores de fenótipo em famílias com mutação <i>AIP</i>	88
7.3	Heterogeneidade genética em famílias FIPA.....	92
7.4	Análise somática em tumores de pacientes com mutação <i>AIP</i>	93

8	CONCLUSÕES	96
9	PERSPECTIVAS	98
10	REFERÊNCIAS	100

APÊNDICE

Publicações relacionadas ao doutorado

Apresentações orais relacionadas ao doutorado

Outras publicações, no período do doutorado

Pós-Doutorado

Artigo 1

Artigo 2

Artigo 3

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIP	Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein
AHR	Aryl hydrocarbon receptor
IFS	Isolated Familial Somatotropinoma
NEM-1	Neoplasia endócrina Múltipla tipo 1
CNC	Complexo de Carney
PAP	Pituitary adenoma predisposition
FIPA	Familial isolated pituitary adenoma
GH	Hormônio de crescimento
IGF1	Insuline growth factor 1
<i>MEN1</i>	Gene responsável pela NEM-1
<i>PRKAR1A</i>	Gene responsável pelo CNC
<i>GNAS1</i>	Gene que codifica a sub-unidade α da proteína Gs
LOH	Perda de heterozigose
AMPC	Segundo mensageiro AMP cíclico
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
XAP2	X-Protein Associated Protein 2
ARA9	Clone com a proteína AIP
<i>CDKN1B</i>	Gene que codifica a proteína p27^{Kip1}

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A ativação ou inativação de diversos genes da via de AMPc já foram associadas à tumorigênese endócrina.	42
Figura 2: Paciente-índice da família com acromegalia isolada Acro-1.....	48
Figura 3: Irmão afetado do caso-índice da família com acromegalia isolada, Acro-1.	49
Figura 4: Fotos seriadas do paciente III.15 da família Acro-1 representando a evolução insidiosa da doença e progressão gradual.	50
Figura 5: Aspectos radiológicos em paciente com acromegalia familiar isolada Acro-1.	51
Figura 6: Familiares das gerações I e II da família Acro-1 apresentando traços acromegálicos	51
Figura 7: Mutação germinativa Y268X localizada no éxon 6 do gene <i>AIP</i> de pacientes com acromegalia familiar isolada (família Acro-1).....	69
Figura 8: Genealogia da família Acro-1: aspectos clínicos e genéticos	70
Figura 9: Mutação R81X no éxon 2 do gene <i>AIP</i> identificada na família Acro-2..	72
Figura 10: Perda somática do alelo normal do gene <i>AIP</i> e baixa expressão da proteína AIP em macroadenoma hipofisário de paciente com acromegalia familiar e mutação <i>AIP</i> R81X (família Acro-2).....	74
Figura 11: Perda somática do alelo normal do gene <i>AIP</i> e baixa expressão gênica e proteica em carcinoma adrenocortical de paciente com acromegalia familiar e mutação <i>AIP</i> R81X (família Acro-2).....	75
Figura 12: Manutenção de heterozigose em linfoma de paciente com acromegalia familiar e mutação <i>AIP</i> R81X.....	76

Figura 13: Genealogia família Acro-3, sem mutação nos genes *AIP* e *p27Kip1*.....77

Figura 14: Análise dos genes *SSTR2* e *SSTR5* por seqüenciamento automático, em pacientes com acromegalia familiar isolada (família Acro-1).....79

Figura 15: Co-segregação de marcadores de microssatélites localizados em 2p16 com a progressão tumoral e o desenvolvimento da doença em pacientes com acromegalia familiar isolada (família Acro-1).82

Figura 16: Co-segregação de marcadores de microssatélites localizados em 2p16 com a progressão tumoral e o desenvolvimento da doença em outras famílias com acromegalia isolada (família Acro-1).....91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Síndromes hereditárias envolvendo tumores hipofisários	16
Tabela 2: Mutações <i>AIP</i> em pacientes com tumor hipofisário familiar isolado	27
Tabela 3: Mutações <i>AIP</i> em pacientes com tumor hipofisário esporádico ...	30
Tabela 4: Polimorfismos novos identificados no gene <i>AIP</i>	36
Tabela 5: Descrição clínica e genética das três famílias com acromegalia isolada	47
Tabela 6: <i>Primers</i> utilizados para análise de 11q13.3-LOH	60
Tabela 7: <i>Primers</i> utilizados para análise de moduladores de fenótipo	61
Tabela 8: <i>Primers</i> utilizados para análise do gene <i>AHR</i>	63
Tabela 9: Resultados da análise de moduladores de fenótipo na família Acro-1	83

RESUMO

Toledo RA. *Análise do gene AIP na acromegalia familiar isolada* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2010. 116p.

A acromegalia é doença insidiosa e desfigurante caracterizada por um crescimento desproporcional dos ossos das mãos, pés e do crânio devido à exposição crônica a altos níveis de hormônio de crescimento (GH) e de seu efector *insuline growth factor 1* (IGF-1). Trata-se de uma doença rara, com incidência estimada de 3-4 casos por milhão, com prevalência de aproximadamente 50 casos por milhão de pessoas. A principal causa da acromegalia é a presença de um tumor hipofisário secretor de GH (somatotropinoma). Caso o somatotropinoma ocorra durante a infância ou adolescência, antes do fechamento das epífises dos ossos longos, a criança crescerá longitudinalmente de forma descontrolada, caracterizando a forma clínica gigantismo. Na grande maioria dos casos a acromegalia se apresenta na forma esporádica, entretanto casos familiares da doença podem ocorrer associados à Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (NEM-1), ao complexo de Carney (CNC) e à acromegalia familiar isolada (IFS). Os genes responsáveis pela NEM-1 (*MEN1*) e CNC (*PRKAR1A*) foram clonados há mais 10 anos, entretanto etiologia molecular da IFS permaneceu desconhecida até recentemente. Vierimaa *et al.* (2006) combinaram estudos de ligação por análise de polimorfismos e estudos de expressão gênica e identificaram mutações no gene *AIP* em famílias com acromegalia não-NEM-1 e não-CNC; além de perda de heterozigose (LOH) nos somatotropinomas dos pacientes com mutação *AIP*. No presente estudo, investigamos o gene *AIP* em três famílias brasileiras com IFS e em seus tumores (hipofisários e não-hipofisários). Descrevemos uma nova mutação *AIP* (Y268X) em uma família brasileira com IFS, confirmando o papel desse novo gene na predisposição a tumores hipofisários. A partir de dados gerados em uma extensa revisão da literatura, sugerimos que os tumores hipofisários familiares isolados são doenças multi-gênicas que possuiriam um gene principal, mas que sofreriam influência de outros genes/*loci* ainda pouco caracterizados. Assim, investigamos também o envolvimento de diversos genes/*loci* candidatos (*SSTR2*, *SSTR5*, *CDKN1B*, *AHR*, *PRKAR1A*, *PTTG*, *PROP1*, *MEG3*, *RB1* e 2p16) como possíveis moduladores do fenótipo na IFS. Nossos dados sugerem que além da mutação *AIP*, há necessidade da co-segregação de marcadores localizados em regiões com potencial oncogênico para o desenvolvimento da doença hipofisária. Também apresentamos nesta Tese as primeiras análises de tumores não-hipofisários em pacientes com mutação *AIP* e encontramos evidências do possível envolvimento de *AIP* na tumorigênese de um carcinoma funcionante do córtex adrenal de paciente com IFS.

Descritores: 1.Acromegalia/genética 2.Adenoma hipofisário secretor de hormônio de crescimento 3.Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (NEM-1) 4.Genes supressores de tumor 5.Análise mutacional de DNA 6.AMP cíclico

SUMMARY

Toledo RA. *Analysis of the AIP gene in familial isolated acromegaly* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”, 2010. 116p.

Acromegaly is a rare disfiguring and insidious disease characterized by enlargement of hands, feet and skull bones due to excess of growth hormone (GH) secreted by a pituitary tumor (somatotropinoma). The majority of the cases with acromegaly is sporadic, however it may occur in association with inherited disorders as Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1), Carney complex (CNC) and Isolated Familial Somatotropinoma (IFS). The genes associated with MEN1 syndrome (*MEN1*) and CNC (*PRKAR1A*) have been described more than a decade ago, however until very recently the molecular etiology of IFS remained unknown. Using a combined strategy of single nucleotide polymorphism (SNP) analysis and gene expression analysis, Vierimaa *et al.* (2006) described mutations in the *AIP* gene occurring in families with acromegaly not associated with MEN1 and CNC. In the current study, we investigated three Brazilian families with IFS and were able to describe two germline mutations in the *AIP* gene, confirming the role of this new gene in the predisposition to familial somatotropinoma. We revised the literature of genetic studies of isolated pituitary adenoma syndromes, which indicated a genetic heterogeneity as well as possible multigenic inheritance for these diseases. Thus, we investigated the role of several genes/*loci* (*SSTR2*, *SSTR5*, *CDKN1B*, *AHR*, *PRKAR1A*, *PTTG*, *PROP1*, *MEG3*, *RB1* and 2p16) selected as potentially acting as phenotypic modulators in IFS. Our data indicate that *AIP*-mutated patients are prone to pituitary disease, however it is necessary the co-segregation of markers located at oncogenic regions to the development of the pituitary tumors and manifestation of the disease. Herein, we also present the first somatic analysis of non-pituitary tumors of *AIP*-mutated patients. A potential role of *AIP*, which is implicated in the cAMP pathway, could not be excluded in the development of an adrenocortical carcinoma.

Descriptors: 1. Acromegaly/genetics 2. Growth hormone-secreting pituitary adenoma 3. Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN-1) 4. Tumor suppressor genes 5. DNA mutational analysis 6. cyclic AMP

1 INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1.1 Tumores como doenças genéticas

As células do corpo humano têm suas funções controladas por diversas moléculas sinalizadoras, como proteínas, aminoácidos, pequenos peptídeos, derivados lipídicos e gases. O crescimento, diferenciação e morte celular programada são processos regulados por fatores estimuladores (de crescimento) e fatores inibitórios (sinais anti-proliferativos) que podem agir por meio de receptores trans-membranas ou diretamente no núcleo celular (Alberts, 2004).

Quando uma célula perde essa regulação ou deixa de responder a ele, passa a proliferar (de forma acelerada ou não) até formar acúmulos celulares, os tumores. Como esse descontrole ocorre devido a alterações genéticas, os tumores são considerados doenças genéticas. Apesar da taxa de mutação espontânea em mamíferos ser baixa (10^{-8}) (Bielas JH, 2006), é de se esperar que mutações genéticas sejam eventos freqüentes (e são) ao longo da vida de um indivíduo, uma vez que o corpo humano possui cerca de 10^{14} células e que cada célula possui um genoma com 6×10^9 (seis bilhões) de nucleotídeos (Hanahan D, 2000). Entretanto, a maior parte das mutações não causa elevação na capacidade

proliferativa, ou simplesmente não interfere com a taxa de crescimento celular (Greenman, 2007). Estas últimas mutações são chamadas de “mutações de passagem”. Apenas uma porção das mutações, que ocorre em genes específicos, é capaz de alterar o controle da regulação celular favorecendo sua proliferação neoplásica. As mutações com capacidades tumorigênicas são chamadas de “*drivers*” (Greenman, 2007).

1.1.2 Tumorigênese

Na última década, os estudos de análise de mutações em tumores contribuíram sobremaneira para o esclarecimento do processo da tumorigênese. Segundo dados do *The Wellcome Trust Sanger Institute*, dentre os ~25.000 genes do genoma humano, cerca de 300 foram associados ao desenvolvimento de tumores (Futreal, 2004). Esses genes são divididos em dois grupos principais de acordo com sua função: os genes supressores de tumor e os proto-oncogenes.

1.1.3 Genes supressores de tumor

Uma definição simples de gene supressor de tumor (TSG) é: um gene que, quando íntegro, reduz a chance de uma célula se tornar um tumor. Mutações ou deleções, envolvendo mecanismos genéticos e/ou epigenéticos, podem levar a inativações de tais genes .

Uma característica importante dos TSGs é que eles participam de processos que regulam negativamente o ciclo celular, desacelerando a mitose. Assim, os TSGs são freqüentemente descritos como os “freios da célula” (Hanahan, 2000).

O primeiro TSG a ser clonado foi o gene *RB1* (13q14.1-q14.2) (Friend, 1986). Esse gene codifica a proteína retinoblastoma que se liga ao fator de transcrição E2F e inibe a transcrição de genes essenciais da passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Wu, 1995). Mutações no gene *RB1* foram associadas ao retinoblastoma (OMIM: 180200), doença tumoral, com apresentação clínica esporádica ou familiar. Knudson utilizando deste modelo de tumorigênese publicou em 1971, a teoria dos dois eventos moleculares para o desenvolvimento da proliferação neoplásica. O primeiro evento seria uma mutação em heterozigose germinativa ou somática e o segundo evento seria a perda somática do alelo normal, chamada de perda de heterozigose (LOH). Sua teoria dos “*two hits*” é considerada como um marco na etiopatogenia dos tumores, estabelecendo a base do nosso entendimento sobre o processo de tumorigenese associados aos genes supressores de tumor (Knudson, 1971).

Hoje sabemos que grande parte das síndromes associadas à TSGs segue o modelo de Knudson. Uma mutação em heterozigose em um TSG predispõe o paciente à doença, mas somente após a inativação bi-alélica nas células dos tecidos-alvo (devido à inativação somática do alelo normal, LOH) é que se inicia o desenvolvimento e progressão tumoral. Assim, a

ocorrência de apenas mais um evento mutacional (somático) em portadores de mutação germinativa já desencadearia o desenvolvimento do tumor, enquanto que nos tumores esporádicos há necessidade que ocorram dois eventos somáticos no TSG de uma mesma célula. Observa-se então um padrão de herança dominante associado a um processo molecular de tumorigênese com padrão recessivo. Esse mecanismo de tumorigênese explica a ocorrência mais precoce de tumores familiares em relação aos seus correspondentes esporádicos (Knudson, 1971; Marx, 2005).

A LOH no *locus* de um TSG (seja por um evento germinativo e outro somático; ou por dois eventos somáticos) leva à inativação da proteína supressora de tumor codificada por esse gene. A inativação completa de uma proteína supressora de tumor acarreta um descontrole do ciclo celular e, por fim, no desenvolvimento de neoplasias.

1.1.4 Oncogenes e proto-oncogenes

Outro importante trabalho que é considerado um marco do nosso entendimento da genética de tumores também foi publicado na década de 70 do século passado. Em sua busca pela etiopatogenia dos tumores, Steve Martin identificou pela primeira vez que um gene de um retrovírus, *SRC* (do termo sarcoma), estaria envolvido na tumorigênese em humanos (Martin, 1970). Esse foi o primeiro oncogene descrito e lançou a hipótese que os tumores humanos poderiam ser causados por genes virais inseridos no genoma dos pacientes.

Pouco depois, em 1979, Michael Bishop e colaboradores descobriram que o gene *SRC* não era exclusivo do retrovírus, mas sim compunha uma família de genes que codificava proteínas que exerciam funções fisiológicas (de crescimento e diferenciação celular) em diversas espécies, inclusive em humanos (Oppermann, 1979). Esse estudo mudou completamente o paradigma da tumorigênese em referência a oncogenes, pois mostrou que genes presentes no genoma humano, e responsáveis pelo crescimento e diferenciação celular, poderiam ser super-ativados (atividade constitutiva) e estariam assim envolvidos na gênese das neoplasias humanas. Dessa forma, foi cunhado o termo proto-oncogene. Esse estudo alavancou a busca e identificação posterior de uma série de proto-oncogenes humanos e levou Bishop a ganhar o prêmio Nobel de medicina em 1989.

Nesse contexto histórico da tumorigênese, quatro anos após o reconhecimento do trabalho de Bishop, foram identificadas as primeiras mutações no proto-oncogene *RET* em casos com Neoplasia Endócrina Múltipla (NEM) tipo 2 (NEM-2), tornando-se esta a primeira NEM com a etiologia molecular desvendada (Mulligan, 1993). Mais quatro anos e o gene supressor de tumor responsável pela NEM tipo 1 (NEM-1), o gene *MEN1*, foi clonado e várias mutações foram descritas em famílias com NEM-1 (Chandrasekharappa, 1997).

1.1.5 Associação entre TSG e proto-oncogenes potencializam a tumorigênese

Atualmente, sabemos que os modelos iniciais envolvendo um único gene supressor de tumor ou um único proto-oncogene descrevem apenas uma parte do processo da tumorigênese. O estudo de alguns tumores comuns, como o câncer colo-retal e de mama, mostrou que ocorrem associações de alterações em TSG e proto-oncogenes e que o acúmulo desses eventos (aproximadamente 15) estariam associados à progressão tumoral e malignidade (Hanahan, 2000). Além dos diversos eventos genéticos e epigenéticos que ocorrem nas células tumorais, estudos recentes revelaram a importância da interação molecular entre os tumores e o estroma para a progressão neoplásica (Suh, 2007).

Assim, o processo neoplásico é bastante complexo podendo ser separado em algumas fases: predisposição, iniciação tumoral, progressão tumoral e manutenção da neoplasia. A capacidade de um tumor lançar células neoplásicas viáveis na corrente sanguínea e/ou no sistema linfático aptas a formarem metástases é considerada uma fase mais avançada da tumorigênese. O envolvimento combinado de TSGs e proto-oncogenes levaria a um descontrole sinérgico das vias celulares as quais eles pertencem. Essa é uma das causas da rejeição de algumas drogas no combate ao câncer. Quando se bloqueia uma via celular com uma droga específica, a redundância e o sinergismo que o tumor pode ter adquirido pela interação entre TSGs e proto-oncogenes, pode levar à recidiva tumoral

(Hanahan, 2000). Por esse motivo, a correlação gene-gene é, atualmente, um dos principais focos da pesquisa na área da oncologia molecular e também foi abordada no presente projeto de pesquisa.

1.2 INTRODUÇÃO CIRCUNSTANCIADA

1.2.1 Glândula hipófise

A hipófise está localizada no osso esfenóide, mais precisamente na sela túrcica (ou turca), uma cavidade óssea localizada na base do crânio. Dentre as várias glândulas endócrinas, a hipófise possui importância fundamental, pois ela está envolvida no controle de diversos processos, como o crescimento, desenvolvimento e reprodução do indivíduo, equilíbrio do metabolismo, entre outras funções. Isto ocorre via produção e secreção de seis hormônios:

- de crescimento: GH
- tireo-estimulante: TSH
- adenocorticotrófico: ACTH
- prolactina: PRL
- luteinizante: LH
- folículo estimulante: FSH

Importantes implicações podem ser observadas referentes à gênese da glândula hipófise. A parte anterior da hipófise (adenohipófise) tem origem embriológica do ectoderma oral (parte superior da cavidade oral). Já a parte posterior da hipófise (neurohipófise) tem origem neural, a partir do diencéfalo. Enquanto as células da adenohipófise produzem e secretam diversos hormônios (GH, TSH, ACTH, PRL, LH e FSH), a neurohipófise não produz nenhum hormônio, apenas armazena e secreta hormônios sintetizados no hipotálamo (hormônio anti-diurético- ADH, e ocitocina). Outra importante diferença entre a adeno hipófise e a neurohipófise é com relação ao sistema de sinalização hipotalâmica. O hipotálamo possui neurônios longos que se estendem até a neurohipófise, onde secretam diretamente neurotransmissores e hormônios (Guyton & Hall, 2006). Por outro lado, a comunicação entre o hipotálamo e a adenohipófise acontece de forma mais sofisticada, por meio de um plexo vascular, o sistema porta hipotálamo-hipófise. Inicialmente, núcleos específicos do hipotálamo secretam hormônios hipotalâmicos na eminência média. Os hormônios hipotalâmicos são então transportados pelos vasos do sistema porta hipotálamo-hipófise até a adenohipófise, onde cada tipo de célula hipofisária (somatotrofo, lactotrofo, corticotrofo, tireotrofo e gonadotrofo) expressa receptores hormonais específicos (GH-R, PRL-R, ACTH-R, TSH-R, LH-R e FSH-R). Dessa forma, o hipotálamo regula o funcionamento da adenohipófise de uma forma bastante específica (Guyton & Hall, 2006).

1.2.2 Tumores hipofisários

De acordo com estudos recentes sobre a prevalência de tumores hipofisários na população geral, aproximadamente 10% da população apresenta anomalias hipofisárias compatíveis com adenomas silenciosos (Hall, 1994). Séries de autópsia revelaram que de 6% a 22% (média de 14%) dos indivíduos investigados possuíam massas hipofisárias também compatíveis com tumores (Ezzat, 2004). Dados epidemiológicos recentes indicam que a prevalência dos tumores hipofisários é cerca de 1/1.000 (Daly, 2006).

Os tumores hipofisários podem apresentar hipersecreção dos hormônios hipofisários e assim são denominados de acordo com o hormônio produzido. Por exemplo, há tumores secretores de GH (somatotropinomas), secretores de PRL (prolactinomas), secretores de ACTH (corticotropinomas), secretores de TSH (tireotropinomas), secretores de gonadotropinas (LH ou FSH; gonadotropinomas) e co-secretores. Os tumores hipofisários que não secretam hormônios são denominados tumores não-funcionantes. Apesar de não causarem manifestações clínicas associadas à hiper-secreção hormonal, os tumores não-funcionantes podem levar a complicações por efeito de compressão causada por sua massa tumoral. Os prolactinomas são os tumores hipofisários mais prevalentes (40%), seguidos pelos somatotropinomas (20%), corticotropinomas (10-20%), tumores não-funcionantes (15%), gonadotropinomas e tireotropinomas (raros) (Arafah & Nasrallah, 2001).

Apesar dos tumores de hipófise apresentarem geralmente um crescimento lento com características benignas, eles podem freqüentemente ser invasivos. Já os tumores hipofisários malignos são raros e por não apresentarem um padrão histológico capaz de indicar malignidade, os carcinomas hipofisários são diagnosticados pela presença de metástases (Kovacs, 2001). Quando não tratados, os tumores hipofisários podem levar a uma menor sobrevida e aumento da morbidade pelas conseqüências clínicas do excesso de hormônios ou pelo crescimento tumoral descontrolado. São classificados como micro-adenomas quando menores de 1 cm e macro-adenomas quando maiores de 1 cm (Hardy, 1979). A idade média ao diagnóstico dos tumores esporádicos é de 30-40 anos, enquanto casos com histórico familiar tendem a desenvolver tumores mais precocemente, abaixo dos 30 anos de idade (Daly, 2006).

1.2.2.1 Acromegalia

O termo acromegalia é de origem grega e significa extremidade (*akro*) grande (*mega*). A acromegalia é uma doença insidiosa e desfigurante caracterizada por um crescimento desproporcional dos ossos das mãos e pés; ossos do crânio, principalmente mandíbula e frontal; e também aumento das partes moles, como língua, nariz e orelha. A principal causa da acromegalia é a ocorrência de tumor hipofisário secretor de GH, somatotropinoma (Chanson & Salenave, 2008). O GH secretado pelo tumor é então metabolizado no fígado e como conseqüência eleva os níveis do

insulin growth factor 1 (IGF-1). Acredita-se que após o início do desenvolvimento do somatotropinoma, transcorram de 4-10 anos até que se observem as manifestações clássicas da acromegalia. Assim, pacientes quando diagnosticados com acromegalia geralmente apresentam o tumor já há vários anos (Chanson & Salenave, 2008). Caso o somatotropinoma ocorra durante a infância ou adolescência, antes do fechamento das epífises dos ossos longos, o paciente crescerá longitudinalmente de forma descontrolada, caracterizando o “gigantismo”. A co-secreção tumoral de prolactina em alguns casos, levando ao hipogonadismo hipogonadotrófico, prorroga o período de fechamento das epífises, colaborando para o crescimento longitudinal e podendo levar a alturas extremas, > 200 cm (Shimon, 1998).

A incidência estimada da acromegalia é de 3-4 casos por milhão e a prevalência é de aproximadamente 50 casos por milhão de pessoas (Alexander, 1980; Bengtsson, 1988; Kauppinen-Makelin, 2005). Além das manifestações clínicas associadas ao crescimento descontrolado, os pacientes apresentam diversas comorbidades, como: hipertensão, diabetes mellitus, apnéia de sono, maior risco de câncer colorretal e complicações cardiovasculares, entre outras (Colao, 2004). A exposição crônica e elevada ao GH e IGF-1 está associada a diversas complicações e a maior taxa de mortalidade dos pacientes com somatotropinoma (Colao, 2004).

1.2.2.2 Tumorigênese hipofisária e a genética dos tumores hipofisários

A tumorigênese hipofisária tem sido um campo de ampla investigação pela comunidade científica. Por muitos anos prevaleceu uma controvérsia central sobre a tumorigênese hipofisária: Os adenomas seriam dependentes de estímulos hipotalâmicos ? Ou seriam causados por fatores hipofisários intrínsecos? (Melmed, 2006). Alguns modelos animais sugerem que a primeira hipótese deve ser privilegiada, sendo os fatores de crescimento considerados importantes na tumorigênese hipofisária. Por outro lado, a natureza clonal da maioria dos adenomas hipofisários fala a favor de um defeito molecular intrínseco da célula hipofisária (revisado por Bronstein & Melmed, 2005 e Pinto & Bronstein, 2008). Uma tentativa integradora propõe que a tumorigênese hipofisária ocorre devido a vários eventos seqüenciais. Hoje é aceita a idéia que a maioria dos adenomas hipofisários seja resultado de uma transformação clonal que dependa, por sua vez, de hormônios e fatores de crescimento para o crescimento tumoral (Melmed, 2003).

Quanto à genética dos casos esporádicos, Landis *et al.*, (1989) descreveram mutações somáticas no gene da sub-unidade α da proteína Gs (*GNAS1*) em adenomas secretores de GH, levando à ativação constitutiva da via de AMPc intracelular. Entretanto, a frequência de mutações *GNAS1* em somatotropinomas pode variar entre 4% a 40% de acordo com a população estudada (Hosoi, 1993; Hayward, 2001;

Taboada, 2009). Aparentemente, adenomas hipofisários secretores de GH com mutação *GNAS1* respondem melhor ao tratamento com o análogo de somatostatina (octreotide), em comparação aos adenomas sem mutação (Barlier A, 1998). Dessa forma, além de acrescentar dados relativos à tumorigênese hipofisária, esses estudos podem contribuir para a indicação de um tratamento mais adequado. Outro gene envolvido na tumorigênese hipofisária é o pituitary tumor transforming gene (*PTTG*). Comparando o padrão de expressão de RNA de hipófise normal e tumoral de rato, Pei & Melmed (1997) identificaram o *PTTG*, um oncogene que codifica uma proteína de 199 aminoácidos envolvida na mitose e na angiogênese (Zhang, 1999). A expressão da proteína PTTG foi identificada em praticamente todos os adenomas hipofisários humanos estudados. Assim como o *PTTG*, o gene que codifica o receptor do fator de crescimento fibroblástico 4 (*FGFR4*) foi associado à tumorigênese hipofisária, uma vez que sua expressão também foi relatada em adenomas hipofisários secretores de GH, ACTH, LH e FSH, mas não em hipófises normais (Qian, 2004). A expressão de *FGFR4* foi encontrada significativamente elevada em macroadenomas, entretanto mais estudos serão necessários para a melhor compreensão de sua função na tumorigênese da glândula hipófise.

1.3 Tumores hipofisários familiares

A grande maioria dos tumores hipofisários apresenta ocorrência esporádica, entretanto tumores hipofisários familiares podem ocorrer associados a síndromes envolvendo outras glândulas endócrinas, no contexto das NEMs (NEM-1; NEM-1 símile [NEM-4]; e complexo de Carney - CNC) ou a doenças que envolvem somente a glândula hipófise, como a *Familiar Isolated Pituitary Adenoma* (FIPA; predisposição familiar a adenomas hipofisários, OMIM: 102200); a *Pituitary Adenoma Predisposition* (PAP; predisposição familiar a tumores hipofisários, OMIM: 102200); e a *Isolated Familial Somatotropinoma* (IFS; acromegalia familiar isolada, OMIM: 102200) (Tabela 1). Apesar de representarem apenas 5% do total dos tumores esporádicos em geral, os tumores hipofisários familiares constituem um campo de estudo bastante produtivo para descoberta de genes associados à tumorigênese endócrina. Os estudos de famílias com tumores hipofisários hereditários aprofundaram nosso conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese hipofisária, assim como desenvolveram ferramentas genéticas para análise de predisposição a esses tumores, que aos poucos vêm sendo incorporadas à prática clínica (Daly, 2006).

Tabela 1: Síndromes hereditárias envolvendo tumores hipofisários

Síndrome	Gene/Locus	Achados	Hipófise	Referências
NEM-1	<i>MEN1</i> 11q13	Mutação LOH	Maioria prolactinoma e não-secretor. Co-secretore, somatotropinoma, corticotropinoma, menos freqüentes.	Chandrasekharappa, 1997 Vêrges, 2002
NEM-4	<i>p27Kip1</i> 12p13	Mutação MOH	Somatotropinoma familiar. Corticotropinoma esporádico.	Pellegata, 2007 Georgitsi, 2007
CNC-1	<i>PRKAR1A</i> 17q22	Mutação LOH	Somatotropinoma.	Kirschner, 2000
CNC-2	? 2p16	Co-segregação de marcadores polimórficos. MOH/ amplificação	Somatotropinoma.	Stratakis, 1996
FIPA / PAP	<i>AIP</i> 11q13.3	Mutação LOH	Somatotropinoma, prolactinoma e tumor misto, mais freqüentes. Demais tipos de tumores hipofisários.	Vierimaa, 2006
	? 2p16	Co-segregação de marcadores polimórficos. MOH	FIPA	Gadelha, 2000 Presente estudo.
	Outros <i>loci</i>	Possível associação	FIPA	Vierimaa, 2006 Khoo, 2009

LOH = perda de heretozigose; MOH = manutenção de heterozigose

1.3.1 Neoplasia endócrina múltipla tipo 1

A NEM-1 é uma síndrome tumoral complexa que envolve tumores em diversas glândulas, como: paratireóides, pâncreas endócrino/duodeno, hipófise, adrenais; entre outros tecidos endócrinos e não endócrinos (Wermer, 1954; Marx, 2005). A penetrância de tumores hipofisários na NEM-1 é variável, oscilando entre 20-40%. Destes, aproximadamente 80% são macroadenomas, em contraste com 42% de macroadenomas encontrados nos casos com tumores hipofisários esporádicos (Vèrges, 2002). Assim como ocorre nos casos esporádicos, o prolactinoma é o tumor mais freqüente entre os casos com NEM-1 (~ 70%), entretanto os adenomas hipofisários não-secretores também podem ser freqüentemente encontrados (~20%) (Brandi, 2001). Os tumores co-secretores; os somatotropinomas e os corticotropinomas são menos freqüentes, ocorrendo em 10%, 9% e 4% dos casos com NEM-1, respectivamente, enquanto os FSHoma e TSHoma são muito mais raros. Apesar de o hiperparatireoidismo ser a primeira manifestação clínica na maioria dos pacientes com NEM-1, cerca de 20% dos casos podem apresentar o tumor hipofisário como manifestação inicial da doença (Vèrges, 2002; Agarwal, 2009).

Aproximadamente 80% dos casos com NEM-1 familiar apresentam inativação do gene supressor de tumor *MEN1* (Gene ID NCBI: 4221). O *locus* do gene *MEN1* foi inicialmente estabelecido por análise de perda de heterozigose (LOH) em tumores endócrinos entero-pancreáticos de pacientes com NEM-1 (Larsson, 1988). O material genético desses tumores foi estudado

por meio de sondas de DNA que abrangiam todos os cromossomos humanos e revelaram a ausência de bandas do cromossomo 11. Estudos de ligação subseqüentes reduziram para 2 centiMorgan (~2 Megabases de DNA) a região cromossômica envolvida (Marx, 2005). Aproximadamente 10 anos após a localização original do *locus* do *MEN1*, dois estudos independentes utilizando estratégias de clonagem posicional isolaram o gene *MEN1* no braço longo do cromossomo 11, região 1, sub-região 3 (11q13) (Chandrasekharappa, 1997; Lemmens, 1997). O seqüenciamento desse gene em pacientes com NEM-1 familiar e esporádica documentou mutações inativadoras germinativas e somáticas, respectivamente, indicando sua associação com a doença (Chandrasekharappa, 1997; Lemmens, 1997). Além da presença de mutações, a ocorrência de 11q13-LOH observada em praticamente todos os tumores de pacientes com mutações germinativas *MEN1* fundamentam a hipótese de que esse gene seja um supressor de tumor (Marx, 2005).

Atualmente mais de 1.000 mutações inativadoras no gene *MEN1* já foram descritas (Lemos, 2008), inclusive em pacientes brasileiros (Toledo, 2007). Essas mutações podem ocorrer tanto em regiões codificadoras como em regiões intrônicas, sendo a maioria delas do tipo *nonsense* e *frameshift*, que predizem a síntese da proteína MENIN truncada (Lemos, 2008). Apesar de alguns trabalhos sugerirem a existência de algumas mutações recorrentes e algumas correlações genótipo-fenótipo na NEM-1, parece não existir *hot-spots* mutacionais consistentes no gene *MEN1* ou clara associação de mutações específicas com determinados fenótipos nessa síndrome (Brandi, 2001).

Estudos *in vitro* evidenciaram que a MENIN é uma proteína supressora de tumor envolvida no controle do ciclo celular, crescimento celular e integridade de material genético (Balogh, 2006). Recentemente, foi demonstrado que a MENIN regula a expressão do gene *CDKN1B*, que codifica a proteína supressora de tumor p27 (ver mais informações sobre a proteína p27 abaixo) (Karnik, 2005).

1.3.2 Neoplasia endócrina múltipla tipo 1-símile (NEM4 ou NEM-1-like)

Apesar do *MEN1* ser o principal gene associado à NEM-1, os resultados de estudos de rastreamento de mutações mostraram consistentemente ausência de mutações em cerca de 20% das famílias com NEM-1 (Owens, 2008). Esses resultados negativos podem ser geralmente atribuídos à: a) variação de sensibilidade dos métodos laboratoriais empregados; b) presença de mutações fora da região codificadora do gene (que não é analisada rotineiramente); c) presença de grandes deleções, que não são identificadas via PCR; e d) envolvimento de outros genes além do *MEN1*.

Diante da possibilidade da existência de genes ainda não identificados associados à NEM-1 e resultados obtidos em estudo de linhagens animais com NEMs, estudos recentes (descritos a seguir) identificaram as primeiras mutações germinativas em *p27^{Kip1}/CDKN1B* em humanos, confirmando a hipótese da NEM-1 ser uma doença poligênica.

1.3.2.1 Mutações germinativas no gene *p27(Kip1)/CDKN1B*

Em 2002, foi descrita uma linhagem de ratos com neoplasia endócrina múltipla, denominada NEM-X (Fritz, 2002; Piotrowska, 2004). Esses animais desenvolvem espontaneamente tumores endócrinos relacionados tanto à NEM-1 (tumor de paratireóide, tumor hipofisário e tumor no pâncreas endócrino) quanto à NEM-2 (hiperplasia multifocal de células C da tireóide, feocromocitoma bilateral), além de paraganglioma e catarata (Fritz, 2002). Por possuírem fácil acesso à manipulação e cruzamento desses animais, os autores realizaram estudo de ligação e, surpreendentemente, a região candidata identificada (4q43) não continha os genes homólogos ao *MEN1* e ao *RET*. Para refinar o mapeamento do gene candidato à NEM-X, novos marcadores polimórficos foram estudados e o intervalo que os autores localizaram continha o gene homólogo ao supressor de tumor *p27^{Kip1}/cdkn1b* (Pellegata, 2006). Os autores demonstraram que os animais com NEM-X possuíam uma duplicação em *tandem* c.520–528dupTTTCAGAC, que prediz uma proteína com 21 aminoácidos a mais que a normal. Após a localização do gene envolvido na NEM-X, os autores investigaram pacientes com clínica confirmada (ou suspeita) de NEM-1, mas sem mutação no gene *MEN1*. A mutação inativadora W76X (*nonsense*) foi documentada no gene *p27^{Kip1}/CDKN1B* em paciente com acromegalia familiar e HPT de aparecimento tardio. A análise dos familiares mostrou que o alelo mutado segregava com tumor hipofisário em dois casos com acromegalia e angiomiolipoma renal (Pellegata, 2006).

O gene *p27^{Kip1}/CDKN1B* está localizado no braço curto do cromossomo 12 na região 12-13.1 (12p13.1-p12) e codifica uma proteína supressora de tumor inibidora de quinase dependente de ciclina (p27) que é diretamente envolvida no controle do ciclo celular. Estudos em animais *knock out* para esse gene evidenciaram associação da inativação de *p27^{Kip1}/CDKN1B* com a tumorigênese hipofisária: esses animais desenvolveram hiperplasia/tumor hipofisário, aos 3 meses de idade, e gigantismo (Fero, 1996).

Vários estudos anteriores haviam analisado o gene *p27^{Kip1}/CDKN1B* e verificado que, apesar de possuir baixa expressão em diversos tumores em relação a tecidos normais, ele não era comumente mutado em tumores, sugerindo inativação epigenética. A mutação W76X descrita por Pellegata *et al.*, (2006) foi a primeira mutação germinativa identificada no gene *p27^{Kip1}/CDKN1B* em humanos e causou grande repercussão científica não somente na área da endocrinologia, mas na área da oncologia em geral.

1.3.2.2 Genes *CDKN2B/p15*, *CDKN2C/p18* e *CDKN1A/p21*

Com a descoberta de mutações em *CDKN1B/p27Kip1*, outros genes (*CDKN2B*, *CDKN2C*, *CDKN1A*) que codificam proteínas inibidoras de quinases dependentes de ciclinas (p15, p18 e p21) foram também analisados em casos com NEM-1 sem mutações *MEN1*. Mutações nesses genes foram identificadas pelo mesmo grupo que clonou o gene *MEN1* (Agarwal, 2009). Esses genes possuem um papel central no controle do ciclo celular, pela inibição das quinases dependentes de ciclinas 2, 4 e 6.

Pacientes com mutação no gene *CDKN1A/p21* apresentaram prolactinoma familiar, enquanto as mutações nos demais genes não foram associadas a tumores hipofisários (Agarwal, 2009).

1.3.3 Complexo de Carney

O complexo de Carney (CNC) é uma síndrome bem mais rara que a NEM-1, tendo sido descritos cerca de 500 casos no mundo (Kirschner, 2000). O CNC envolve predisposição a neoplasias na tireóide, hipófise, adrenais e testículos. Os pacientes geralmente apresentam pigmentação dérmica, mixomas cardíacos e schwannomas. Apesar de grande parte dos casos apresentar evidências de hiper-secreção de hormônio de crescimento / IGF-1 e/ou prolactina, tumores hipofisários foram diagnosticados em apenas cerca de 10% dos casos (Boikos, 2006). Aproximadamente 70% dos casos com CNC são familiares. Estudos de ligação mostraram que os *loci* 17q23 e 2p16 são associados ao CNC (Stratakis, 1996). Posteriormente, foram identificadas mutações inativadoras no gene *PRKAR1A*, que possui 11 éxons e é localizado no cromossomo 17, em aproximadamente 60% dos pacientes com CNC (Kirschner, 2000). O gene *PRKAR1A* codifica a subunidade regulatória 1 da proteína quinase dependente de AMPc - A (PKA). Assim, a identificação de mutações nesse gene mostrou a associação entre a inativação da via do AMPc e tumores associados ao CNC. O gene localizado no segundo *locus* de CNC, 2p16, ainda não foi localizado.

1.3.4 Acromegalia familiar isolada

1.3.4.1 Aspectos clínicos

A acromegalia familiar isolada (IFS) é definida pela presença de pelo menos dois familiares com a doença e que não apresentem NEM-1 ou CNC (Frohman, 2004). Os primeiros casos com IFS foram descritos no final do século XIX e começo do século XX (Schwoner, 1897; Fraenkel, 1901). Em 2004, aproximadamente 50 famílias com IFS já haviam sido descritas, possibilitando um bom delineamento de suas principais características clínicas (Soares, 2004). As manifestações clínicas e as principais complicações dos pacientes com IFS são bastante similares às observadas em casos com acromegalia esporádica. Quanto ao comportamento do tumor, também parece existir semelhanças sendo observados macro-adenomas em 60% a 90% dos casos esporádicos e em aproximadamente 90% dos casos com IFS (Soares, 2004). Uma diferença importante encontrada nos casos com IFS diz respeito à idade da manifestação da doença. Ao contrário dos casos esporádicos que geralmente são diagnosticados na 4ª / 5ª décadas de vida, os pacientes com IFS geralmente desenvolvem tumores mais precocemente, geralmente antes da 3ª década de vida (Soares, 2004). A baixa idade do desenvolvimento do somatotropinoma leva a um maior risco de gigantismo e, de fato, aproximadamente 25% dos casos IFS são gigantes. Os estudos das genealogias indicam que a IFS apresenta herança autossômica dominante com penetrância incompleta (Soares, 2004).

Ainda com relação à herança de IFS, um aspecto bastante interessante e peculiar é a forma de expressão da doença. Em um levantamento de 46 famílias com IFS, foi observado que 60% das famílias apresentavam pacientes afetados em uma única geração, enquanto somente 40% das famílias apresentam pacientes em pelo menos duas gerações (Soares, 2004).

1.3.4.2 Aspectos genéticos

Em 1993, Thakker *et al.*, observaram 11q13-LOH em somatotropinomas esporádicos e associados à NEM-1. Posteriormente, Yamada *et al.*, (1997) e Gadelha *et al.*, (1999) observaram que somatotropinomas de pacientes com IFS também apresentavam 11q13-LOH. Além de estudos de mapeamento por LOH, a associação do *locus* 11q13 com a IFS foi confirmada por estudos de ligação que utilizaram marcadores de microssatélites localizados nessa região e verificaram a co-segregação de haplótipos com a IFS (Gadelha, 2000; Luccio-Camelo, 2004). Em conjunto, esses estudos sugeriam a existência de um gene supressor de tumor em 11q13 associado à gênese do somatotropinoma esporádico e familiar NEM-1 e IFS.

Com a clonagem e identificação de várias mutações germinativas no gene *MEN1* (11q13) em famílias NEM-1 (Chandrasekharappa, 1997), esse se tornou o principal gene candidato para a IFS. Entretanto, nenhuma mutação *MEN1* (assim como nos genes codificadores das proteínas Gs, Gi e GHRH-R) foi identificada em famílias com IFS (Teh, 1998; Grimmond, 1998; Jorge, 2001; De Menis, 2002;

Luccio-Camelo, 2004; Soares, 2005). Outros genes mapeados na região 11q13 e envolvidos em reparo de DNA e apoptose (*FEN1* e *REQ*) também foram excluídos (Eguchi, 2002).

1.3.4.3 Mutações *AIP*

Em 2006, Vierimaa *et al.*, realizaram uma extensa análise de marcadores polimórficos (SNPs) em uma família finlandesa com treze pacientes apresentando tumores hipofisários (GH, GH/PRL e PRL) e obtiveram um LOD score de 7.1 ($p= 0.0000001$) para a região 11q12-11q13; e puderam, com certeza, inferir associação de um gene nessa região à doença daquela família (Vierimaa, 2006). Entretanto, essa região é bastante “populosa” e continha 295 genes. Os pesquisadores realizaram então uma análise de expressão de 172 desses genes em nove familiares e sete controles e puderam identificar genes com baixa expressão. Entre eles, encontrava-se o gene *aryl hydrocarbon receptor interacting-protein (AIP)*, que foi seqüenciado e se mostrou o gene responsável pela doença, denominada pelos finlandeses de *Pituitary Adenoma Predisposition (PAP)* (Vierimaa, 2006).

O gene *AIP* contém 6 éxons codificantes, não sofre *imprinting* e é expresso de forma ubíqua (Kuzhandaivelu, 1996). Utilizando técnicas de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), o gene *AIP* foi mapeado no braço longo do cromossomo 11, região 1, sub-região 3.3 (11q13.3) (Carver, 1998).

Neste trabalho original, três mutações germinativas clássicas (Q14X, IVS3-1G>A e R304X) foram identificadas no gene *AIP* em pacientes finlandeses com PAP, assim como em pacientes com tumores esporádicos (Vierimaa, 2006). Além das mutações, foi também documentada LOH em todos os tumores de pacientes estudados, sugerindo que o gene *AIP* teria um papel supressor de tumor.

1.3.4.3.1 Mutações *AIP* em famílias com FIPA

Até janeiro de 2010, 32 famílias FIPA com mutações *AIP* foram descritas (Tabela 2). Ao total, vinte e três diferentes mutações *AIP* foram identificadas, sendo 7 mutações do tipo *nonsense* (c.40C>T, Q14X; c.70G>T, E24X; c.424C>T, Q142X; c.649C>T, Q217X; c.715C>T, Q239X; c.804A>C, Y268X; c.910C>T, R304X); quatro *missense* (c.713G>A, C238Y; c.721A>G, K241E; c.811C>T, R271W; c.911G>A, R304Q), seis *frameshift* (c.286-287delGT, V96PfsX31; c.500delC, P167Hfs3X; c.517-521delGAAGA, E174fs22X; c.542delT, L181fs; c.854-857delAGGC, Q285fs18X; c.919insC, Q/R307fs), duas deleções *inframe* (c.138_161del24, G47_R54del; c.66-71delAGGAGA, G23_E24del), uma inserção *inframe* (c.794_823dup30, A274_H275ins10), duas grandes deleções (c.100-1,025_279+357, A34_K93; c.(1,104_-109)_279+578) e uma mutação dupla na região promotora (c.-270-269CG>AA; c.-220G>A).

Tabela 2: Mutações *AIP* em pacientes com tumor hipofisário familiar isolado

Tumor hipofisário	Família	Gene <i>AIP</i>	Proteína	Tipo de mutação	Éxon	Tumor	Origem	Ano/Ref
GH, PRL, GH/PRL	11 parentes: 4 GH, 5 PLR, 2 GH/PRL	c.40C>T	Q14X	nonsense	1	LOH	Finlândia	2006/Vierimaa
GH/PRL	2 parentes	c.40C>T	Q14X	nonsense	1	LOH	Finlândia	2006/Vierimaa
GH	2 irmãos	c.910C>T	R304X	nonsense	6	NI	Itália	2006/Vierimaa
GH, PRL	4 parentes: 3 GH, 1 PRL	c.424C>T	Q142X	nonsense	3	NI	Itália	2007/Daly
GH, GH/PRL	2 parentes: 1 GH, 1 GH/PRL	c.649C>T	Q217X	nonsense	5	NI	Bélgica	2007/Daly
GH	2 parentes	c.715C>T	Q239X	nonsense	5	NI	França	2007/Daly
GH, GH/PRL	3 parentes: 2 GH, 1 GH/PRL	c.910C>T	R304X	nonsense	6	NI	Itália	2007/Daly
GH, GH/PRL	3 parentes: 2 GH, 1 GH/PRL	c.517-521delGAAGA	E174fs22X	frameshift	4	LOH	Brasil	2007/Daly 2007/Naves
GH/FSH, GH/PRL	2 parentes: 1 GH/FSH, 1 GH/PRL	c.854-857delAGGC	Q285fs18X	frameshift	6	NI	Itália	2007/Daly
GH	2 parentes	c.138_161del24	G47_R54del	inframe del	2	NI	Argentina	2007/Daly
PRL, NS	2 parentes: 1 PRL, 1 NS (LH+)	c.721A>G	K241E	missense	5	NI	Bélgica	2007/Daly
GH	2 parentes	c.811C>T	R271W	missense	6	NI	França	2007/Daly
GH, PRL	2 parentes: 1 GH, 1 PRL	c.811C>T	R271W	missense	6	NI	França	2007/Daly
GH, NS	3 parentes: 2 GH, 1 NS	c.804A>C	Y268X	nonsense	6	NI	Brasil	2007/Toledo
GH	caso-índice	c.542delT	L181fs	frameshift	4	NI	Espanha	2007/Georgitsi
GH	caso-índice	c.66-71delAGGAGA	G23_E24del	inframe del	1	LOH	Alemanha	2007/Georgitsi
GH	caso-índice	c.911G>A	R304Q	missense	6	NI	Itália	2007/Georgitsi
GH, GH/PRL	3 parentes: 2 GH, 1 GH/PRL	c.286-287delGT	V96PfsX31	frameshift	3	LOH	Japão	2007/Iwata
GH, GH/PRL	7 parentes: 6 GH, 1 GH/PRL	c.70G>T	E24X	nonsense	1	LOH	Brasil	2008/Leountioiu

Continua...

Conclusão Tabela 2

Tumor hipofisário	Família	Gene <i>AIP</i>	Proteína	Tipo de mutação	Éxon	Tumor	Origem	Ano/Ref
GH/PRL	2 parentes	c.241C>T	R81X	nonsense	2	LOH	USA	2008/Leountioiu
elevated GH/PRL	2 parentes	c.910C>T	R304X	nonsense	6	NI	Romênia	2008/Leountioiu
GH, PRL, GH/PRL	8 parentes: 6 GH, 1 PRL, 1 GH/PRL	c.910C>T	R304X	nonsense	6	NI	Inglaterra	2008/Leountioiu
GH	3 parentes	c.794_823dup30	A274_H275ins10	inframe ins	6	LOH	Inglaterra	2008/Leountioiu
GH	3 parentes	c.713G>A	C238Y	missense	5	LOH	México	2008/Leountioiu
GH	2 parentes	c.911G>A	R304Q	missense	6	NI	Romênia	2008/Leountioiu
GH, GH/PRL	2 parentes	c.-270-269CG>AA; c.-220G>A		promotor, dupla		LOH	Japão	2008/Leountioiu
GH, NS	2 parentes	c.100-1,025_279+357	A34_K93	grande deleção	2	NI	Inglaterra	2008/Georgitsi
GH	2 parentes	c.(1,104_-109)_279+578		grande deleção	1 and 2	NI	Alemanha	2008/Georgitsi
GH	caso-índice	c.919insC	Q/R307fs	frameshift	6	NI	NI	2008/Beckers
GH, PRL	3 parentes: 2 GH, 1 PRL	c.811C>T	R271W	missense	6	NI	Austrália, Nova Zelândia	2009/Jennings
GH	6 parentes com traços acromegálicos	c.500delC	P167Hfs3X	frameshift	4	NI	Malásia	2009/Khoo
GH[±]	2 parentes (mãe-filha)	c.241C>T	R81X	nonsense	2	LOH (somatotropinoma e tumor adrenocortical)	Brasil	2010/Toledo

GH= somatotropinoma; PRL= prolactinoma; NS= não-funcionante; FSH= FSHoma; ± = tumores não-hipofisários; LOH= perda de heterozigose; NI= não informado

1.3.4.3.2 Mutações *AIP* em pacientes com tumor hipofisário esporádico

Excluindo-se os pacientes finlandeses identificados com a mutação fundadora Q14X (ver item “mutações recorrentes” abaixo) e os pacientes com a alteração R16H (inicialmente descrita como mutação, mas que provavelmente se trata de polimorfismo), de Maio de 2006 até Janeiro de 2010 foram descritos quarenta e sete (47) pacientes diagnosticados com tumor hipofisário aparentemente esporádico carreando mutação germinativa *AIP* (Tabela 3).

Entre os 27 publicados (vinte pacientes com tumor hipofisário esporádico foram apresentados durante o congresso ENDO 2009 - Daly, 2009 - OR39-5 - ainda não foram publicados), foram descritas 23 mutações diferentes, incluindo 6 *missense* (K103R; V195A; I257V; A277P; c.896C>T, A299V; c.911G>A, R304Q); 6 *splicing* (IVS2-1G>C; c.279+23C>T; C.468+15C>T; c.468+16G>T; c.469-2A>G; c.469-1G>A); 5 *frameshift* (Q82fs7X; P114fs; c.404delA, H135Lfs19X; c.824-825insA, H275Qfs; Q307fs); 4 *nonsense* (c.64C>T, R22X; c.601A>T, L201X; c.721A>T, K241X; c.910C>T, R304X); 1 *missense inframe del* (c.878-879AG>GT + c.880-891delCTGGACCCAGCC, E293G + L294_A297del) e 1 *inframe del* (c.742_744delTAC, Y248del).

Tabela 3: Mutações *A/P* em pacientes com tumor hipofisário esporádico

Tumor hipofisário	Idade	Histórico	Gene <i>A/P</i>	Proteína	Mutação	Éxon	Tumor	Origem	Ano/Ref
GH	11	esporádico#	c.40C>T	Q14X [#]	<i>nonsense</i>	1	LOH	Finlândia	2006/Vierimaa
GH	21	esporádico#	c.40C>T	Q14X [#]	<i>nonsense</i>	1	LOH	Finlândia	2006/Vierimaa
GH	34	esporádico#	c.40C>T	Q14X [#]	<i>nonsense</i>	1	LOH	Finlândia	2006/Vierimaa
GH/PRL	14	esporádico#	c.40C>T	Q14X [#]	<i>nonsense</i>	1	LOH	Finlândia	2006/Vierimaa
GH	24	esporádico#	c.40C>T	Q14X [#]	<i>nonsense</i>	1	LOH	Finlândia	2006/Vierimaa
GH/PRL	42	esporádico#	c.40C>T	Q14X [#]	<i>nonsense</i>	1	LOH	Finlândia	2006/Vierimaa
GH/PRL	26	esporádico	c.469-1G>A	defeitos de <i>splicing</i>	<i>splicing</i>	IVS 3	LOH	Finlândia	2006/Vierimaa
GH	41	esporádico#	c.40C>T	Q14X [#]	<i>nonsense</i>	1	LOH	Finlândia	2007/Georgitsi
GH	36	esporádico#	c.40C>T	Q14X [#]	<i>nonsense</i>	1	LOH	Finlândia	2007/Georgitsi
PRL	35	esporádico#	c.40C>T	Q14X [#]	<i>nonsense</i>	1	LOH	Finlândia	2007/Raitila
GH/PRL	35	esporádico#	c.40C>T	Q14X [#]	<i>nonsense</i>	1	LOH	Finlândia	2007/Raitila
GH	15	esporádico	c.404delA	H135Lfs19X	<i>frameshift</i>	3	NI	França	2007/Cazabat
GH	24	esporádico	c.601A>T	L201X	<i>nonsense</i>	4	NI	França	2007/Cazabat
GH [±]	27	esporádico	c.601A>T	L201X	<i>nonsense</i>	4	NI	França	2007/Cazabat
GH	17	esporádico	c.910C>T	R304X	<i>nonsense</i>	6	NI	França	2007/Cazabat
GH	40	esporádico	c.469_-2A>G	defeitos de <i>splicing</i>	<i>splicing</i>	IVS 4	NI	França	2007/Cazabat
GH	24	esporádico	c.64C>T	R22X	<i>nonsense</i>	1	LOH		2007/Barlier
GH	8	esporádico	c.824-825insA	H275Qfs	<i>frameshift</i>	6	LOH	USA	2007/Georgitsi
GH	20	esporádico	IVS2-1G>C	defeitos de <i>splicing</i>	<i>splicing</i>	IVS 2 / éxon 3	NI	USA	2007/Georgitsi
GH	16	esporádico	c.896C>T	A299V	<i>missense</i>	4	NI	Holanda	2007/Georgitsi
GH	< 29	esporádico	c.878-879AG>GT and c.880-891delCTGGACCCAGCC	E293G and L294_A297del	<i>missense e inframe del</i>	6	LOH	Alemanha	2007/Georgitsi
ACTH	26	esporádico	c.911G>A	R304Q	<i>missense</i>	6	NI	Polônia	2007/Georgitsi
PRL	12	esporádico	NI	V195A	<i>missense</i>	4	NI	Brasil	2009/Jaffrain-Rea
GH/PRL	12	esporádico	NI	A277P	<i>missense</i>	6	NI	Itália	2009/Jaffrain-Rea
GH	15	esporádico	c.468+16G>T	defeitos de <i>splicing</i>	<i>splicing</i>	IVS 3	NI	Itália	2009/Jaffrain-Rea
GH/PRL	17	esporádico	C.468+15C>T	defeitos de <i>splicing</i>	<i>splicing</i>	IVS 3	NI	Espanha	2009/Jaffrain-Rea

Continua...

Conclusão Tabela 3

Tumor hipofisário	Idade	Histórico	Gene <i>AIP</i>	Proteína	Mutação	Éxon	Tumor	Origem	Ano/Ref
GH	15	esporádico	Q82fs7X	90X	<i>frameshift</i>	2	NI	Bulgária	2009/Jaffrain-Rea
GH/PRL	43	esporádico	c.279+23C>T	defeitos de <i>splicing</i>	<i>splicing</i>	IVS 2	NI	Itália	2009/Jaffrain-Rea
GH	17	esporádico	c.910C>T	R304X	<i>nonsense</i>	6	NI	Itália	2009/Jaffrain-Rea
GH	< 18	esporádico	c.742_744delTAC	Y248del	<i>inframe del</i>	5	LOH	Itália	2008/Georgitsi
PRL	pediátrico	esporádico	c.721A>T	K241X	<i>nonsense</i>	5	NI	NI	2008/Beckers
GH	pediátrico	esporádico	NI	P114fs	<i>frameshift</i>	3	NI	NI	2008/Beckers
NI	pediátrico	esporádico	NI	Q307fs	<i>frameshift</i>	6	NI	NI	2008/Beckers
ACTH	pediátrico	esporádico	NI	K103R	<i>missense</i>	3	NI	NI	2008/Beckers
GH	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH/PRL	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
GH/PRL	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
PRL	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
PRL	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
PRL	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
PRL	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
PRL	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
PRL	18 [†]	esporádico	mutado					Consórcio Belga	2009/Tichomirowa
TSH	38	esporádico	NI	I257V	<i>missense</i>	5	NI	Consórcio Belga	2009/Fajardo Montanana
GH	67	esporádico	c.911G>A	R304Q	<i>missense</i>	6	NI	Itália	2009/Occhi
GH	32	esporádico	c.910C>T	R304X	<i>nonsense</i>	6	NI	Itália	2009/Occhi

18[†] = média de 18 anos de idade; # = mutação fundadora; IVS= íntron; LOH= perda de heterozigose; ± = caso com tumores não-hipofisários concomitantes; NI= não informado; GH= somatotropinoma; PRL= prolactinoma; ACTH= corticotropinoma; TSH= tireotropinoma

1.3.4.3.3 Mutações recorrentes em *AIP*

Dentre as mutações descritas no gene *AIP*, nota-se que algumas foram encontradas em mais de uma família com FIPA: Q14X; R81X; R271W; R304Q e R304X ou em mais de um paciente com apresentação clínica de tumor hipofisário aparentemente esporádico: Q14X; L201X; R304Q; R304X. Três mutações recorrentes (Q14X, R304Q e R304X) foram identificadas tanto nos casos familiares quanto esporádicos. A mutação Q14X foi encontrada em pacientes com tumores hipofisários familiares e esporádicos da Finlândia, mas não em pacientes de outros países. O grande número de pacientes finlandeses com essa mutação (N=21) poderia ser potencialmente melhor explicado devido a um efeito fundador e não por causa de um possível *hot-spot* mutacional no códon 14 do gene *AIP* (Vierimaa, 2006). Interessante que mutações recorrentes no gene *MEN1* que foram descritas anteriormente em pacientes finlandeses também foram consideradas mutações fundadoras: ao total, trinta e nove (39) pacientes finlandeses com NEM-1 foram identificados com a mutação 1466del12 e outros 29 com a mutação 1657insC (Vierimaa, 2007). Recentemente, descrevemos uma grande família brasileira com NEM-1 na qual identificamos 50 familiares portadores da mutação fundadora 308delC (Lourenço-Jr, 2008). A presença de efeitos fundadores deve ser considerada na listagem de mutações, para que não ocorra viés na análise de mutações recorrentes.

As demais mutações recorrentes (R81X; R271W; R304Q e R304X) ocorreram em famílias e casos esporádicos aparentemente não relacionados de diferentes países e assim representam potenciais *hot-spots* mutacionais.

Além dessas mutações recorrentes, o códon 241 apresenta duas mutações diferentes (K241E e K241X), uma em um caso familiar e a outra em um caso esporádico. Assim, este códon aparentemente é propenso a mutações.

1.3.4.3.4 Frequência de mutações *A/P* em famílias FIPA

O mais extenso trabalho envolvendo análise de mutação *A/P* em famílias FIPA reuniu 73 famílias abrangendo praticamente todos os tipos e combinações de tumor hipofisário (NS e secretores de GH, PRL, FSH, LH, TSH e gonadotropinas). Metade das famílias com IFS estudadas apresentavam mutação *A/P*, enquanto no total das 73 famílias FIPA, apenas onze (15%) apresentavam mutações (Daly, 2007). Outro estudo colaborativo internacional sugeriu que a frequência de mutações *A/P* em famílias FIPA pode ser maior, desde que das 26 famílias FIPA analisadas 9 (34,6%) apresentavam mutações (Leountiou, 2008).

Em ambos extensos estudos colaborativos, o método de análise de mutação utilizado foi a amplificação via PCR das regiões codificadoras e fronteiras intron/éxon e posterior seqüenciamento direto. Georgitsi *et al.* (2008), aprofundaram as análises genéticas de famílias FIPA aparentemente sem mutação *A/P*. Essas famílias foram analisadas com uso da técnica de amplificação multiplex de sondas dependentes de ligação, MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; Schouten, 2002), capaz de identificar possíveis grandes deleções e/ou grandes inserções que não são identificáveis por seqüenciamento automático. Das 21

famílias assim analisadas, 2 (9,5%) apresentavam grandes deleções no gene *AIP* (c.100-1,025_279+357, A34_K93; c.[1,104_-109]_279+578) (Georgitsi, 2008). Assim, o número de famílias FIPA com inativação do gene *AIP* pode ser maior do que se pensava inicialmente. À medida que o número de famílias analisadas por seqüenciamento e MLPA aumente, será possível conhecer com mais precisão a freqüência de mutações *AIP* em famílias com FIPA.

1.3.4.3.5 Freqüência de mutações *AIP* em pacientes com tumor hipofisário esporádico

No artigo original de Vierimaa *et al.*, (2006), 16% dos pacientes com tumor hipofisário esporádico apresentavam mutação germinativa *AIP*. Como a grande maioria dos tumores hipofisários é esporádica, um grande número destes pacientes pode ser investigado em todo mundo. Yu *et al.*, (2006) seqüenciaram as regiões mutadas nos pacientes finlandeses em 66 pacientes dos USA com tumores hipofisários, sendo 52 deles com acromegalia ou prolactinoma, e não encontraram mutações germinativas. Outros trabalhos conseguiram reunir um número ainda maior de pacientes não finlandeses com tumores hipofisários esporádicos e também observaram que mutações *AIP* nestes pacientes são bastante raras. Barlier *et al.*, não encontraram mutação em 107 casos analisados (Barlier, 2007), enquanto Cazabat *et al.*, encontraram 5 pacientes com mutação germinativa *AIP* entre os 154 estudados (3%) (Cazabat, 2007). Os resultados de outros estudos também indicam que o envolvimento

genético (mutações) de *AIP* na gênese ou progressão de tumores hipofisários esporádicos é pouco freqüente. Como discutido anteriormente, a alta freqüência de mutações encontrada em casos aparentemente esporádicos da Finlândia (16%) é devido ao efeito fundador da mutação Q14X (Daly, 2009a; Daly, 2009b)

Interessante termos em mente que, assim como observado para *AIP*, mutações germinativas e somáticas em outros genes supressores de tumor associados à predisposição familiar a tumores hipofisários (*MEN1*, *PRKAR1A* e *p27Kip1*) também são raras em pacientes com tumores hipofisários esporádicos (Zhuang, 1997; Dahia, 1998; Sandrini, 2002).

1.3.4.3.6 Alterações *missense* e novos polimorfismos no gene *AIP*

No banco de polimorfismos do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) há descritos 5 polimorfismos não silenciosos no gene *AIP* (L49V, rs1063385; L214M, rs3210041; L228Q, rs641081; V276A, rs61741147; e R307Q, rs4930199). Nos recentes rastreamentos de mutações *AIP*, treze novas alterações *missense*, que levam à troca de aminoácidos, foram identificadas: (R16H, V49M, K103R; R128H; V195A; C238Y; K241E; I257V; R271W; A277P; E293G; A299V; R304Q) (Tabela 4).

Tabela 4: Polimorfismos novos identificados no gene *AIP*

Gene <i>AIP</i>	Proteína	Éxon	Pacientes	Tumor	Amostas controles	Ano/Ref
c.47G>A	R16H	1	FIPA, 2 parentes com GH (França)	NI	0/100	2007/Daly
			1 tumor hipofisário esporádico (Itália); 5 tumores hipofisários (1 USA; 4 Polônia - 3/4 ACTH)	MOH (2/2)	0/181 (Inglaterra); 0/53 (Itália); 0/209 (Finlândia); 1/90 (Alemanha)	2007/Georgitsi
			2 tumor hipofisário esporádico GH (França)	NI	2/270	2007/Cazabat
			2 NS (Alemanha)	NI		2008/Buchbinder
			1 PRL (Bulgária)			2008/Yaneva
			2/373 câncer de cólon (Finlândia)	MOH	0/209	2007/Georgitsi
			1/93 carcinoma familiar não-medular		3/902	2009/Raitila
c.68G>A	G23E	1	6/373 câncer de cólon (Finlândia)	MOH	5/532 (diferentes origens)	2007/Raitila
c.145G>A	V49M	2	1 tumor hipofisário esporádico	MOH	0/191 (Japão)	2007/Iwata
	R128H	3	1 tumor hipofisário esporádico	NI	resíduo não conservado evolutivamente	2009/Jaffrain

MOH = manutenção de heterozigose
 NI = não informativo
 FIPA = tumor hipofisário familiar isolado
 GH = somatotropinoma
 ACTH = corticotropinoma
 NS = tumor hipofisário não-secretor
 PRL = prolactinoma

A identificação de potenciais polimorfismos não silenciosos em genes associados à predisposição a doenças é importante pois pode ter consequências clínicas. As formas de se caracterizar o potencial tumorigênico de uma alteração *missense* são: estudo de segregação genótipo-fenótipo; investigação de LOH; análise de conservação evolutiva; estudos funcionais; e análise de um número grande de controles saudáveis.

No caso do gene *AIP*:

- a) a maioria das famílias FIPA identificadas são pequenas (*duos* ou *trios*) e as mutações apresentam usualmente baixa penetrância, o que limita os estudos de segregação.
 - b) como os tumores hipofisários podem apresentar dimensões relativamente pequenas e/ou difícil acesso cirúrgico (além de casos sem indicação cirúrgica), o estudo de LOH de tumores hipofisários nem sempre é possível.
 - c) os estudos de conservação evolutiva em proteínas pouco conhecidas são limitados, pois essas proteínas podem apresentar diversos domínios funcionais, sendo que alguns deles podem ser conservados somente em algumas espécies.
- Por outro lado, polimorfismos não silenciosos podem ocorrer em domínios importantes, mas apresentarem poucas consequências funcionais.

Assim, boas alternativas para caracterizar as mutações *missense* encontradas em *AIP* são a análise de frequência alélica em controles saudáveis e estudos funcionais. Leontiou *et al.* (2008), verificaram que a mutação *missense* C238Y, que havia sido identificada em associação com LOH no tumor, e a mutação recorrente R271W, assim como as mutações *nonsense* R81X, Q217X e R304X, levam à perda de interação de AIP com a fosfodiesterase PDE4A5, específica de cAMP; possivelmente alterando a via de cAMP intracelular.

Outra alteração *missense* de bastante interesse é a R16H. Essa alteração germinativa foi inicialmente encontrada em uma família francesa com acromegalia isolada e estava ausente em amostras de 100 casos controles; assim foi descrita como uma possível mutação (Daly, 2007). Posteriormente, a R16H também foi encontrada em amostras de sangue de 11 pacientes com tumores hipofisários esporádicos (Georgitsi, 2007; Cazabat, 2007; Buchbinder, 2008; Yaneva, 2008). Entretanto, seis amostras de outros controles analisados também apresentavam a alteração R16H e dois tumores de pacientes esporádicos com a alteração não apresentavam LOH (Georgitsi, 2007; Cazabat, 2007; Raitila, 2009). Esses últimos resultados indicam que a alteração R16H deve ser um polimorfismo (Tabela 4). Contudo, devido à baixa penetrância das mutações *AIP* e da possibilidade de contaminação com tecido hipofisário normal nas análises de LOH, a genotipagem de mais controles e estudos funcionais serão necessários para avaliar melhor a patogenicidade da alteração R16H.

1.3.4.4 Análise do potencial de IHQ como ferramenta diagnóstica para guiar o rastreamento de mutações *AIP*

Visto que a frequência de mutações germinativas *AIP* em pacientes com tumores hipofisários esporádicos é baixa, Georgitsi *et al.* (2007), avaliaram a contribuição da análise de imunohistoquímica (IHQ) na seleção de casos suspeitos de possuírem mutação. Cinquenta tumores foram analisados (12 com mutação *AIP* e 38 sem mutação *AIP*) e foi encontrada sensibilidade de 75% e especificidade de 95%. Esses resultados indicam que a análise de IHQ, mais rápida e barata que a análise de seqüenciamento, poderia ser utilizada para “pré-rastrear” tumores hipofisários para a presença de mutações no gene *AIP*. Porém, os resultados advindos de outros grupos não corroboraram com a potencial utilidade da IHQ como uma ferramenta diagnóstica. Assim, Leontiou *et al.* (2008) e Jaffrain-Rea *et al.* (2009), verificaram que os tumores de famílias FIPA com e sem mutação *AIP* apresentam marcação positiva na IHQ. A possível discrepância desses resultados pode ter ocorrido devido à presença da mutação Q14X nos casos estudados por Georgitsi *et al.* (2007) que levam um sinal de parada de transcrição bastante precoce.

1.3.4.5 A proteína AIP (XAP2 / ARA9)

A proteína AIP foi identificada por dois grupos que independentemente buscavam ligantes da proteína de virulência X do vírus da hepatite B (proteína X) e do aril hidrocarbono (também chamado de AHR

ou receptor de dioxina). Ambos os grupos identificaram uma proteína desconhecida de 330 aminoácidos (Kuzhandaivelu, 1996; Carver, 1997). O primeiro grupo chamou essa nova proteína de *XAP2* (X-Protein Associated Protein 2; segunda proteína identificada que interage com a proteína X do vírus da hepatite B) (Kuzhandaivelu, 1996). O outro grupo por sua vez denominou a nova proteína de ARA9, o nome do clone que continha a proteína ligante (Carver, 1997). A sigla AIP, que vem da “proteína que interage com AHR” (AHR-Interacting Protein), foi a utilizada no primeiro artigo que identificou mutações *AIP* em humanos (publicado na revista *Science*; Vierimaa, 2006) e vem sendo utilizado desde então em todos os artigos com enfoque em tumorigênese hipofisária.

1.3.4.6 Possível envolvimento de AIP na tumorigênese

A função mais bem caracterizada de AIP é a estabilização do complexo citoplasmático formado por AHR e proteína chaperona Hsp-90 (do inglês *heat-shock protein*) (Meyer, 2000). AIP interage com o complexo AHR-HSP90 e o estabiliza no citoplasma. AHR é um fator de transcrição que na presença de AIP é mantido inativado no citoplasma. Esse complexo é desestabilizado na presença de cancerígenos (como a dioxina) ou na ausência de AIP, fazendo com que AHR migre para o núcleo. No núcleo, a proteína AIP se desprende do complexo e retorna ao citoplasma, enquanto o AHR interage diretamente com regiões de DNA promotoras-XRE (Xenobiotic Regulatory Enhancer), regulando a transcrição de diversos genes (Meyer, 2000). Ainda não se conhece todos os genes regulados por AHR, entretanto

sabe-se que ele regula a expressão de genes envolvidos na via de degradação de xenobióticos, como os genes *CYP* (*CYP1A1*, por exemplo) (Meyer, 2000). Outro gene de bastante interesse que tem sua expressão controlada por AHR é o *CDKN1B/p27Kip1*, que codifica uma proteína inibidora de quinase dependente de ciclina, a p27^{Kip1} (Kolluri, 1999). Como já comentado anteriormente, mutações germinativas no gene *p27Kip1* foram recentemente associadas ao fenótipo *MEN1-like* (NEM-4), incluindo família com acromegalia associada a hiperparatireoidismo (Pellegata, 2006).

Outra possível participação de AIP na tumorigênese pode ocorrer por meio de interação com proteínas envolvidas na via de sinalização do segundo mensageiro AMP cíclico (AMPC). Em 2003, Bolger *et al.*, demonstraram que AIP é capaz de interagir *in vitro* com uma fosfodiesterase dependente de AMPC, a 4A5 (PDE4A5). Leountiou *et al.* (2008) observaram que a proteína AIP mutante perde sua capacidade de interagir com PDE4A5, possivelmente interferindo na cascata intracelular de AMPC. Assim, o gene *AIP* foi inserido na lista dos genes bastante conhecidos nos estudos de tumorigênese endócrina, que podem causar descontrole de AMPC intracelular, como o *GNAS1* e o *PRKAR1A*, além dos genes mais recentemente descritos *PDE11A* e *PDE8B* (Horvath, 2006; Horvath, 2008) (Figura 1).

Figura 1: A ativação ou inativação de diversos genes da via de AMPc já foram associadas à tumorigênese endócrina. *AIP* interage com PDE4A5 e PDE2A, proteínas que degradam AMPc (Bolger, 2003; de Oliveira, 2007). Assim, *AIP* é um novo gene envolvido na tumorigênese endócrina via AMPc

Interessante que mutações em genes envolvidos na sinalização via AMPc podem causar predisposição a um amplo espectro de tumores endócrinos e não endócrinos, como visto na síndrome de McCune Albright (Landis, 1989) e no complexo de Carney (Kirschner, 2000). Antes do nosso estudo, havia evidências do envolvimento de mutações no gene *AIP* somente com a tumorigênese hipofisária.

2 OBJETIVOS

- 1) Realizar rastreamento de mutações germinativas no gene *AIP* em pacientes com acromegalia familiar isolada.
- 2) Análise somática do gene *AIP* em tumores de pacientes com acromegalia familiar isolada.
- 3) Investigar a ocorrência de possíveis fatores modulares de fenótipo em famílias com acromegalia isolada e mutação *AIP*.

3 PACIENTES

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (Cappesq) e os pacientes assinaram Termo de Consentimento Informado para participação no projeto.

Os pacientes cujas fotos são mostradas concederam autorização por escrito para publicação das mesmas.

Um total de três famílias brasileiras com acromegalia familiar isolada (não-NEM-1 e não-CNC) foram estudadas e denominadas famílias Acro-1; Acro-2 e Acro-3 (Tabela 5). As figuras das genealogias foram incluídas em *Resultados*.

Tabela 5: Descrição clínica e genética das três famílias com acromegalia isolada

Família*	Clínica	Tumores	Genes excluídos anteriormente	Referência
Acro-1	Dois irmãos com acromegalia (diagnóstico: 24 e 29 anos). Pai (portador obrigatório) e avô-paterno com leves traços acromegálicos.	Macro-adenomas secretores de GH (somatotropinomas).	<i>MEN1</i> , <i>GNAS1</i> , <i>GNAS2</i> , <i>GHRH-R</i>	Jorge, 2001
Acro-2	Mãe e filha com acromegalia (diagnóstico: 25 e 14 anos).	Macro-adenomas secretores de GH (somatotropinomas). Posteriormente ao somatotropinoma, o caso-índice (mãe) desenvolveu carcinoma adrenocortical e linfoma não-Hodgking	<i>MEN1</i>	Luccio-Camelo, 2004
Acro-3	Tio e sobrinha com acromegalia. Pai (portador obrigatório) assintomático.	-	-	Dados não publicados

* = NEM-1 e CNC foram excluídas clinicamente nas três famílias.

Família Acro-1: Dois irmãos com acromegalia precoce (sinais/sintomas iniciais aos 17 e 21 anos de idade) seguidos há vários anos pelo grupo da Unidade de Endocrinologia Genética (HC-FMUSP) (Figuras 2 a 6).

Figura 2: Paciente-índice da família com acromegalia isolada Acro-1 (caso III.16 da genealogia – página 71)

A paciente relatava sinais e sintomas relacionados à acromegalia desde os 21 anos: cefaléia, galactorréia e crescimento progressivo de mãos e pés (Figura 2). Ao exame físico, foram notadas alterações crânio-faciais, como proeminência frontal e discreto prognatismo; observou-se alargamento da asa nasal e lábios. Foi diagnosticada laboratorialmente com acromegalia aos 24 anos. Os níveis basais de GH eram de 34 mg/L (NL = < 5 mg/L) e subiram para 64 mg/L após teste de administração via oral de glicose (GTT), mostrando resposta paradoxal. Níveis de IGF-1 não foram dosados antes da cirurgia. Exames de imagem evidenciaram uma massa hipofisária de 2120 mm³

de volume, compatível com macro-adenoma. A paciente foi submetida à craniotomia por via transfenoidal e a análise anátomo-patológica indicou se tratar de adenoma hipofisário. Imunohistoquímica não foi realizada. Após cirurgia, a paciente manteve níveis elevados de GH e IGF-1 em diversas dosagens, tendo sido indicada radioterapia convencional, com remissão parcial da doença. No acompanhamento clínico pós-radio terapia, os níveis normais de GH e IGF-1 foram normalizados com uso de análogo de somatostatina de longa ação (dados atualizados em final de 2009). A paciente é indicada como caso III-16 na genealogia apresentada em *Resultados*; página 71.

Figura 3: Irmão afetado do caso-índice da família com acromegalia isolada, Acro-1. Na genealogia da família Acro-1 é o paciente III-15

O paciente apresentou os primeiros sinais sintomas da doença (crescimento de mãos e pés e ossos da face) aos 17 anos de idade. Observam-se alterações crânio-faciais clássicas do excesso de GH e IGF-1:

proeminência frontal, prognatismo acentuado e embrutecimento da face. Apresentava macroglossia, afastamento dentário e aumento da espessura cutânea. Foi diagnosticado com acromegalia aos 29 anos de idade. Apresentava macro-adenoma hipofisário (2,5 X 1,5 X 1,1 cm) e foi submetido à craniotomia via transfenoidal. Os níveis séricos de GH e IGF-1 permaneceram elevados no seguimento pós-cirúrgico. Realizou radioterapia e teve os níveis hormonais normalizados. Atualmente, mantém seguimento clínico e apresenta remissão da doença. Na genealogia da família Acro-1 é o paciente III-15; página 71.

Figura 4: Fotos seriadas do paciente III.15 da família Acro-1 representando a evolução insidiosa da doença e progressão gradual. Nota-se que aos 13 anos de idade o paciente apresentava prognatismo inicial, que está mais acentuado aos 17 anos de idade (idade do início dos sintomas) e já constituído aos 27 anos de idade. Aos 28 anos de idade o paciente apresenta proeminência do osso frontal e embrutecimento da face. O diagnóstico de acromegalia nesse paciente foi realizado aos 29 anos de idade

Figura 5: Raio-X de crânio em incidência ântero-posterior e perfil do paciente III.15 da família Acro-1. Notam-se aumento da cavidade selar, sinais de desnivelamento do assoalho e erosão do dorso. Também são identificadas hiper-aeração dos seios frontais e prognatismo, causado pelo aumento e retificação da mandíbula

Figura 6: Pai dos pacientes da família Acro-1 (direita) e avô paterno (esquerda), apresentaram traços acromegálicos brandos

Tanto o pai e avô paterno dos pacientes afetados apresentavam prognatismo e aumento de partes moles, principalmente orelhas.

Entretanto, notamos que em ambos o quadro foi aparentemente mais brando do que o observado nos dois pacientes (filhos) com acromegalia. Segundo relatos da família, pai e avô-paterno não foram diagnosticados com a doença e aparentemente não apresentavam queixas sugestivas de tumor hipofisário, tais como cefaléia e perda visual. A mãe não apresentava qualquer sinal da doença. Interessante o fato de que aproximadamente 60% das famílias com acromegalia isolada apresentam a manifestação da doença em uma única geração (Soares, 2004). Em 2001, nosso grupo de pesquisa estudou os genes candidatos *MEN1*, *GNAS1*, *GNAS2* e *GHRH-R* nesses pacientes e não foram identificadas mutações (Jorge, 2001).

Família Acro-2: Mãe e filha com acromegalia precoce (apresentaram sinais/sintomas compatíveis com a doença aos 14 e 21 anos de idade, respectivamente) têm sido acompanhadas clinicamente pelos grupos de Neuroendócrino e do Desenvolvimento, da Disciplina de Endocrinologia (Departamento de Clínica Médica), HC-FMUSP.

O caso-índice desta família (mãe) foi diagnosticado aos 25 anos de idade com acromegalia, tendo sido a seguir submetida à cirurgia transfenoidal e radioterapia. Dados anátomo-patológicos documentaram se tratar de adenoma hipofisário sem hiperplasia. Exames bioquímicos revelaram níveis basais normais de GH (0.4 ng/ml; normal 5 ng/ml) e IGF-1 (402 ng/ml; normal 100–494 ng/ml) 13 anos após a cirurgia (38 anos de idade), indicando que a doença hipofisária havia sido controlada.

Entretanto, nessa época, a paciente apresentou um quadro de virilização e amenorréia secundária. Os níveis séricos de testosterona (538 ng/dl; normal 15–80 ng/dl) e de sulfato de dihidroepiandrosterona (DHEAS; 10.000 ng/ml; normal 350–4.300 ng/ml) encontravam-se muito elevados. A paciente realizou uma tomografia computadorizada de abdômen e uma massa adrenal pouco heterogênea de 9,0 X 8,9 cm foi identificada. Como a massa era maior que 5 cm, mas estava limitada à adrenal, possuía um estadiamento 2, de acordo com os critérios de McFarlane (McFarlane, 1958). A massa foi ressecada por meio de adrenalectomia unilateral e pesava 478 g. Ao exame de anátomo-patológico, sua classificação segundo os critérios de Weiss era grau 3. Posteriormente, a paciente foi diagnosticada com um linfoma não Hodgkin de célula B grau II. Atualmente, a paciente continua seguimento clínico e não apresenta evidências de recidiva dos tumores.

A filha desta paciente foi também diagnosticada com acromegalia, aos 14 anos de idade (valores basais: GH = 85,6 ng/ml, normal 5 ng/ml; IGF-I 830 ng/ml, normal 203–831 ng/ml). Os níveis basais de prolactina estavam na faixa normal (11.7 ng/ml, normal 2.5–14.5 ng/ml). Dosagens séricas dos esteróides adrenais (DHEA, testosterona) eram normais e a paciente não referia qualquer sinal/sintoma de virilização. Ressonância magnética de hipófise revelou macroadenoma com expansão supra-selar, associado à invasão para- e infra-selar. A estratégia cirúrgica envolveu a abordagem transcraniana via transcavernosa. As análises histo-patológica e de imunohistoquímica indicaram se tratar de um adenoma hipofisário positivo

para GH e PRL. Subseqüente rastreamento clínico e laboratorial em dois irmãos excluiu a possível ocorrência de gigantismo/acromegalia.

Em 2004, os estudos desta família envolvendo a análise do gene *MEN1*, marcadores de microssatélite para região 11q13 e estudos de LOH foram publicados (Luccio-Camelo, 2004). Os pacientes não apresentavam mutação no gene *MEN1*, entretanto compartilhavam o mesmo haplótipo de marcadores polimórficos localizados na região 11q13.1 e 11q13.3 (Luccio-Camelo, 2004). 11q13-LOH foi reportada no somatotropinoma e no tumor adrenocortical.

Família Acro-3: Sobrinha e tio apresentando acromegalia devido a tumor hipofisário secretor de GH foram documentadas e seguidas no Serviço de Endocrinologia da FM-USP de Ribeirão Preto. Os pacientes (N=2) não apresentam outras manifestações clínicas associadas à NEM-1 ou ao CNC. Trata-se de uma nova família com acromegalia isolada, ainda não reportada na literatura.

4 TUMORES

Tumores hipofisários e não-hipofisários dos pacientes da família com acromegalia isolada Acro-2 encontravam-se disponíveis para o estudo: somatotropinoma, carcinoma do córtex da adrenal e linfoma não-Hodgkin. Não tivemos acesso aos tumores dos pacientes das demais famílias.

5 MÉTODOS

5.1 Extração de DNA

A extração de DNA do sangue periférico, de raspado oral e dos tumores foi realizada por meio das técnicas já padronizadas: *salting-out* (Miller, 1988), técnica forense Chelex¹⁰⁰ (Walsh, 1991) e extração por fenol:clorofórmio (Sambrook & MacCallum, 2001), respectivamente.

5.2 Rastreamento de mutações

As análises de mutações/variantes foram realizadas via seqüenciamento automático dos produtos de PCR utilizando tecnologia fluorescente (Big Dye Terminator v3.1, Applied Biosystems, USA) e seqüenciador automático ABI 3130/xl de 16 capilares (Applied Biosystems). As fitas *forward* e *reverse* foram analisadas em todos os casos (vide tabelas de *primers* 6, 7 e 8). Os eletroferogramas foram lidos manualmente com auxílio de *software* especializado. Todos os experimentos e análises foram confirmados pelo menos duas vezes.

5.3 Análises de microssatélites

As análises de perda de LOH foram realizadas por dois métodos: seqüenciamento automático de uma região intragênica polimórfica (região da mutação) e genotipagem por microssatélites flanqueadores do gene *AIP* D11S2072 e D11S1258F (11q13.3) (Tabela 6). Os genótipos dos marcadores foram analisados em sangue e nos tumores. A ausência/diminuição do sinal no tumor de algum alelo encontrado no sangue foi considerada compatível com perda somática do alelo normal do gene *AIP* (LOH).

5.4 Análises de possíveis moduladores genéticos de fenótipo

Para entendermos melhor os motivos da ampla variabilidade fenotípica observada em famílias com FIPA com mutação *AIP*, foi testada a hipótese de que outros genes e *loci* anteriormente associados à tumorigênese hipofisária poderiam exercer “efeito protetor” ou “efeito promotor” da tumorigênese nesses casos. Assim, selecionamos e analisamos marcadores de microssatélites flanqueadores de diversos genes/*loci* candidatos. Pela proximidade dos marcadores aos genes candidatos, é assumido que os alelos desses microssatélites estariam segregando com o possível alelo protetor/promotor da tumorigênese. Para análise de segregação, foram genotipados os familiares portadores de mutação *AIP* que desenvolveram a doença e os portadores de mutação *AIP* que não desenvolveram a doença.

Caso o mesmo haplótipo fosse encontrado entre os familiares clinicamente afetados e assintomáticos, esse *locus*/gene possuiria baixa probabilidade de exercer papel modulador. A existência de haplótipos presentes em portadores clinicamente afetados e ausentes em familiares assintomáticos poderia indicar envolvimento de um gene localizado nesse *locus* na tumorigênese hipofisária dos casos com mutação *AIP*. Para essas análises só foram incluídos pacientes adultos para evitar viés da idade.

Primers

Os *primers* utilizados para amplificação dos 6 éxons codificadores do gene *AIP* foram os descritos por Vierimaa *et al.*, 2006. Outros genes selecionados como possíveis fatores moduladores de fenótipo também foram aqui analisados (Tabela 7). Os *primers* para amplificação dos 11 éxons do gene *AHR* foram desenhados com auxílio do software *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e estão listados na tabela 8. Os *primers* para a análise dos genes *SSTR2* e *SSTR5*; *p27Kip1* e *PRKAR1A* foram descritos por Filopanti *et al.*, (2005), Pellegata *et al.*, (2006) e Kirschner *et al.*, (2000). As reações de PCR foram otimizadas com uso de um programa de gradiente de temperatura de hibridação.

Tabela 6: *Primers* utilizados para análise de 11q13.3-LOH

D11S2072 F*	ATGGCTTCTGTTAAAAAATAAAG
D11S2072 R	TCTCAGTGTTACATTATAAGTGA
D11S1258F*	AGTACAGAACTCAACTCCAAGAGA
D11S1258R	GTGGACTGTGATGTAGGTTATGGCTGAGAG

* = marcados com fluoróforo na extremidade 5'

(5' → 3')

Tabela 7: *Primers* para amplificação de marcadores de microssatélites utilizados para análise de moduladores de fenótipo em famílias com acromegalia isolada

Gene(s)	Marcador	Locus	<i>primer forward*</i>	<i>primer reverse</i>
Cromossomo 2 2p16-21 (CNC-2) Oncogene desconhecido	D2S165	2p23.2	AACTTCTACCTTGGCTGTGG	TTCAACGCCTTTGAGATTGT
	D2S367	2p22.3	TTCTTTGGTCTAAGGGTCAC	AGCTTCTTGTTACAGGTGT
	D2S2259	2p21	CAGCCTGTTTGGGGACAC	GCAGAGCCATCGCCTTC
	D2S391	2p21	ATGGAGCCAGTAGGTTACAGC	GGTGAGAGGGTATGATGGAA
	D2S337	2p15	GTCTGCATTCCCACGA	TGCTCCTGGCTTATTTCA
	D2S2368	2p14	GTATTTGAATCTTAAAGCATCTTC	CGACCATAGCCTGGTG
	D2S286	2p13.1	TTAAAATTGTTTCTATGACATGATG	TGGTGGTTTATCTTACCAGTC
	D2S2333	2p11.2	AGAAACCATGCCCTTG	TGCAGTCACCTGTGTAGAA
	D2S2216	2p11.2	GGGGTAAATTATTTCCAGCC	TCCCTGACAAAGTGGGC
	D2S160	2q13	TGTACCTAAGCCCACCCTTTAGAGC	TGGCCTCCAGAAACCTCCAA
	D2S347	2q14.3	CCTACCAGAACACATGCAGA	ATATCTCCTGAACTGAGCCC
	D2S112	2q21.2	GAGTGGCGGTGAGAAGGTAT	AGCCATTGCTATCTTTGAGG
	D2S151	2q22.3	AACTAAGACACACAACCCCG	CCAATTGAGTGGCATCTATG
	D2S142	2q24.1	TGGAGACACTGAACGGGTAG	TGAAAAGTTTTGAGATGGAGAGATT

Continua...

Gene(s)	Marcador	Locus	primer forward*	primer reverse
Cromossomo 5 (<i>PTTG</i> e <i>PROP1</i>)	D5S410	5q33.2	TTCTGCTAGTTTATCCCACTG	TCATGCCACACATTGTTT
	D5S422	5q34	TTAATTGATCTGGGCTGGAGAACC	CAGAGCAAGGTCCTGTCTGAAAAT
	D5S400	5q35.1	GCCTGGCTGATAGAATGAGA	TTCTAATTTGCTGGCTTCC
Cromossomo 13 (<i>RB1</i>)	D13S171	13q13.1	CCTACCATTGACACTCTCAG	TAGGGCCATCCATTCT
	D13S218	13q13.1	GATTTGAAAATGAGCAGTCC	GTCGGGCACTACGTTTATCT
	D13S263	13q14.11	CCTGGCCTGTAGTTTTTATTGTTA	CCCAGTCTTGGGTATGTTTTTA
	D13S153	13q14.2	AGCATTGTTTCATGTTGGTG	CAGCAGTGAAGGTCTAAGCC
Cromossomo 14 (<i>MEG3</i>)	D14S65	14q32.2	GCTCCACCCCCTAAAGATCC	TACACCCTGTGGAAAGGCTG
	D14S985	14q32.2	CAGTGTGACCTTAAACAAGTCG	CCTGTGGGGTAGATACACGA
	D14S292	14q32.33	CTGTGTGGTGCATCAATG	CATGAAGGCAGCCTCA
Cromossomo 17 (<i>PRKAR1A</i>)	D17S944	17q23.3	GCCCAGGAGGTTGAGACTT	CCTTCCATAGGAACGGCT
	D17S949	17q24.3	ATAGAACTCCACATTTGCATTA	CTTTCCCACNCGTGTC
	D17S785	17q25.1	ATCCCTGGAGAGTGAAAATG	AAGGCCAACCTGAAAATAA

* = Oligos marcados com fluoróforo
(5' → 3')

Tabela 8: *Primers* utilizados para análise do gene *AHR*

Exon	<i>Primer forward</i>	<i>Primer reverse</i>
1	AGTGGTCCCAGCCTACACC	GGACCTAATCCCAGGATCG
2	GATGTGAAAGGAAGATTTTAGAAAGA	ATCTGGCTTTGCCACTGAAA
3	CCAGTGGATGCCAGTATTTCA	CGCAGTTCAGATGAAAGTGG
4	TGTTTTGGCTGTGTTTGTGAA	ACAAATGGCCAACTGTGTCC
5	ACCACTAGCAAGCACCCACT	CTACAGGTTCCCAGCCTCCT
6	TCAGAACACAGACTCCAGTTTAGAA	GGTTGCCTGATTTGGGAATA
7	CAGCCATAATGGAGCCTTTT	GGCTACACTGGAAGAATGTACG
8	TGCAGAACTAGCGTAAAACCA	ATGCCGTTTTCTTCTGACAT
9	TTGATTTGGGGGTTTGATAA	TGCTTGAATTATTTTTATGCTTTCA
10A	CAATGTATTTTGCTTTATGTTTTTCTT	GGTGATGTTGCTGTTGCTGT
10B	TTAACGGATGAAATCCTGACG	TGCTGTCTCCATGAATGCTG
11	TGAAGTTTACAACCTCTCAGGGGTA	CATCAATGCCTCCATGTGAA

(5' → 3')

5.5 Análise de expressão gênica

Um fragmento dos tecidos tumorais conservado em nitrogênio líquido foi utilizado para extração de RNA total, por meio do método Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A qualidade do RNA foi verificada através da visualização das bandas de RNA ribossômicos 18S e 28S em eletroforese em gel de agarose 1,5% e por análise da relação de absorbância $A_{260/280}$ (>1.8). O RNA total foi quantificado em aparelho espectrofotômetro e usado para síntese de moléculas de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa, com uso do kit comercial *High- capacity*

(Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA). As amostras de cDNA foram usadas na análise de expressão do gene *AIP*, por meio da técnica de PCR quantitativa (qPCR).

Para as análises de qPCR, foram utilizados o kit TaqMan (Applied Biosystems). A especificidade da amplificação dos kits Taqman é garantida por conterem *primers* localizados na região terminal de um éxon e na região inicial do éxon seguinte, além de sonda inter-exônica específicas para o gene alvo, evitando amplificação de gene inespecífico e de DNA genômico. A sonda inter-exônica é marcada com um fluoróforo em sua extremidade 5' e com uma molécula capaz de absorver essa fluorescência (*quencher*) na extremidade 3'. Pela proximidade entre o fluoróforo e o *quencher* da sonda, antes da reação de PCR, há pouca fluorescência liberada no sistema. Entretanto, à medida que a amplificação gênica ocorre, a sonda é digerida pela atividade exonuclease 5' → 3' da *Taq Polimerase* presente no kit e a fluorescência é então liberada no sistema e captada pela câmera CCD do equipamento (ABI 7000 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems). Kits com sondas marcadas com diferentes fluoróforos foram utilizados, Hs00610222_m1 para *AIP* e 43263 para β -actina (gene endógeno de escolha para adrenal). Assim, foi possível mensurar a quantidade de fluorescência liberada referente ao gene endógeno (β -actina, com marcação VIC) e ao gene alvo (*AIP*, com marcação FAM).

Um protocolo de termo-ciclagem proposto pelo fabricante foi utilizado: 95° C por 10 min, seguidos de 45 ciclos de 95° C por 15 s e 60° C por 10 min. À medida que os ciclos da reação de PCR vão ocorrendo, podemos traçar

uma curva sigmóide de amplificação que é constituída por quatro fases: fase linear (pré-amplificação); fase exponencial inicial (início da amplificação); fase exponencial (fase Log na qual a quantidade de produto de PCR dobra a cada ciclo) e platô (sem amplificação gênica por saturação dos reagentes). Durante essa reação, há um momento no qual a fluorescência liberada no sistema pelas sondas é maior que o ruído (*background*), que é chamado de *threshold*, C_T ou limiar de detecção de fluorescência.

A expressão relativa do gene alvo no tumor foi analisada pelo método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001), conforme detalhado a seguir. Os valores do C_T do gene *AIP* e da *β -actina* foram obtidos das amostras tumorais e de amostras comerciais de 61 adrenais controles (*pool Human Adrenal Gland Total RNA, Clontech, Palo Alto, CA, USA*). Posteriormente, dividi-se o valor do C_T obtido para o *AIP* pelo valor do C_T obtido para o *β -actina*, e se obtém um número chamado de ΔCT . Dividem-se os valores de ΔCT do tumor pelo valor de ΔCT do *pool* e se obtém o valor de $\Delta\Delta CT$. O valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ indicará quantas vezes o gene alvo está expresso em relação ao endógeno: $2^{-\Delta\Delta CT} = < 0.5$ indica hipo-expressão; $2^{-\Delta\Delta CT} = 0.5$ a $1.5/2.0$ indica normo-expressão e um $2^{-\Delta\Delta CT} = > 1.5/2.0$ indica hiper-expressão do gene alvo no tumor analisado.

Por meio de reações que utilizaram concentrações de cDNA progressivamente maiores, observamos que as eficiências de amplificação do gene *AIP* e *β -actina* eram similares (inclinação da reta $< 0,1$), validando nossos resultados usando o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$. As análises de expressão foram realizadas em triplicata e confirmadas em outros experimentos.

5.6 Análise da expressão proteica

A análise de expressão da proteína AIP foi realizada por meio de imunohistoquímica, em colaboração com a Unidade de Patologia Hepática do HC-FMUSP (LIM-14, HC-FMUSP).

O blocos de parafina dos tumores e de tecidos controles obtidos durante autópsias (hipófises, adrenais e amígdalas) foram cortados em secções de 3 µm de espessura. As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e incubadas em tampão citrato 10 mM, pH 6.0, por 40 min a 95° C. Após lavagens, as lâminas foram incubadas por 12 hs com o anticorpo primário para AIP (clone 35-2, Novus Biologicals, Littleton, CO) e o sistema streptavidina-biotina-peroxidase. A reação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) a 60 mg em tampão PBS pH 7.4 por 5 min a 37 °C, seguido por lavagens em tampão PBS pH 7.4.

6 RESULTADOS

6.1 Análise de mutação *AIP* em famílias brasileiras com acromegalia isolada

Família Acro-1:

Inicialmente, analisamos uma das duas famílias com acromegalia isolada acompanhadas na Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP. Trata-se de dois irmãos acromegálicos (sexo feminino e masculino) que desenvolveram sintomas da doença aos 21 e 17 anos, respectivamente.

Após amplificação da região codificadora do gene *AIP* via PCR e seqüenciamento direto, encontramos a alteração c.804C>A (no éxon 6) que codifica um sinal de parada precoce no códon 268 (*nonsense*), mutação Y268X (Figura 7).

Figura 7: Eletroferograma mostrando a mutação germinativa Y268X localizada no éxon 6 do gene *AIP* de pacientes da família Acro-1

A região carboxi-terminal da proteína *AIP*, deletada devido à mutação Y268X, compreende um domínio conservado evolutivamente e importante para sua interação com as proteínas AHR e SHP90 (domínio TRP, *tetratricopeptide repeat domain*). Dessa forma, a mutação Y268X provavelmente inativa o complexo AIP-AHR-SHP90 (Meyer, 2000). A mutação encontrada nos pacientes não foi identificada em 92 indivíduos normais (184 alelos) analisados.

Além dos dois irmãos com acromegalia, outros 16 familiares sob-risco de terem herdado a mutação foram convidados a participar do estudo. A mutação Y268X foi identificada em dois novos casos: um irmão assintomático e seu filho (3 anos) (Figura 8). O irmão assintomático tinha 41 anos de idade e concordou em realizar exames bioquímicos e de imagem.

Ele apresentava dosagens hormonais basais e pós-estímulo normais (GH, IGF-1, LH, FSH, TSH). Entretanto, ao ser submetido a exame de ressonância magnética, foi identificada uma imagem hipofisária de 3 mm, compatível com um micro-adenoma hipofisário não-secretor. Nenhuma análise bioquímica ou de exame de imagem foi realizada na criança. Além desses 4 casos nos quais identificamos a mutação, o pai e o avô paterno, que apresentavam traços acromegálicos, provavelmente também eram portadores da mutação. Nenhum tumor dessa família encontrava-se disponível para o estudo de LOH.

Figura 8: Genealogia da família Acro-1 mostrando aspectos clínicos e genéticos desses pacientes. Ao total, 18 familiares foram rastreados: quatro apresentavam a mutação, um era portador obrigatório (pai) e outro indivíduo (avô paterno) é suspeito de também carrear a mutação. Legenda da figura: metade esquerda preta significa mutação *A/P*; metade direita preta significa acromegalia ou traços acromegálicos

Família Acro-2:

Por meio de um estudo colaborativo, tivemos acesso a amostras de uma segunda família brasileira com acromegalia isolada seguida no HC-FMUSP (família Acro-2). Esta família já havia sido descrita anteriormente (Luccio-Camelo, 2004). Trata-se de mãe e filha com acromegalia devido à somatotropinoma de desenvolvimento precoce (25 e 14 anos de idade, respectivamente; Figura 9A). A análise de seqüenciamento indicou que ambas as pacientes apresentam a alteração c.241C>T no éxon 2, que insere um sinal de parada da transcrição no códon 81, R81X (Figura 9B). Em 2008, a mutação R81X foi descrita em uma família FIPA americana com tumores secretores de GH e GH/PRL (Leontiou, 2008).

Assim como ocorre na mutação Y268X, a mutação R81X leva à perda do domínio TRP, causando provavelmente mudança significativa da função da proteína AIP via interação com AHR. Além da perda da interação com AHR, estudos *in vitro* indicaram que a proteína mutante AIP-R81X perde a interação com a fosfodiesterase PDE4A5, podendo assim desregular a sinalização intracelular de AMPc (Leontiou, 2008).

A **B**

Figura 9: Mutação R81X no éxon 2 do gene *AIP* identificada na família Acro-2. Essa mutação prediz uma proteína com 249 amino ácidos a menos em relação à proteína *AIP* não-mutada. Estudos *in vitro* mostraram que R81X perde interação com PDE4A5 (Leountiou, 2008).

Análises de seqüenciamento automático dos tumores da hipófise e da adrenal dos pacientes da família Acro-2 revelaram perda completa do alelo normal “C”, enquanto que as análises de microssatélites flanqueadores do gene *AIP* demonstraram manutenção de heterozigose no linfoma (Figuras 10, 11, 12). As análises de expressão protéica de AIP nos tumores por imunohistoquímica foram compatíveis com o estudo molecular: os tumores com LOH (somatotropinoma e carcinoma adrenocortical) apresentaram evidente diminuição da expressão de AIP em comparação com os tecidos normais, enquanto o material do linfoma apresentava expressão similar ao controle (Figuras 10, 11, 12). A análise de expressão gênica de *AIP* foi realizada no tumor adrenocortical, que apresentou baixa expressão ($2^{-\Delta\Delta CT} = 0.4$) em relação ao *pool* de adrenais e hipófises controles.

Figura 10: **A** - Imagem sagital de ressonância magnética mostrando o macroadenoma hipofisário da paciente II.1 da família Acro-2 com mutação AIP-R81X. **B** - Análise de LOH por meio de seqüenciamento automático revelou perda do alelo normal “C”, evidenciando LOH no somatotropinoma. **C** - Imunohistoquímica do somatotropinoma com R81X-LOH apresenta diminuição de expressão proteica em comparação com o controle (hipófise normal - autópsia) e com um somatotropinoma advindo de caso com acromegalia esporádica sem mutação AIP

Figura 11: **A-** Ressonância magnética mostrando massa pouco heterogênea medindo 9.0 x 8.9 cm localizada na adrenal direita da paciente I.1 da família Acro-2, com mutação *AIP*-R81X. Análise histológica do tumor revelou classificação compatível com carcinoma do córtex da adrenal (Weiss 3). **B-** Análise de LOH por meio de seqüenciamento automático revelou perda do alelo normal “C”. **C-** Análise de expressão gênica indicou baixa expressão de AIP no tumor adrenocortical (barra à direita), em comparação com pool de hipófises (barra à esquerda) e adrenais controles (barra do meio). **D-** Imunohistoquímica mostrou perda completa da expressão de AIP no tumor

Figura 12: Observa-se que os dois alelos do marcador polimórfico D11S1258 amplificados no DNA germinativo estavam presentes no DNA do linfoma, indicando que ao contrário do observado no somatotropinoma e carcinoma adrenocortical, o alelo normal do gene *AIP* não foi perdido no tumor. O linfoma apresentava expressão da proteína AIP em quantidade similar à encontrada no tecido linfóide controle (amígdala).

Família Acro-3:

Uma terceira família com acromegalia isolada (família Acro-3) também foi estudada, entretanto não apresentava mutação *AIP* detectável por seqüenciamento automático (Figura 13). Não podemos afastar uma grande deleção do gene *AIP* nesses casos, pois não foram realizadas análises de quantificação gênica (número de cópias), como MLPA ou RT-PCR.

Analizamos as amostras dos pacientes da família Acro-3 para um segundo gene recentemente associado à “acromegalia familiar”, *p27Kip1* (Pellegata, 2006) e também não foram localizadas mutações.

Figura 13: Genealogia família Acro-3. Um tio e uma sobrinha com acromegalia isolada. Ao contrário das outras duas famílias analisadas (Acro-1 e Acro-2), os pacientes desta família não apresentavam mutação no gene *AIP*. Mutações no gene *p27Kip1* também foram excluídas nessa família

6.2 Análise de fatores moduladores de fenótipo na família Acro-1, com acromegalia isolada, mutação no gene *AIP* e variabilidade fenotípica

Dentre as famílias FIPA com mutação *AIP*, se observa que pacientes portadores da mesma mutação podem apresentar grande variabilidade fenotípica (Vierimaa, 2006; Daly, 2007; Toledo, 2007; Naves, 2007; Leountiou, 2008).

Um bom exemplo da expressão fenotípica diferencial entre portadores de mutação *AIP* pode ser o da família Acro-1: dos três irmãos com a mutação Y268X, dois apresentavam acromegalia de surgimento precoce (17 e 21 anos) e macro-adenomas invasivos, enquanto o outro irmão permanecia assintomático aos 41 anos de idade e apresentava apenas uma imagem suspeita de micro-adenoma hipofisário silencioso, de 3 mm. As causas da variabilidade fenotípica observadas nas famílias FIPA são desconhecidas.

Levantamos a hipótese que modulador(es) do fenótipo localizados fora do *locus* 11q13 poderiam estar envolvidos e poderiam “proteger” um paciente com mutação *AIP* de desenvolver tumor hipofisário ou, pelo contrário, “desencadear a tumorigênese” hipofisária:

$$AIP^{mut} = \text{predisposição genética}$$

$$AIP^{mut} + \text{modulador de fenótipo} = \text{tumor hipofisário}$$

Para testarmos nossa hipótese, selecionamos alguns genes que poderiam agir como possíveis moduladores de fenótipo. Inicialmente, os genes selecionados e estudados foram os que codificam os receptores de

somatostatina tipo 2 (*SSTR2*) e tipo 5 (*SSTR5*), que medeiam a ação inibitória da secreção de GH pela somatostatina (Lamberts, 1991). Recentemente, variantes desses genes foram associadas a valores elevados de GH e IGF-1 em casos com acromegalia esporádica (Filopanti, 2005).

Não foram identificadas mutações nos genes *SSTR2* e *SSTR5* na família Acro-1 e não pudemos observar polimorfismos que co-segregassem com a doença na família (Figura 14) (Toledo, 2007). Assim, é pouco provável que esses genes ajam como moduladores de fenótipo. Este foi o primeiro e aparentemente único estudo desses genes em casos com acromegalia familiar isolada reportado até aqui.

Figura 14: Os genes *SSTR2* e *SSTR5* foram seqüenciados na família Acro-1 para investigação de possível papel modulador de fenótipo. Não foi identificada variante que co-segregasse com a doença nos dois irmãos com acromegalia precoce e que não estivesse presente no terceiro irmão também portador da mutação, mas assintomático. A seta indica o polimorfismo rs169068 (P335L, c/t 1004) no gene *SSTR5*, recentemente associado a níveis séricos de GH e IGF-1 mais elevados em casos com acromegalia esporádica (Filopanti, 2005)

Continuando nosso estudo, selecionamos outros genes como possíveis moduladores de fenótipo nos irmãos da família Acro-1: *CDKN1B*, *AHR*, *PRKAR1A*, *PTTG*, *PROP1*, *MEG3* e *RB1*. Os genes *CDKN1B*, *AHR* e *PRKAR1A* foram seqüenciados, enquanto o possível papel dos genes *PTTG*, *PROP1*, *MEG3* e *RB1* foi verificado por meio de genotipagem de marcadores de microssatélites flanqueadores e de análise de segregação. Esses genes foram escolhidos devido à descrição prévia do envolvimento com a tumorigênese hipofisária. Além desses genes, a região 2p16, identificada como um possível segundo *locus* tanto do complexo de Carney-2 (Stratakis, 1996) quanto da acromegalia familiar isolada (Gadelha, 2000), também foi estudada na família Acro-1. Informações de cada um dos genes estudados e de seu papel na tumorigênese hipofisária são descritas na Tabela 9.

Nossos estudos mostraram que os genes *CDKN1B*, *AHR* e *PRKAR1A* não apresentavam mutações nem variantes polimórficas que segregavam com a doença nos três irmãos. Também foi verificado que os dois irmãos acromegálicos não compartilhavam haplótipos dos marcadores localizados nos *loci* dos genes *PTTG*, *PROP1*, *MEG3* e *RB1* (Tabela 9). Dessa forma, foi possível identificar evidências compatíveis com o não envolvimento desses genes como moduladores do fenótipo na família Acro-1.

Já os resultados dos marcadores da região 2p16 foram mais promissores e pudemos identificar dois marcadores consecutivos localizados na região 2p16 (D2S337 e D2S391) que co-segregaram com a clínica de acromegalia (Figura 15 e Tabela 9). A não exclusão dessa região sugere que a mutação AIP-Y268X causaria predisposição genética ao tumor hipofisário e que somente quando houvesse a presença de fatores genéticos localizados em 2p16, ocorreria a progressão tumoral e o desenvolvimento da doença

hipofisária. Também observamos na família Acro-2 que mãe e filha apresentavam mesmo haplótipo dos marcadores localizados em 2p16 (D2S337 e D2S391).

Apesar de interessantes e originais, há possibilidade de que esses achados tenham ocorrido ao acaso, devido ao pequeno número de pacientes analisados. Portanto, precisaremos confirmar o envolvimento de 2p16 na penetrância da doença em um número maior de pacientes com mutação *AIP* (consequimos fazê-lo, vide *Discussão* a respeito).

Continua...

Figura 15: Resultados de análise de marcadores de microssatélites consecutivos D2S2368, D2S337, D2S391 e D2S2259, localizados na região 2p16-21. Observa-se que os marcadores mais à 5' (D2S2368) e à 3' (D2S2259) não apresentam alelos co-segregando com a doença, enquanto os marcadores internos D2S391 e D2S337 apresentam alelos que co-segregam com o a progressão tumoral e desenvolvimento da acromegalia, tracejado

Tabela 9: Resultados da análise de possíveis moduladores de fenótipo na família Acro-1 com 3 irmãos com mutação *AIP* Y268X: 2 deles com acromegalia precoce e o outro assintomático aos 41 anos de idade

Gene	Locus	Proteína	Envolvimento na tumorigênese hipofisária	Resultados (presente estudo)
<i>CDKN1B</i>	12p13	p27 ^{Kip1}	Camundongo K.O. desenvolve tumor hipofisário (1). Mutações germinativas associadas ao fenótipo NEM-1-like (NEM4), incluindo acromegalia familiar (2).	ausência de mutação ou co-segregação
<i>AHR</i>	7p15	AHR	Interage com AIP no citoplasma (3). Controla expressão de <i>p27Kip1</i> (4). Baixa expressão em tumores hipofisários possivelmente associada com agressividade de somatotropinomas (5)	ausência de mutação ou co-segregação
<i>PRKAR1A</i>	17q23	PKA	Supressor de tumor associado a CNC-1, que apresenta somatotropinomas em 10-20% dos casos (6).	ausência de mutação ou co-segregação
<i>PTTG</i>	5q35	PTTG	Oncogene com atividade transformadora <i>in vitro</i> e tumorigênica <i>in vivo</i> . Expresso em tumores hipofisários e pouco expresso em hipófises normais (7).	ausência de mutação ou co-segregação
<i>PROP1</i>		PROP1	Inativação causa deficiência hipofisária múltipla (8).	ausência de co-segregação
<i>MEG3</i>	14q32	MEG3	Novo gene supressor de tumor com interação com via do AMPc. Suspeito de estar envolvido na tumorigênese hipofisária (9).	ausência de co-segregação
<i>RB1</i>	13q14	Rb	Camundongo K.O. desenvolve tumor hipofisário (10). <i>Locus</i> associado com comportamento invasivo de tumor hipofisário (11).	ausência de co-segregação
?	2p16	?	Locus do complexo de Carney 2 (CNC-2) (12) Amplificado em tumor hipofisário de pacientes com CNC-2 (12). Locus associado à acromegalia familiar (13).	co-segregação com a doença / acromegalia em família com mutação <i>AIP</i> Y268X (presente estudo)

Referências da tabela: 1) Fero, 1996; 2) Pellegata, 2006; 3) Carver, 1995; 4) Kolluri, 1999; 5) Jaffrain-Rea, 2009; 6) Kirschner, 2000; 7) Pei & Melmed, 1997; 8) Wu, 1998; 9) Zhang, 2003; 10) Hu, 1994; 11) Pei, 1995; 12) Matyakhina, 2003; 13) Gadelha, 2000.

7 DISCUSSÃO

Os primeiros relatos de pacientes com acromegalia familiar isolada ocorreram há mais de 100 anos (Schwoner, 1897; Fraenkel, 1901). À medida que o número de famílias identificadas foi aumentando, pôde-se estabelecer claramente a IFS como patologia distinta à NEM-1 e ao complexo de Carney.

Em 1993, estudos genéticos sugeriram a existência de um gene supressor de tumor localizado no *locus* da NEM-1 (11q13) envolvido na tumorigênese de somatotropinomas esporádicos e associados à NEM-1 (Thakker, 2003). Em 1997 e 1999, somatotropinomas de pacientes com IFS foram estudados para esse *locus* e se demonstrou que, assim como os somatotropinomas esporádicos e associados à NEM-1, os somatotropinomas associados à IFS também apresentavam 11q13-LOH (Yamada, 1997; Gadelha, 1999). Concomitante a essas descobertas, o gene responsável pela NEM-1, *MEN1* (11q13), foi clonado e foram relatadas mutações em diversas famílias com o fenótipo clássico da NEM-1: tumores em paratireóide, pâncreas endócrino e hipófise (Chandrasekharappa, 1997). Em outro estudo, se mostrou que uma grande família com hiperparatireoidismo isolado (OMIM 145000) também apresentava mutação no gene *MEN1* e 11q13-LOH nos tumores (Teh, 1998), revelando que famílias com mutação *MEN1* poderiam apresentar variantes fenotípicas nas quais somente um tumor NEM-1-associado se desenvolvia. Esse poderia também ser esse o caso da IFS.

Assim, entre 1998-2004 vários estudos analisaram o gene *MEN1* em famílias com acromegalia isolada, entretanto não foram identificadas mutações (Teh, 1998; Jorge, 2001; De Menis, 2002; Luccio-Camelo, 2004; Soares, 2005). Em 2000 e 2004 foram publicados trabalhos que indicaram que famílias com acromegalia isolada sem mutação no gene *MEN1* apresentavam ligação positiva para região 11q13.1-11q13.3 (Gadelha, 2000; Luccio-Camelo, 2004). Esses estudos delinearam que um gene supressor de tumor na região 11q13.1-11q13.3 (não *MEN1*) era responsável pela acromegalia familiar isolada. Assim, se caracterizou que além de clinicamente distinta, a acromegalia familiar isolada era também geneticamente distinta da NEM-1. Em 2005, novos estudos conseguiram diminuir a área da região candidata para 11q13.3; entretanto essa região era rica em genes, o que dificultou a identificação do gene responsável pela IFS por seleção de potenciais candidatos (Soares, 2005).

Em 2006, um grupo finlandês com ampla experiência em medicina molecular, com mais de 190 artigos científicos publicados na área, entre eles a identificação do gene *SMAD4* localizado no *locus* 18q21.1 e responsável pela polipose juvenil familiar (OMIM 174900; Howe, 1998); do gene *LKB1* localizado no *locus* 19p13.3 e responsável pela síndrome Peutz-Jeghers (OMIM 602216; Hemminki, 1998); o gene *HLRCC* localizado no *locus* 1q e responsável por câncer renal familiar (OMIM 605839; Launonen, 2001) e o gene *FH* localizado no *locus* 1q42.1 e também responsável por câncer renal familiar (OMIM 136850; Tomlinson, 2002). Esse grupo usou sua grande experiência na identificação de genes responsáveis por doenças hereditárias

para estudar uma grande família FIPA com 11 parentes afetados. Foram combinadas análises de ligação por *kits* de polimorfismos e análises de expressão gênica que resultaram na identificação do gene *AIP* (Vierimaa, 2006).

7.1 Mutações *AIP* em famílias brasileiras com acromegalia isolada

Nesse contexto, iniciamos o estudo de uma família com acromegalia isolada que nosso grupo havia descrito anteriormente como negativa para os genes *MEN1*, *GHRH-R*, *GNAS1* e *GNAS2* (Jorge, 2001) e identificamos uma mutação inativadora clássica, com inserção de um sinal de parada transcricional precoce levando a uma proteína *AIP* truncada, Y268X. Essa mutação prediz a síntese de uma proteína sem a região N-terminal, região esta que é conservada entre várias espécies e é responsável pela interação com AHR. Esse estudo foi publicado em Maio de 2007 no JCEM (Toledo, 2007), em um fascículo com mais dois trabalhos que haviam rastreado mutações *AIP* em famílias com tumores hipofisários isolados (Daly, 2007) e em casos com tumor hipofisário esporádicos (Barlier, 2007); artigos comentados em *Editorial* do JCEM por Melmed 2007.

Nosso trabalho (Toledo, 2007) e o de Daly *et al.*, (2007) confirmaram os achados de Vierimaa *et al.*, (2006) demonstrando o envolvimento de *AIP* como o primeiro gene associado à FIPA e à acromegalia familiar isolada.

Nesse primeiro estudo da tese, também relatamos o primeiro caso portador de mutação *AIP* com tumor hipofisário não-funcionante, indicando que o espectro fenotípico associado às mutações *AIP* poderia ser além de acromegalia e prolactinoma (Toledo, 2007). Apesar de não termos acesso aos tumores dos pacientes para estudo de LOH, a identificação de uma mutação inativadora clássica (*nonsense*, Y268X) reforça o possível papel supressor de tumor de *AIP*.

7.2 Moduladores de fenótipo em famílias com mutação *AIP*

Outro ponto importante de observação em nosso estudo foi a identificação de um parente assintomático portador de mutação *AIP*. Propusemos a seguinte hipótese para explicar nossos achados:

$$AIP^{mut} = \text{predisposição genética}$$

$$AIP^{mut} + \text{modulador de fenótipo} = \text{tumor hipofisário}$$

Assim, buscamos entender melhor quais poderiam ser os moduladores de fenótipo que explicariam a variabilidade fenotípica entre os portadores de mutação *AIP*. Para isso, selecionamos e seqüenciamos dois genes candidatos a estarem modulando o fenótipo dos três irmãos com a mutação Y268X (dois com acromegalia precoce e o terceiro assintomático aos 41 anos de idade). Não foi identificada mutação nos genes *SSTR2* e

SSTR5, assim como não foi localizada variante que co-segregasse com a doença. Nossos resultados, que correspondem às primeiras investigações de moduladores de fenótipo em famílias com mutação *AIP*, sugerem que *SSTR2* e *SSTR5* não exercem influência sobre a apresentação fenotípica da família Acro-1 (Toledo, 2007).

Seguindo nossa investigação de moduladores genéticos de fenótipo, selecionamos e estudamos mais uma série de genes e *loci* anteriormente associados à tumorigênese hipofisária. Alguns genes foram seqüenciados enquanto outros foram analisados por segregação de microssatélites flanqueadores. Não identificamos evidências de segregação de variantes dos genes *CDKN1B/p27Kip1*, *AHR*, *PRKAR1A*, *PTTG*, *PROP1*, *MEG3* e *RB1* com o desenvolvimento da acromegalia nos portadores de mutação da família Acro-1. Nossos dados sugerem que esses genes não exercem função de proteção ou progressão da tumorigênese hipofisária nesses casos com mutação *AIP*.

Entretanto, os marcadores consecutivos D2S337 e D2S391 apresentavam alelos que eram compartilhados entre os dois irmãos clinicamente afetados e não estavam presentes no irmão assintomático. A ocorrência de co-segregação de marcadores localizados em 2p16 com a doença sugere que esse *locus* pode conter gene(s) associados à FIPA:

$$AIP^{mut} = \text{predisposição a tumor hipofisário}$$

$$AIP^{mut} + \underline{2p16} = \text{tumor hipofisário}$$

Selecionamos para estudo o *locus* 2p16 pois ele havia sido associado com o complexo de Carney-2 (CNC-2; Stratakis, 1996; Matyakhina, 2003) e

com a acromegalia familiar isolada (Gadellha, 2000), antes da identificação de mutações no gene *AIP*. Em 2000, análises de microssatélites em uma grande família com acromegalia isolada brasileira resultaram em um LOD-score de 2.5 (LOD-score >3.0 = associação positiva/significante), sugerindo associação com 2p16 (Gadellha, 2000). Entretanto, outra família analisada não apresentava co-segregação de marcadores em 2p16, indicando que 2p16 poderia estar envolvido em algumas famílias com acromegalia isolada, mas não em outras. O LOD-score dessa grande família foi re-avaliado com uso de parâmetros diferentes e se obteve um valor de 3.0, o que indicaria uma ligação positiva de 2p16 com a acromegalia familiar isolada (Stratakis, 2000). O gene responsável pelo CNC-2 ainda não foi identificado e, ao nosso conhecimento, nenhum outro estudo envolvendo 2p16 em acromegalia familiar foi publicado.

Para testarmos nossa hipótese que um gene em 2p16 estaria regulando a penetrância da doença em famílias com mutação *AIP*, seria necessário dados de mais famílias com mutação *AIP* e, de preferência, famílias grandes. Buscamos colaborações com os dois Consórcios internacionais que estudam FIPA, entretanto não conseguimos estabelecer uma colaboração duradoura. Em 2008, foi identificada a mutação *AIP* E24X na grande família brasileira relatada por Gadellha em 2000 (Leontiou, 2008) e assim tivemos a chance de testar nossa hipótese de 2p16 como modular genético em famílias com mutação *AIP*. Observamos que, assim como visto na família Acro-1, os marcadores em 2p16 também co-segregavam com a doença nessa grande família brasileira (Figura 16). Dos seis irmãos com a mutação *AIP* E24X, cinco deles que compartilhavam o mesmo haplótipo para 2p16 haviam desenvolvido o tumor hipofisário e acromegalia (idade

média do diagnóstico 17,2 anos, variando de 13 a 24 anos), enquanto o único irmão com a mutação *AIP* E24X que possuía um haplótipo diferente era assintomático (idade 24 anos).

Figura 16: Co-segregação entre o desenvolvimento do tumor e manifestação da doença (acromegalia) e de marcadores polimórficos localizados na região 2p16, nas famílias Acro-1 (acima, à esquerda) e Acro-2 (acima, à direita). Esses achados sugerem que um gene em 2p16 estaria agindo como modulador de fenótipo nestas famílias com acromegalia isolada e mutação no gene *AIP*. Ao realizarmos uma análise conjunta dos dados de 2p16 de uma grande família com acromegalia isolada publicadas antes da identificação das mutações *AIP* (Gadelha, 2000) e dos dados da análise de *AIP* dessa família, recentemente publicados (Leontiou, 2008), pudemos observar que o mesmo padrão de co-segregação observados em nossos casos ocorreu nesta terceira família, corroborando nossa hipótese

Nossos achados de 2p16 na família Acro-1 representam a primeira sugestão do envolvimento de 2p16 em famílias com mutação *AIP*. A análise combinada do estudo de 2p16 (Gadelha, 2000) e *AIP* (Leontiou, 2008) de uma grande família brasileira reforçou nossa hipótese inicial.

Como não foi identificada 2p16-LOH em tumores hipofisários de casos com CNC (Stratakis, 1996) e com acromegalia familiar isolada (Gadelha, 2000), o gene localizado na região 2p16 e envolvido na tumorigênese hipofisária se trata provavelmente de um proto-oncogene.

7.3 Heterogeneidade genética em famílias FIPA

Das 73 famílias FIPA abrangendo praticamente todos os tipos e combinações de tumor hipofisário (NS e secretores de GH, PRL, FSH, LH, TSH e gonadotropinas) analisadas por um estudo colaborativo internacional, mutações *AIP* foram encontradas por seqüenciamento em onze (15%) famílias (Daly, 2007). Outros estudos demonstraram uma maior freqüência de mutação desde que cerca de 35% das famílias FIPA estudadas apresentavam mutação *AIP* (Leontiou, 2008). A freqüência de mutações sobe para aproximadamente 50% das famílias com acromegalia isolada (Daly, 2007). Como há famílias com mutações fora da região codificadora, geralmente não analisadas, como na região promotora (Leontiou, 2008) e famílias com mutações não identificáveis ao seqüenciamento (Georgitsi, 2007), a real freqüência de mutações *AIP* em famílias com FIPA pode ser

maior do que se supõe atualmente. Entretanto, é certo que *AIP* é o gene responsável por apenas uma porção das famílias com FIPA e que novos genes ainda não identificados poderão ser descobertos em um futuro breve.

Recentemente, revisamos a genética de casos com FIPA e pudemos verificar diversos achados que sugerem a hipótese desta doença ser multi-gênica possivelmente com diversos genes ainda não identificados (Toledo, 2010). Dentre esses genes desconhecidos destacamos: a) um gene supressor de tumor no *locus* 11q13; b) um proto-oncogene no *locus* 2p16; e c) outros genes em regiões com ligação sugestiva com FIPA (3q28; 4q32.3–4q33; chr 5; 8q12.1; chr 14; 19q13.4 e 21q22.1) (vide artigo apêndice).

7.4 Análise somática em tumores de pacientes com mutação *AIP*

O caso índice da família Acro-2 desenvolveu um somatotropinoma precoce, seguido por um carcinoma de córtex adrenal e um linfoma não-Hodgkin. Essa paciente e sua filha também com acromegalia apresentavam a mutação funcional *AIP* R81X. Devido à ocorrência de tumores hipofisários e não-hipofisários, a primeira possibilidade que pode ser aventada é a ocorrência de mutação em outro gene associado à predisposição a tumores. Entretanto, essa paciente havia sido estudada anteriormente para mutações no gene *MEN1* e nenhuma mutação foi identificada (Luccio-Camelo, 2004). A mutação R337H no gene supressor de tumor *p53*, freqüentemente

identificada em pacientes pediátricos das regiões Sul e Sudeste do Brasil com tumores do córtex adrenal, também foi excluída previamente (Latronico, 2001).

Nossos estudos demonstraram 11q13-LOH e baixa expressão da proteína AIP no somatotropinoma da filha do caso-índice (Acro-2; II.1). A ocorrência 11q13-LOH em tumores hipofisários de pacientes com mutação *AIP* já havia sido descrito anteriormente (Vierimaa, 2006; Iwata, 2007) e reforçam o papel supressor de tumor deste gene na glândula hipófise. Nossos dados também confirmam os achados anteriores de que mutações *AIP* que levam a um sinal de parada da transcrição precoce apresentam também baixa expressão protéica (Georgitsi, 2007; Leontiou, 2008; Jaffrain-Rea, 2009).

O fato de o gene *AIP* ser expresso em vários tecidos (Kuzhandaivelu, 1996) e estar envolvido na via de AMPc (Bolger, 2003; de Oliveira, 2007) sugere que mutações germinativas inativadoras nesse gene podem estar envolvidas com um espectro de manifestações clínicas mais amplo do que o até aqui descrito (somente hipófise). Raros casos com mutação germinativa *AIP* foram descritos apresentando tumores não-hipofisários concomitantes: carcinoma de tireóide e adenoma do córtex da adrenal (Prof. Albert Beckers, não publicado; Cazabat, 2007). Entretanto, em nenhum desses estudos foi realizada investigação somática em tumores não-hipofisários de pacientes com mutação *AIP*. Assim, o estudo do linfoma e do carcinoma adrenocortical do caso índice da família Acro-2 é um modelo interessante para compreendermos melhor um possível envolvimento do gene *AIP* na tumorigênese de tecidos não-hipofisários.

Por meio de seqüenciamento ou análise de microssatélites, encontramos ausência de LOH no linfoma e presença LOH no carcinoma adrenocortical da paciente Acro-2 I.1 (Figuras 11 e 12). Esses dados são compatíveis com uma não participação de *AIP* na tumorigênese do linfoma e com um possível envolvimento de *AIP* na tumorigênese adrenocortical. Estudos funcionais mostraram que a proteína AIP-R81X perde interação com a fosfodiesterase dependente de AMPc PDE4A5 e provavelmente desregula a via de AMPc (Leountiou, 2008). O fato da via de AMPc estar freqüentemente descontrolada em tumores adrenocorticais via mutações nos genes *GNAS1*, *PRKAR1A*, *PDE8B* e *PDE11A* (Landis, 1989; Kirschner, 2000; Horvath, 2006; Horvath, 2008; Figura 1) pode reforçar o envolvimento de *AIP* na tumorigênese córtico-adrenal.

Entretanto, como 11q13-LOH foi um *hot-spot* de deleção em tumores adrenocorticais (Kjellman, 1999), a perda de *AIP* identificada em nosso estudo pode se tratar de evento secundário da tumorigênese do carcinoma adrenocortical (mutação de passagem). Assim, o possível envolvimento de *AIP* em tumores adrenocorticais necessita ser investigado em futuros estudos.

8 CONCLUSÕES

-
- Descrevemos uma nova mutação *AIP* (Y268X) em uma família brasileira com IFS logo após a publicação original do gene *AIP*, confirmando o papel desse novo gene na predisposição a tumores hipofisários.
 - Investigamos e excluimos o papel de diversos genes (*SSTR2*, *SSTR5*, *CDKN1B*, *AHR*, *PRKAR1A*, *PTTG*, *PROP1*, *MEG3* e *RB1*) como possíveis moduladores de fenótipo na IFS.
 - Nossos dados sugerem que co-segregação de marcadores localizados na região 2p16 está associada a um risco aumentado de pacientes com mutações *AIP* desenvolverem tumor hipofisário e acromegalia.
 - Apresentamos os primeiros dados sobre análise de tumores não-hipofisários em pacientes com mutação *AIP* e encontramos evidências de um possível envolvimento de *AIP* no tumor adrenocortical, possivelmente por meio da via de AMPc.

9 PERSPECTIVAS

-
- Nossos dados, em conjunto com a revisão da genética de FIPA que fizemos (Toledo, 2010) (apêndice), sugerem que essa doença é provavelmente multi-gênica. No momento, estamos rastreando em nosso laboratório diversos genes candidatos localizados na região 2p16 em pacientes com FIPA.
 - Estamos também realizando análise de mutação e expressão gênica e protéica de AIP em uma série de tumores do córtex da adrenal esporádicos para verificar um potencial envolvimento de AIP na tumorigênese desses tumores.

10 REFERÊNCIAS

Agarwal SK, Mateo CM, Marx SJ: Rare germline mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes in multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 2009; 94: 1826-1834.

Agarwal SK, Ozawa A, Mateo CM, Marx SJ: The *MEN1* gene and pituitary tumours. *Hormone Research* 2009; 71: 131-138.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson JD. Molecular Biology of the Cell 2004, *Garland Publishing*. ISBN-10: 0815332181

Alexander L, Appleton D, Hall R, Ross WM, Wilkinson R. Epidemiology of acromegaly in the Newcastle region. *Clinical Endocrinology* 1980; 12: 71-79.

Arafah BM & Nasrallah MP. Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocrine Related Cancer* 2001; 8: 287-305.

Balogh K, Rácz K, Patócs A, Hunyady L. Menin and its interacting proteins: elucidation of menin function. *Trends of Endocrinology and Metabolism* 2006; 9:357-64.

Barlier A, Gunz G, Zamora AJ, Morange-Ramos I, Figarella-Branger D, Dufour H, Enjalbert A, Jaquet P. Pronostic and therapeutic consequences of Gs alpha mutations in somatotroph adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1998 83:1604-10.

Barlier A, Vanbellinghen JF, Daly AF, Silvy M, Jaffrain-Rea ML, Trouillas J, Tamagno G, Cazabat L, Bours V, Brue T, Enjalbert A, Beckers A. Mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene are not highly prevalent among subjects with sporadic pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 2007; 92:1952-5

Bengtsson BA, Eden S, Ernest I, Oden A & Sjogren B. Epidemiology and long-term survival in acromegaly. A study of 166 cases diagnosed between 1955 and 1984. *Acta Med Scand* 1988; 223: 327-335.

Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD, Loeb LA. Human cancers express a mutator phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 2006 103(48):18238-42.

Boikos SA, Stratakis CA: Pituitary pathology in patients with Carney Complex: growth-hormone producing hyperplasia or tumors and their association with other abnormalities. *Pituitary* 2006; 9: 203-209.

Bolger GB, Peden AH, Steele MR, MacKenzie C, McEwan DG, Wallace DA, Huston E, Baillie GS, Houslay MD: Attenuation of the activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 by interaction with the immunophilin XAP2. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 3351-3363.

Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJ, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BA, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker RV, Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells SA Jr, Marx SJ. Consensus: Guidelines For Diagnosis And Therapy Of Men Type 1 Type 2. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 8:5658-71.

Bronstein MD, Melmed S. Pituitary tumorigenesis. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2005; 49:615-25.

Buchbinder S, Bierhaus A, Zorn M, Nawroth PP, Humpert P, Schilling T. Aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene (AIP) mutations are rare in patients with hormone secreting or non-secreting pituitary adenomas. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2008;116:625-8.

Carver LA, Bradfield CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:11452-6.

Carver LA, LaPres JJ, Jain S, Dunham EE, Bradfield CA: Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 33580–7.

Cazabat L, Guillaud-Bataille M, Bertherat J, Raffin-Sanson ML: Mutations of the gene for the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in pituitary adenomas. *Hormone Research* 2009; 71:132-141.

Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR, Debelenko LV, Zhuang Z, Lubensky IA, Liotta LA, Crabtree JS, Wang Y, Roe BA, Weisemann J, Boguski MS, Agarwal SK, Kester MB, Kim YS, Heppner C, Dong Q, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science* 1997; 276:404-7.

Chanson P, & Salenave S. Acromegaly. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2008; 3: 17.

Colao A, Ferone D, Marzullo P & Lombardi G. Systemic complications of acromegaly: epidemiology, pathogenesis, and management. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 102-152.

Dahia PL, Aguiar RC, Honegger J, Fahlbush R, Jordan S, Lowe DG, Lu X, Clayton RN, Besser GM, Grossman AB. Mutation and expression analysis of the p27/kip1 gene in corticotrophin-secreting tumours. *Oncogene*. 1998;16:69-76.

Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ciccarelli A, Valdes-Socin H, Rohmer V, Tamburrano G, Borson-Chazot C, Estour B, Ciccarelli E, Brue T, Ferolla P, Emy P, Colao A, De Menis E, Lecomte P, Penfornis F, Delemer B, Bertherat J, Wémeau JL, De Herder W, Archambeaud F, Stevenaert A, Calender A, Murat A, Cavagnini F, Beckers A: Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006; 91: 3316-3323.

Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA, Beckers A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006; 91: 4769–75.

Daly AF, Tichomirow MA, Beckers A: Update on familial pituitary tumors: from multiple endocrine neoplasia type 1 to familial isolated pituitary adenoma. *Hormone Research* 2009; 71: 105-111.

Daly AF, Tichomirowa MA, Beckers A: Genetic, molecular and clinical features of familial isolated pituitary adenomas. *Hormone Research* 2009; 71: 116-122.

Daly AF, Vanbellinhen JF, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, Naves LA, Guitelman MA, Murat A, Emy P, Gimenez-Roqueplo AP, Tamburrano G, Raverot G, Barlier A, De Herder W, Penfornis A, Ciccarelli E, Estour B, Lecomte P, Gatta B, Chabre O, Sabaté MI, Bertagna X, Garcia Basavilbaso N, Stalldecker G, Colao A, Ferolla P, Wémeau JL, Caron P, Sadoul JL, Oneto A, Archambeaud F, Calender A, Sinilnikova O, Montañana CF, Cavagnini F, Hana V, Solano A, Delettieres D, Luccio-Camelo DC, Basso A, Rohmer V, Brue T, Bours V, Teh BT, Beckers A: Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92: 1891-1896.

De Menis E, Prezant TR: Isolated familial somatotropinomas: clinical features and analysis of the *MEN1* gene. *Pituitary* 2002; 5: 11-15.

de Oliveira SK, Hoffmeister M, Gambaryan S, Muller-Esterl W, Guimaraes JA, Smolenski AP: Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282: 13656-63.

Eguchi K, Gadelha MR, Kineman RD, Une KN, The BT, Frohman LA. Genetic studies in six families with isolated familial somatotropinoma: Strong evidence for linkage to chromosome 11q13. *84th Annual Meeting of the Endocrine Society* 2002; P3-633.

Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, McCutcheon IE: The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* 2004; 101: 613-619.

Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM. A Syndrome Of Hyperplasia With Features Of Gigantism, Tumorigenesis, And Female Sterility In P27(Kip1)-Deficient Mice. *Cell* 1996; 85: 733-44.

Filopanti M, Ronchi C, Ballarè E, Bondioni S, Lania AG, Losa M, Gelmini S, Peri A, Orlando C, Beck-Peccoz P, Spada A. Analysis of somatostatin receptors 2 and 5 polymorphisms in patients with acromegaly. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005; 90:4824-8.

Fraenkel A, Stadelmann E, Benda C. Klinische und anatomische Beiträge zur Lehre von der Akromegalie. *Dtsch med Wschr* 1901; 27:513-517, 536-539, 564-566.

Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; 323:643-6.

Fritz A, Walch A, Piotrowska K, Rosemann M, Schäffer E, Weber K, Timper A, Wildner G, Graw J, Höfler H, Atkinson MJ. Recessive transmission of a multiple endocrine neoplasia syndrome in the rat. *Cancer Research* 2002; 62:3048-51.

Frohman LA, Eguchi K. Familial acromegaly. *Growth Hormone IGF Research* 2004; 14:90-6.

Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. A census of human cancer genes. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4:177-83.

Gadelha MR, Prezant TR, Une KN, Glick RP, Moskal SF 2nd, Vaisman M, Melmed S, Kineman RD, Frohman LA: Loss of heterozygosity on chromosome 11q13 in two families with acromegaly/gigantism is independent of mutations of the multiple endocrine neoplasia type I gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 249-56.

Gadelha MR, Une KN, Rohde K, Vaisman M, Kineman RD, Frohman LA: Isolated familial somatotropinomas: establishment of linkage to chromosome 11q13.1-11q13.3 and evidence for a potential second locus at chromosome 2p16-12. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85: 707-14.

Georgitsi M, Heliövaara E, Paschke R, Kumar AV, Tischkowitz M, Vierimaa O, Salmela P, Sane T, De Menis E, Cannavò S, Gündogdu S, Lucassen A, Izatt L, Aylwin S, Bano G, Hodgson S, Koch CA, Karhu A, Aaltonen LA: Large genomic deletions in AIP in pituitary adenoma predisposition. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008; 93: 4146-51.

Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, van der Luijt RB, Aalfs CM, Sane T, Vierimaa O, Mäkinen MJ, Tuppurainen K, Paschke R, Gimm O, Koch CA, Gündogdu S, Lucassen A, Tischkowitz M, Izatt L, Aylwin S, Bano G, Hodgson S, De Menis E, Launonen V, Vahteristo P, Aaltonen LA. Germline CDKN1B/p27Kip1 mutation in multiple endocrine neoplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92:3321-5.

Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007; 446:153-8.

Grimmond S, Silins G, Walters M, Stewart C, Cardinal J, Khodaei S, Parente F, Tranebjaerg L, Jorde R, Salmela P: Mutation analysis of the MEN1 gene in multiple endocrine neoplasia type 1, familial acromegaly and familial isolated hyperparathyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 2621-26.

Guyton, AC & Hall, JE *Tratado de Fisiologia Médica*, 6ª Edição, 2006. Editora Elsevier.

Hall WA, Luciano MG, Doppman JL, Patronas NJ, Oldfield EH: Pituitary magnetic resonance imaging in normal human volunteers: occult adenomas in the general population. *Annals of Internal Medicine* 1994; 120: 817– 820.

Hanahan, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.

Hardy J, Somma M. Acromegaly. Surgical treatment by transsphenoidal microsurgical removal of the pituitary adenoma. In: Collins WF, Tindall GT, editors. *Clinical management of pituitary disorders*. New York: Raven Press. 1979; 209–17.

Hayward BE, Barlier A, Korbonits M, Grossman AB, Jacquet P, Enjalbert A, Bonthron DT. Imprinting of the G(s)alpha gene *GNAS1* in the pathogenesis of acromegaly. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 107: 31-6.

Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Höglund P, Järvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpää M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998; 391:184-7.

Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, Stein E, Levine E, Delimpasi G, Hsiao HP, Keil M, Heyerdahl S, Matyakhina L, Libe R, Fratticci A, Kirschner LS, Cramer K, Gaillard RC, Bertagna X, Carney JA, Bertherat J, Bossis I, Stratakis CA. A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nature Genetics* 2006; 38:794-800.

Horvath A, Mericq V, Stratakis CA. Mutation in PDE8B, a cyclic AMP-specific phosphodiesterase in adrenal hyperplasia. *New England Journal of Medicine* 2008; 358:750-2.

Hosoi E, Yokogoshi Y, Hosoi E, Horie H, Sano T, Yamada S, Saito S. Analysis of the Gs alpha gene in growth hormone-secreting pituitary adenomas by the polymerase chain reaction-direct sequencing method using paraffin-embedded tissues. *Acta Endocrinologica* 1993;129:301-6.

Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Järvinen HJ, Sistonen P, Tomlinson IPM, Houlston RS, Bevan S, Mitros FA, Stone EM, Aaltonen LA. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 1998; 280: 1086-8.

Hu N, Gutschmann A, Herbert DC, Bradley A, Lee WH, Lee EY. Heterozygous Rb-1 delta 20/+mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance. *Oncogene* 1994; 9:1021-7.

Iwata T, Yamada S, Mizusawa N, Golam HM, Sano T, Yoshimoto K. The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene is rarely mutated in sporadic GH-secreting adenomas. *Clinical Endocrinology* 2007; 66:499-502.

Jaffrain-Rea ML, Angelini M, Gargano D, Tichomirowa MA, Daly AF, Vanbellinghen JF, D'Innocenzo E, Barlier A, Giangaspero F, Esposito V, Ventura L, Arcella A, Theodoropoulou M, Naves LA, Fajardo C, Zacharieva S, Rohmer V, Brue T, Gulino A, Cantore G, Alesse E, Beckers A. Expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-interacting protein in pituitary adenomas: pathological and clinical implications. *Endocrine Related Cancer* 2009; 16:1029-43.

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

Karnik SK, Hughes CM, Gu X, Rozenblatt-Rosen O, McLean GW, Xiong Y, Meyerson M, Kim SK. Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 2005;102:14659-64.

Kauppinen-Makelin R, Sane T, Reunanen A, Valimaki MJ, Niskanen L, Markkanen H, Loyttyniemi E, Ebeling T, Jaatinen P, Laine H, Nuutila P, Salmela P, Salmi J, Stenman UH, Viikari J & Voutilainen E A nationwide survey of mortality in acromegaly. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005; 90: 4081-6.

Khoo SK, Pendek R, Nickolov R, Luccio-Camelo DC, Newton TL, Massie A, Petillo D, Menon J, Cameron D, Teh BT, Chan SP. Genome-wide scan identifies novel modifier *loci* of acromegalic phenotypes for isolated familial somatotropinoma. *Endocrine Related Cancer* 2009; Epub ahead of print, PubMed PMID: 19443539

Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, Stratakis CA: Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nature Genetics* 2000; 26: 89-92.

Kjellman M, Roshani L, Teh BT, Kallioniemi OP, Höög A, Gray S, Farnebo LO, Holst M, Bäckdahl M, Larsson C. Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 *locus* in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84:730-5.

Knudson Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 1971; 68:820-3.

Kolluri SK, Weiss C, Koff A, Göttlicher M. p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes & Development* 1999; 13:1742-53.

Kovacs K, Horvath E, Vidal S. Classification of pituitary adenomas. *Journal of Neurooncology* 2001; 54:121-7.

Lamberts SW, Krenning EP, Reubi JC. The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocrine Reviews* 1991; 12:450-82.

Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* 1989; 340:692-6.

Larsson C, Skogseid B, Oberg K, Nakamura Y, Nordenskjöld M. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature* 1988; 332:85-7.

Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86:4970-3.

Launonen V, Vierimaa O, Kiuru M, Isola J, Roth S, Pukkala E, Sistonen P, Herva R, Aaltonen LA. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 2001; 98:3387-92.

Lemmens I, Van de Ven WJ, Kas K, Zhang CX, 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 MJ, Lips CJ, Höppener JW, Khodaei S, Grant AL, Weber G, Kytölä S, Teh BT, Farnebo F, Thakker RV. Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. *Human Molecular Genetics* 1997; 6:1177-83.

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

Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JA, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A Jr, Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, Peters G, Bolger GB, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M: The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008; 93: 2390-401.

Livak KJ, Schmittgen TD Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.

Lourenço DM Jr, Toledo RA, Mackowiak II, Coutinho FL, Cavalcanti MG, Correia-Deur JE, Montenegro F, Siqueira SA, Margarido LC, Machado MC, Toledo SP. Multiple endocrine neoplasia type 1 in Brazil: MEN1 founding mutation, clinical features, and bone mineral density profile. *European Journal of Endocrinology* 2008;159:259-74.

Luccio-Camelo DC, Une KN, Ferreira RE, Khoo SK, Nickolov R, Bronstein MD, Vaisman M, Teh BT, Frohman LA, Mendonça BB, Gadelha MR: A meiotic recombination in a new isolated familial somatotropinoma kindred. *European Journal of Endocrinology* 2004; 150: 643-648.

MacFarlane DA. Cancer of the adrenal cortex. *Ann Roy Coll Surg* 1958; 23:155.

Martin GS. Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 1970; 227:1021-3.

Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nature Reviews Cancer* 2005; 5:367-75.

Matyakhina L, Pack S, Kirschner LS, Pak E, Mannan P, Jaikumar J, Taymans SE, Sandrini F, Carney JA, Stratakis CA. Chromosome 2 (2p16) abnormalities in Carney complex tumours. *Journal of Medical Genetics* 2003; 40:268-77.

Melmed S. Aryl hydrocarbon receptor interacting protein and pituitary tumorigenesis: another interesting protein. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92:1617-9.

Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 112:1603-18.

Melmed S. Medical progress: Acromegaly. *New England Journal of Medicine* 2006; 355:2558-73.

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

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

Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, Ponder MA, Telenius H, Tunnacliffe A, Ponder BA. Germ-line mutations of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363:458-60.

Naves LA, Daly AF, Vanbellinghen JF, Casulari LA, Spilioti C, Magalhães AV, Azevedo MF, Giacomini LA, Nascimento PP, Nunes RO, Rosa JW, Jaffrain-Rea ML, Bours V, Beckers A: Variable pathological and clinical features of a large Brazilian family harboring a mutation in the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene. *European Journal of Endocrinology* 2007; 157: 383-91.

Oppermann H, Levinson AD, Varmus HE, Levintow L, Bishop JM. Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src). *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 1979; 76:1804-8.

Owens M, Ellard S, Vaidya B. Analysis of gross deletions in the MEN1 gene in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clinical Endocrinology* 2008; 68:350-4.

Pei L, Melmed S, Scheithauer B, Kovacs K, Benedict WF, Prager D. Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma susceptibility gene (RB) locus in aggressive pituitary tumors: evidence for a chromosome 13 tumor suppressor gene other than RB. *Cancer Research* 1995; 55:1613-6.

Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Molecular Endocrinology* 1997; 11:433-41.

Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Höfler H, Fend F, Graw J, Atkinson MJ: Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 2006; 103: 15558-63.

Pinto EM, Bronstein MD. Molecular aspects of pituitary tumorigenesis. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 2008; 52:599-610.

Piotrowska K, Pellegata NS, Rosemann M, Fritz A, Graw J, Atkinson MJ: Mapping of a novel MEN-like syndrome *locus* to rat chromosome 4. *Mammalian Genome* 2004; 15: 135-41.

Qian ZR, Sano T, Asa SL, Yamada S, Horiguchi H, Tashiro T, Li CC, Hirokawa M, Kovacs K, Ezzat S. Cytoplasmic expression of fibroblast growth factor receptor-4 in human pituitary adenomas: relation to tumor type, size, proliferation, and invasiveness. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; 89:1904-11.

Raitila A, Georgitsi M, Karhu A, Tuppurainen K, Mäkinen MJ, Birkenkamp-Demtröder K, Salmenkivi K, Orntoft TF, Arola J, Launonen V, Vahteristo P, Aaltonen LA. No evidence of somatic aryl hydrocarbon receptor interacting protein mutations in sporadic endocrine neoplasia. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:901-6.

Raitila A, Georgitsi M, Bonora E, Vargiolu M, Tuppurainen K, Mäkinen MJ, Vierimaa O, Salmela PI, Launonen V, Vahteristo P, Aaltonen LA, Romeo G, Karhu A. Aryl hydrocarbon receptor interacting protein mutations seem not to associate with familial non-medullary thyroid cancer. *Journal of Endocrinological Investigation* 2009; 32:426-9.

Sambrook J & MacCallum P. Molecular Cloning. *CSHL Press* ISBN 978-087969577-4. 2001

Sandrini F, Kirschner LS, Bei T, Farmakidis C, Yasufuku-Takano J, Takano K, Prezant TR, Marx SJ, Farrell WE, Clayton RN, Groussin L, Bertherat J, Stratakis CA. PRKAR1A, one of the Carney complex genes, and its *locus* (17q22-24) are rarely altered in pituitary tumours outside the Carney complex. *Journal of Medical Genetics* 2002; 39:78-81.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* 2002; 30:57.

Schwoner J. Ueber hereditäre Akromegalie. *Z Klin Med* 1897; 32:202-210.

Shimon I, Melmed S. Management of pituitary tumors. *Annals of Internal Medicine* 1998; 129:472-83.

Soares BS, Eguchi K, Frohman LA: Tumor deletion mapping on chromosome 11q13 in eight families with isolated familial somatotropinoma and in 15 sporadic somatotropinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005; 90: 6580-7.

Soares BS, Frohman LA: Isolated familial somatotropinoma. *Pituitary* 2004; 7; 95-101.

Stratakis CA, Carney JA, Lin JP, Papanicolaou DA, Karl M, Kastner DL, Pras E, Chrousos GP: Carney complex, a familial multiple neoplasia and lentiginosis syndrome. Analysis of 11 kindreds and linkage to the short arm of chromosome 2. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 97: 699-705.

Stratakis CA, Kirschner LS. Isolated familial somatotropinomas: does the disease map to 11q13 or to 2p16? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85:4920-1.

Suh KS, Crutchley JM, Koochek A, Ryscavage A, Bhat K, Tanaka T, Oshima A, Fitzgerald P, Yuspa SH. Reciprocal modifications of CLIC4 in tumor epithelium and stroma mark malignant progression of multiple human cancers. *Clinical Cancer Research* 2007; 13:121-31.

Taboada GF, Tabet AL, Naves LA, de Carvalho DP, Gadelha MR. Prevalence of gsp oncogene in somatotropinomas and clinically non-functioning pituitary adenomas: our experience. *Pituitary* 2009;12:165-9.

Teh BT, Esapa CT, Houlston R, Grandell U, Farnebo F, Nordenskjöld M, Pearce CJ, Carmichael D, Larsson C, Harris PE. A family with isolated hyperparathyroidism segregating a missense *MEN1* mutation and showing loss of the wild-type alleles in the parathyroid tumors. *American Journal of Human Genetics* 1998; 63:1544-9.

Teh BT, Kytölä S, Farnebo F, Bergman L, Wong FK, Weber G, Hayward N, Larsson C, Skogseid B, Beckers A, Phelan C, Edwards M, Epstein M, Alford F, Hurley D, Grimmond S, Silins G, Walters M, Stewart C, Cardinal J, Khodaei S, Parente F, Tranebjaerg L, Jorde R, Salmela P: Mutation analysis of the *MEN1* gene in multiple endocrine neoplasia type 1, familial acromegaly and familial isolated hyperparathyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 2621-26.

Thakker RV, Pook MA, Wooding C, Boscaro M, Scanarini M, Clayton RN. Association of somatotrophinomas with loss of alleles on chromosome 11 and with gsp mutations. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91:2815-21.

Toledo RA, Lourenco DM Jr, Liberman B, Cunha-Neto MB, Cavalcanti MG, Moyses CB, Toledo SPA, Dahia PL: Germline mutation in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene in familial somatotropinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92:1934-7.

Toledo RA, Lourenço Jr DM, Toledo SP. Familial Isolated Pituitary Adenoma: Evidence for Genetic Heterogeneity. *Frontiers of Hormone Research* 2010; 38: 77–86.

Tomlinson IPM, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Kelsell D, Leigh I, Gorman P, Lamlum H, Rahman S, Roylance RR, Olpin S, Bevan S, Barker K, Hearle N, Houlston RS, Kiuru M, Lehtonen R, Karhu A, Vilkki S, Laiho P, Eklund C, Vierimaa O, Aittomäki K, Hietala M, Sistonen P, Paetau A, Salovaara R, Herva R, Launonen V, Aaltonen LA. Germline mutations in the fumarate hydratase gene predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and renal cell cancer. *Nature Genetics* 2002; 30: 406-10.

Vergès B, Boureille F, Goudet P, Murat A, Beckers A, Sassolas G, Cougard P, Chambe B, Montvernay C, Calender A. Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87:457-65.

Vierimaa O, Ebeling TM, Kytölä S, Bloigu R, Eloranta E, Salmi J, Korpi-Hyövälti E, Niskanen L, Orvola A, Elovaara E, Gynther A, Sane T, Välimäki M, Ignatius J, Leisti J, Salmela PI. Multiple endocrine neoplasia type 1 in Northern Finland; clinical features and genotype phenotype correlation. *European Journal of Endocrinology* 2007;157:285-94.

Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gündogdu S, De Menis E, Mäkinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA: Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the *AIP* gene. *Science* 2006; 312: 1228-30.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991; 10:506-13.

Wermer P. Genetic aspect of adenomatosis of endocrine glands. *American Journal of Medicine* 1954; 16:363-71.

Wu CL, Zukerberg LR, Ngwu C, Harlow E, Lees JA. In vivo association of E2F and DP family proteins. *Molecular Cellular Biology* 1995; 15:2536-46.

Wu W, Cogan JD, Pfäffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA 3rd, Rosenfeld MG. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nature Genetics* 1998; 18:147-9.

Yamada S, Yoshimoto K, Sano T, Takada K, Itakura M, Usui M, Teramoto A: Inactivation of the tumor suppressor gene on 11q13 in brothers with familial acrogigantism without multiple endocrine neoplasia type 1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82: 239-42.

Yaneva M, Daly AF, Tichomirowa MA, Vanbellinchen J-F, Hagelstein M-T, Bours V, Zacharieva S & Beckers A. Aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene mutations in Bulgarian FIPA and young sporadic pituitary adenoma patients, The Endocrine Society Annual Meeting, San Francisco, California, Poster session: Translational – Pituitary, Parathyroid & Reproductive Tumors, 2008; P3-520.

Yu R, Bonert V, Saporta I, Raffel LJ, Melmed S Aryl hydrocarbon receptor interacting protein variants in sporadic pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006; 91:5126-9.

Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84:761-7.

Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD, Melmed S. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Molecular Endocrinology* 1999; 13:156-66.

Zhang X, Zhou Y, Mehta KR, Danila DC, Scolavino S, Johnson SR, Klibanski A. A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88:5119-26.

Zhuang Z, Ezzat SZ, Vortmeyer AO, Weil R, Oldfield EH, Park WS, Pack S, Huang S, Agarwal SK, Guru SC, Manickam P, Debelenko LV, Kester MB, Olufemi SE, Heppner C, Crabtree JS, Burns AL, Spiegel AM, Marx SJ, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Asa SL, Lubensky IA. Mutations of the *MEN1* tumor suppressor gene in pituitary tumors. *Cancer Research* 1997;57:5446-51.

Kuzhandaivelu N, Cong YS, Inouye C, Yang WM, Seto E. XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. *Nucleic Acids Research* 1996;24:4741-50.

APÊNDICE

PUBLICAÇÕES RELACIONADAS AO DOUTORADO

Artigo publicado

1) Germline mutation in the *aryl hydrocarbon receptor interacting protein* gene in familial somatotropinoma. (Artigo em anexo)

Toledo RA, Lourenço DM Jr, Liberman B, Cunha-Neto MB, Cavalcanti MG, Moyses CB, Toledo SP, Dahia PL 2007 *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92:1934-7.

- **Editorial:** Aryl hydrocarbon receptor interacting protein and pituitary tumorigenesis: another interesting protein. Melmed S JCEM 2007 92:1617-9.
- **Menção:** O artigo que publicamos foi citado em Plenária no Congresso Internacional de Endocrinologia (The 89th Annual Meeting of The Endocrine Society - ENDO-2007 - Toronto), na sessão “*The Year in Pituitary*” apresentado pelo Dr. Shlomo Melmed, Research Institute at Cedars-Sinai Medical Center.
- **Prêmio:** O pôster apresentado no ENDO-2007 ganhou o *Grant Trainee Poster Section*.
- **Citações na literatura:** 30 (*Web of Science*, Fevereiro de 2010)

Artigo aceito para publicação

2) Familial Isolated Pituitary Adenoma: Evidence for genetic heterogeneity. (Artigo em anexo)

Toledo RA, Lourenço Jr DM, Toledo SPA. *Frontiers of Hormone Research*; 2010 38:77-86

Artigos submetidos

3) Somatic loss of AIP in a nonpituitary tumor in a kindred with familial acromegaly and the R81X AIP germline mutation. (Artigo em anexo)

Toledo RA, Mendonça BB, Fragoço MCBV, Longuini VC, Almeida MQ, Lourenço Jr DM, Soares IC, Mariani BMP, Moraes MB, Alves VAF, Bronstein MD, Toledo SPA. *Hormone and Metabolic Research*

4) Aggressive clinical features in pituitary adenomas associated with mutations in the aryl hydrocarbon interacting protein gene. International collaborative AIP study, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* – Toledo RA (co-autor).

Artigo de revisão

5) AIP mutations in familial and sporadic pituitary adenomas: 2010 Update.

Toledo RA & Toledo SP. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* (em escrita)

APRESENTAÇÕES ORAIS RELACIONADAS AO DOUTORADO

6) Putative modifying genetic factors in families harboring germline mutations in the *AIP* gene.

Pituitary Today Meeting-II – Angra dos Reis, Novembro 2008

7) Putative modifying genetic factors in families harboring germline mutations in the *AIP* gene.

First FIPA (Familial Isolated Pituitary Adenoma) Workshop: "Genetic, Molecular and Clinical Aspects of Familial Pituitary Adenomas", Liège, Maio 2009

OUTRAS PUBLICAÇÕES, NO PERÍODO DO DOUTORADO

Artigos publicados

8) High penetrance of pheochromocytoma associated with the novel C634Y-Y791F double germline mutation in the *RET* protooncogene.

Toledo RA, Wagner SM, Coutinho FL, Lourenço Jr DM, Azevedo JA, Longuini VC, Reis MTA, Siqueira SAC, Lucon AM, Tavares MR, Fragoso MCBV, Pereira MA, Dahia PL, Mulligan LM, Toledo SP. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 PMID: 20080836

9) Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma.

Qin Y, Yao L, King EE, Buddavarapu K, Lenci RE, Chocron ES, Lechleiter JD, Sass M, Aronin N, Schiavi F, Boaretto F, Opocher G, **Toledo RA**, Toledo SP, Stiles C, Aguiar RC, Dahia PL. *Nature Genetics*. 2010 PubMed PMID: 20154675

10) Bone mineral density analysis in patients with primary hyperparathyroidism associated with multiple endocrine neoplasia type 1 after total parathyroidectomy.

Coutinho FL, Lourenço Jr DM, **Toledo RA**, Montenegro FL, Correia-Deur JE, Toledo SP. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 PubMed PMID: 19650788

11) Hypercalcitoninemia is not pathognomonic of medullary thyroid carcinoma.

Toledo SP, Lourenço DM Jr, Santos MA, Tavares MR, **Toledo RA**, Correia-Deur JE. *Clinics* 2009; 64:699-706. PubMed PMID: 19606248

12) Sporadic medullary thyroid carcinoma: clinical data from a university hospital.

Correia-Deur JE, Toledo RA, Imazawa AT, Lourenço DM Jr, Ezabella MC, Tavares MR, Toledo SP. Clinics 2009; 64:379-86. PubMed PMID: 19488601

13) Multiple endocrine neoplasia type 1 in Brazil: *MEN1* founding mutation, clinical features, and bone mineral density profile.

Lourenço DM Jr, Toledo RA, Mackowiak II, Coutinho FL, Cavalcanti MG, Correia-Deur JE, Montenegro F, Siqueira SA, Margarido LC, Machado MC, Toledo SP. Eur J Endocrinol. 2008; 159:259-74. PubMed PMID: 18524795

Capítulos de livro

14) Neoplasias Endócrinas Múltiplas. In: Milton de Arruda Martin; Flair José Carrilho; Venâncio Avancini Ferreira Alves. Clínica Médica. 1ª edição. São Paulo. Editora Manole, 2009, v. 5, p. 389-404 Toledo RA, Lourenço Jr DM, Toledo SPA.

15) Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1. In: Antonio Carlos Lopes; Vicente Amato Neto; Alfredo Halpern. Tratado de Clínica Médica - Antonio Carlos Lopes. 2ª edição 978-85-7241-779-2: Editora Roca, 2009, v. 2, p. 3512-3517. Lourenço Jr DM, Toledo RA, Toledo SPA.

15) Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1. In: Carlos Gil Ferreira. Oncologia molecular. São Paulo: Editora Atheneu (2010, no prelo). Toledo RA, Lourenço Jr DM, Toledo SPA.

PÓS- DOUTORADO

O aluno seguirá seu Pós-Doutorado na linha de tumorigênese endócrina, com o projeto: **"Análise dos genes *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2B* e *CDKN2C*, nas neoplasias endócrinas múltiplas tipo 1 e 2"**; a ser realizado na UEG-FMUSP.

Processo FAPESP Nº 2009/15386-6 (bolsa de Pós-Doc aceita, aguardando certificado de conclusão de Doutorado para início).

Processo no Comitê de Ética do HC-FMUSP (Cappesq) Nº 4980, aprovado em 10/02/2010.

BRIEF REPORT

Germline Mutation in the *Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein* Gene in Familial Somatotropinoma

Rodrigo A. Toledo, Delmar M. Lourenço, Jr., Bernardo Liberman, Malebranche B. C. Cunha-Neto, Maria G. Cavalcanti, Cinthia B. Moyses, Sergio P. A. Toledo, and Patricia L. M. Dahia

Unidade de Endocrinologia Genética LIM-25, Endocrinologia (R.A.T., D.M.L., M.G.C., C.B.M., S.P.A.T.) and Neuroendocrine Unit (M.B.C.C.-N.), Division of Neurosurgery, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 01246-903, Brazil; Hospital Brigadeiro (B.L.), São Paulo 04107-030, Brazil; and Departments of Medicine and Cellular and Structural Biology (P.L.M.D.), San Antonio Cancer Institute, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas 78229

Context: Acromegaly is usually sporadic, but familial cases occur in association with several familial pituitary tumor syndromes. Recently mutations in the *aryl hydrocarbon receptor interacting protein* (*AIP*) gene were associated with familial pituitary adenoma predisposition.

Objective: The objective of the study was to investigate the status of *AIP* in a pituitary tumor predisposition family.

Settings: The study was conducted at a nonprofit academic center and medical centers.

Patients: Eighteen members of a Brazilian family with acromegaly were studied.

Results: A novel germline mutation in the *AIP* gene, Y268X, predicted to generate a protein lacking two conserved domains, was

identified in four members of this family: two siblings with early-onset acromegaly; a third, 41-yr-old sibling with a microadenoma but no clinical features of disease, and his 3-yr-old son. No changes were found in 14 unaffected at-risk relatives or 92 healthy controls.

Conclusions: We confirm the role of the *AIP* gene in familial acromegaly. This finding increases the spectrum of molecular defects that can give rise to pituitary adenoma susceptibility. Establishment of genotype-phenotype correlations in *AIP* mutant tumors will determine whether *AIP* screening can be used as a tool for clinical surveillance and genetic counseling of families with pituitary tumor predisposition. The underlying basis for the phenotypic variation within *AIP*-mutant families and the mechanism of *AIP*-mediated tumorigenesis remain to be defined. (*J Clin Endocrinol Metab* 92: 1934–1937, 2007)

ACROMEGALY IS A syndrome of hormone excess characterized by high serum levels of GH mostly due to a GH-producing pituitary adenoma (1). Most cases are sporadic; however, familial acromegaly may also occur in association with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), Carney complex, and also with various hereditary conditions known as pituitary adenoma predisposition (PAP), familial isolated pituitary adenoma (FIPA), and isolated familial somatotropinoma (IFS) (2, 3). IFS is defined by the finding of at least two patients with acromegaly/gigantism in a family not associated with MEN1 or Carney complex and accounts for approximately 18% of FIPAs (4). Typically, both IFS and FIPA patients are younger at diagnosis than their sporadic counterparts; their tumors tend to be larger (88% of IFS cases are macroadenomas) and, in IFS, have a more aggressive

course. IFS, and possibly also FIPA, appear to be inherited as an autosomal dominant trait with incomplete penetrance (2, 5). The IFS locus has been mapped to 11q13; however, the molecular etiology of IFS has remained elusive (6).

Recently, germline mutations of the *aryl hydrocarbon receptor interacting protein* (*AIP*) gene, also known as *ARA9* or *XAP2*, were identified in familial clusters with PAP (3). These mutations were accompanied by loss of heterozygosity of the remaining allele in the tumor tissue, indicative of a tumor suppressor role for the *AIP* gene. In the above-referred study, one of three IFS kindreds screened was found to carry a germline *AIP* mutation (3). There have now been additional reports of *AIP* mutations in both familial (FIPA and IFS) and sporadic acromegaly, which provide the framework for defining genotype-phenotype correlations in pituitary adenoma syndromes (7–9). From these recent data, *AIP* has been suggested to act as a low-penetrance gene in familial pituitary clusters. We report here the identification of a novel *AIP* mutation in a family with acromegaly, which further validates the role of this gene in human pituitary tumor predisposition, and discuss the current status of the genetics of familial pituitary tumors in light of these new findings.

First Published Online March 6, 2007

Abbreviations: *AIP*, Aryl hydrocarbon receptor interacting protein; FIPA, familial isolated pituitary adenoma; IFS, isolated familial somatotropinoma; MEN1, multiple endocrine neoplasia type 1; MRI, magnetic resonance imaging; PAP, pituitary adenoma predisposition; PRL, prolactin; SSTR, somatostatin receptor.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

Patients and Methods

We have followed two siblings with acromegaly (III-15, III-16) for the past 24 yr at the Hospital das Clínicas, University of São Paulo School of Medicine. Partial results from this family have been described elsewhere (10). Briefly, their age at diagnosis was 24 and 29 yr with reported onset of symptoms at 21 and 17 yr old, respectively, and both presented with invasive macroadenomas, as revealed by pituitary imaging studies (Table 1). Moreover, no mutations were detected in the *GHRH-R*, *MEN1*, *PRKARIA*, *GNAS1*, or *GNAI2* genes in these patients (10, 11).

We now expanded the analysis to include a total of 18 at-risk family members, including four siblings (III-15 to III-18, Fig. 1A) of the affected generation and their offspring (IV-1 to IV-6). This family is unrelated to other acromegaly families also reported in Brazil (6, 12). In addition, DNA samples from 92 adult healthy individuals were also investigated. This study was approved by the institution's ethics committee and all subjects provided written informed consent.

Peripheral blood was collected for genomic DNA isolation according to standard protocols. Exons 1–6 and intron/exon boundaries of the *AIP* gene were amplified by PCR using primers described elsewhere (3). PCR conditions are available on request. *AIP* gene mutation analysis was all carried out by automated sequencing of both DNA strands using the Big Dye Terminator technology (version 3.1; Applied Biosystems, Foster City, CA) at the University of São Paulo Sequencing Core Facility. Results were confirmed using DNA obtained from an independently collected blood sample in all cases.

Results

AIP gene analysis

Mutation analysis revealed a nucleotide substitution A>C at position 804 in exon 6 of the *AIP* gene coding sequence in four family members (III-15, III-16, III-17 and IV-33, Fig. 1B). This variant results in a premature TAA-stop signal at codon 268 (Y268X), leading to a predicted protein lacking the final 63 amino acids (GenBank accession no. EF437945). Missense mutations of this codon have been detected in other FIPA families (7). The Y268X mutation is located at the beginning of the third tetratricopeptide repeat domain, shown to be involved in protein-protein interactions that are critical to AIP function (13). The 268 codon and deleted region span the interacting domains for the aryl hydrocarbon receptor and heat-shock protein 90 (13, 14). However, one possibility is

that the mutant transcript is unstable and therefore subject to degradation by the nonsense-mediated decay mechanism with no resulting protein product (15). Thus, the Y268X mutation is expected to alter AIP activity, although the precise mechanism for pituitary cell growth in response to this inactivating mutation remains to be clarified.

Individual III-17 was a 41-yr-old male with no clinical signs of disease. To further establish the extent of disease penetrance, a detailed biochemical and imaging analysis was carried out in this individual (Table 1). Both baseline and postoral glucose tolerance test GH was 0.1 ng/ml and less than 1 ng/ml, respectively (normal < 4.4 ng/ml), and IGF was 154 ng/ml (normal 101–267 ng/ml). Serum values of prolactin (PRL), ACTH, TSH, LH, FSH, and cortisol were normal (not shown). Magnetic resonance imaging (MRI) revealed a 3-mm hypodense pituitary nodule with slight deviation of the pituitary infundibulum and no extrasellar extension. Visual fields were normal. His 3-yr-old asymptomatic child (75th percentile for height and weight) was also found to carry this mutation. No other Y268X mutation carrier was identified among the remaining 14 relatives.

To exclude that Y268X was an unreported polymorphism, we analyzed an additional 184 chromosomes from 92 healthy controls and did not detect the Y268X allele in these samples.

Discussion

Until recently the molecular pathogenesis of IFS and sporadic pituitary tumors remained elusive, although loss of heterozygosity at the 11q13 locus has been described in both sporadic and familial pituitary adenomas (6). The *MEN1* gene, located at this region, was ruled out in these cases, suggesting that another tumor suppressor gene at the 11q13 locus is involved in pituitary tumorigenesis (6, 10, 16, 17). The *AIP* gene, which maps to the 11q13 region, was recently associated with PAP (3). Two other recent reports of *AIP* gene screening in families with pituitary tumors have started to

TABLE 1. Summary of the clinical and genetic findings in a family with acromegaly

Individual	Sex/age (yr) ^a	Clinical/pituitary findings	Age of symptoms/diagnosis (yr)	Clinical follow-up (period)	AIP gene status
III-16 (proband)	F/48	Acromegaly, macroadenoma (>1.0 cm)	21/24	Transsph, Rx, octreotide LAR, controlled (1982–2006)	Y268X
III-15	M/49	Acromegaly, macroadenoma (2.5 × 1.5 × 1.1 cm)	17/29	Transsph, Rx, controlled (1986–2006)	Y268X
III-17	M/41	NL basal GH, IGF-I, PRL, NL dynamic tests ^b Microadenoma on MRI	No symptoms	—	Y268X
III-18	F/36	NL basal GH, IGF-I, PRL, NL dynamic tests ^b NL MRI	No symptoms	—	wt
IV-33	M/3	NL height and weight (75th percentile for age)	No symptoms	—	Y268X
Additional 13 at-risk relatives ^c	—	NL values of: GH, IGF-I, PRL	No symptoms	—	wt

NL, Normal; wt, wild type; M, male; F, female; transsph, transsphenoidal surgery; Rx, radiotherapy; LAR, long-acting somatostatin analog; —, not applicable or not performed.

^a Present age.

^b Oral glucose tolerance test and insulin tolerance test.

^c II-2, II-4, III-1, III-2, III-11 to III-13, IV-27 to IV-32, with age ranging from 9 to 89 yr old and mean age of 43 yr.

define genotype-phenotype correlations (7, 8). Currently a total of 14 germline *AIP* mutations, including the novel mutation identified in our study, have been reported in familial pituitary adenoma settings. Of note, mutation rates were higher in IFS families, compared with heterogeneous FIPA families, in which different tumor types are present in affected individuals (50% *vs.* ~10%, respectively). Among the latter, GH- and PRL-secreting adenomas and also nonsecreting tumors appear to predominate in mutation-positive families (7).

Our present report of a novel germline *AIP* mutation, Y268X, in a Brazilian family further validates the involvement of the *AIP* gene in familial acromegaly/pituitary adenoma syndrome. Importantly, the detection of the *AIP* mutation in a 41-yr-old individual with a nonsecreting pituitary microadenoma, in contrast with the early-onset and aggressive disease of his two affected siblings, is consistent with an emerging profile whereby *AIP* mutations have incomplete penetrance and associate with pituitary tumors of lineages other than somatotrophs (3, 7). These data support the classification of this kindred as either IFS or FIPA, reflecting the challenges in the nomenclature used to define pituitary pre-

disposition at the clinical level. Future classification algorithms may be called for in the near future and could, for example, be guided primarily by the genetic defect. In this family, unidentified factor(s), either genetic or epigenetic, could be acting to diminish or delay pituitary tumor growth and/or secretion in this mutation carrier. Accordingly, the inheritance pattern and mutation rates observed in IFS as well as PAP and FIPA suggest the existence of additional susceptibility genes and also other modulating factors in somatotropinoma tumorigenesis (3, 7, 8). Identification of additional putative loci for somatotropinoma susceptibility at 2p16–12 and 13q14 supports that view (12, 18). Interestingly, we were able to exclude sequence changes in the somatostatin receptor (*SSTR*) 2 and 5 (*SSTR2* and *SSTR5*) genes as candidate modulating factors of the phenotypic diversity in this family (data not shown). These genes are known to be involved in somatostatin-mediated GH suppression and *SSTR5* variants have been recently described in association with increased GH and IGF levels of patients with sporadic acromegaly (19) and have not been previously examined in familial acromegaly.

The role of *AIP* in sporadic acromegaly and pituitary tu-

mors of other lineages is also starting to be addressed. Germ-line *AIP* mutations were reported in three of 45 patients (6%) with sporadic acromegaly in Finland (3), one of 156 from various European countries (20) and one of 40 from Japan (8), but none of 35 cases in the United States tested specifically for the three original *AIP* mutations (9). Our own preliminary data suggest that the contribution of *AIP* to sporadic acromegaly in Brazilian patients may also be limited (no mutation found in 20 cases, data not shown). We were also able to exclude mutations in the *AIP* coding sequence in a mother-daughter pair with ACTH-secreting pituitary adenomas (Toledo, R. A., and P. L. M. Dahia, unpublished data). This is in agreement with data from Daly *et al.* (7) and suggests that mutation prevalence may be related to not only population genetic backgrounds but also specific pituitary lineages. The continuing analysis of multiethnic cohorts of pituitary adenomas of various lineages will precisely define *AIP*'s role in pituitary tumorigenesis.

Identification of *AIP* mutations increases the spectrum of molecular defects that can give rise to pituitary adenoma susceptibility. The mechanisms of tumor formation due to disruption of this gene and the basis for the variable clinical phenotype are still unknown. Currently due to the scattered nature of the mutations, it is not possible to establish a precise relationship between type or site of mutations and clinical disease. In the near future, however, it is reasonable to suppose that *AIP* may develop into a screening tool relevant for genetic counseling and clinical surveillance of families with pituitary tumors.

Acknowledgments

Received November 1, 2006. Accepted February 27, 2007.

Address all correspondence and requests for reprints to: Sergio Toledo, Unidade de Endocrinologia Genética, Av Dr Arnaldo 455-5º andar, São Paulo-SP, Brazil 01246-903. E-mail: toledo@usp.br; or Patricia Dahia, Department of Medicine, University of Texas Health Science Center, San Antonio, 7703 Floyd Curl Drive, MC 7880, San Antonio, Texas 78229. E-mail: dahia@uthscsa.edu.

This work was supported by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) Grant 02/09860-8. R.A.T. and D.M.L. are recipients of Fundação Faculdade de Medicina fellowships. S.P.A.T. is partially supported by Brazilian National Research Council (CNPq). P.L.M.D. is a recipient of a South Texas Health Research Center Junior Faculty Award, an Executive Research Committee New Investigator Award, and a General Clinical Research Center Award.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

References

- Melmed S 2006 Medical progress: acromegaly. *N Engl J Med* 355:2558–2573
- Daly AF, Petrossians P, Beckers A 2005 An overview of the epidemiology and genetics of acromegaly. *J Endocrinol Invest* 28:67–69
- Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gundogdu S, De Menis E, Makinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA 2006 Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the *AIP* gene. *Science* 312:1228–1230
- Frohman LA, Eguchi K 2004 Familial acromegaly. *Growth Horm IGF Res* 14(Suppl A):S90–S96
- Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ciccarelli A, Valdes-Socin H, Rohmer V, Tamburrano G, Borson-Chazot C, Estour B, Ciccarelli E, Brue T, Ferolla P, Emy P, Colao A, De Menis E, Lecomte P, Penfornis F, Delemer B, Bertherat J, Wemeau JL, De Herder W, Archambeaud F, Stevenaert A, Calender A, Murat A, Cavagnini F, Beckers A 2006 Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3316–3323
- Gadelha MR, Prezant TR, Une KN, Glick RP, Moskal 2nd SF, Vaisman M, Melmed S, Kineman RD, Frohman LA 1999 Loss of heterozygosity on chromosome 11q13 in two families with acromegaly/gigantism is independent of mutations of the multiple endocrine neoplasia type I gene. *J Clin Endocrinol Metab* 84:249–256
- Daly AF, Vanbellinghen JF, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, Naves LA, Guitelman MA, Murat A, Emy P, Gimenez-Roqueplo AP, Tamburrano G, Raverot G, Barlier A, De Herder W, Penfornis A, Ciccarelli E, Estour B, Lecomte P, Gatta B, Chabre O, Sabate MI, Bertagna X, Garcia Basavilbaso N, Stalldecker G, Colao A, Ferolla P, Wemeau JL, Caron P, Sadoul JL, Oneto A, Archambeaud F, Calender A, Sinilnikova O, Montanana CF, Cavagnini F, Hana V, Solano A, Delettieres D, Luccio-Camelo DC, Basso A, Rohmer V, Brue T, Bours V, Teh BT, Beckers A 2007 Aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1891–1896
- Iwata T, Yamada S, Mizusawa N, Golam H, Sano T, Yoshimoto K 2007 The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene is rarely mutated in sporadic GH-secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:499–502
- Yu R, Bonert V, Saporta I, Raffel LJ, Melmed S 2006 Aryl hydrocarbon receptor interacting protein variants in sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 91:5126–5129
- Jorge BH, Agarwal SK, Lando VS, Salvatore R, Barbero RR, Abelin N, Levine MA, Marx SJ, Toledo SP 2001 Study of the multiple endocrine neoplasia type 1, growth hormone-releasing hormone receptor, *Gsa*, and *Gi2a* genes in isolated familial acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 86:542–544
- Sandrine F, Kirschner LS, Bei T, Farmakidis C, Yasufuku-Takano J, Takano K, Prezant TR, Marx SJ, Farrell WE, Clayton RN, Groussin L, Bertherat J, Stratakis CA 2002 *PRKAR1A*, one of the Carney complex genes, and its locus (17q22–24) are rarely altered in pituitary tumours outside the Carney complex. *J Med Genet* 39:e78
- Gadelha MR, Une KN, Rohde K, Vaisman M, Kineman RD, Frohman LA 2000 Isolated familial somatotropinomas: establishment of linkage to chromosome 11q13.1–11q13.3 and evidence for a potential second locus at chromosome 2p16–12. *J Clin Endocrinol Metab* 85:707–714
- Meyer BK, Petrusis JR, Perdew GH 2000 Aryl hydrocarbon (Ah) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones* 5:243–254
- Carver LA, LaPres JJ, Jain S, Dunham EE, Bradfield CA 1998 Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J Biol Chem* 273:33580–33587
- Amrani N, Sachs MS, Jacobson A 2006 Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:415–425
- Tanaka C, Yoshimoto K, Yamada S, Nishioka H, Ii S, Moritani M, Yamaoka T, Itakura M 1998 Absence of germ-line mutations of the multiple endocrine neoplasia type 1 (*MEN1*) gene in familial pituitary adenoma in contrast to *MEN1* in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab* 83:960–965
- Soares BS, Eguchi K, Frohman LA 2005 Tumor deletion mapping on chromosome 11q13 in eight families with isolated familial somatotropinoma and in 15 sporadic somatotropinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6580–6587
- Donangelo I, Araujo PB, Antenuzi D, Farage M, Marcondes J, Filho PN, Gadelha MR 2005 Tumor deletion mapping of chromosomal region 13q14 in 43 growth hormone secreting pituitary adenomas. *Endocrine* 28:131–136
- Filopanti M, Ronchi C, Ballare E, Bondioni S, Lania AG, Losa M, Gelmini S, Peri A, Orlando C, Beck-Peccoz P, Spada A 2005 Analysis of somatostatin receptors 2 and 5 polymorphisms in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4824–4828
- Barlier A, Vanbellinghen JF, Daly AF, Silvy M, Jaffrain-Rea ML, Trouillas J, Tamagno G, Cazabat L, Bours V, Brue T, Enjalbert A, Beckers A 2007 Mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene are not highly prevalent among subjects with sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1952–1955

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

MINI-REVIEW - Frontiers of Hormone Research

Genetics of Familial Isolated Pituitary Adenoma: Evidence for multi-genetic disease.

Rodrigo A. Toledo, Delmar M. Lourenço-JR, Sergio P. A. Toledo

Endocrine Genetics Unit (LIM-25), Endocrinology, Hospital das Clínicas, University of São Paulo, School of Medicine, São Paulo, Brazil.

Words: abstract (168 words), text (2363).

Corresponding authors:

Sergio P. A. Toledo, MD, Professor

Rodrigo A. Toledo, PhD

Address:

Av. Dr. Arnaldo, 455 - 5º andar

Cerqueira Cesar, 012406-903

São Paulo, Brazil

Tel: (+5511) 3061-7226

Fax: (+5511) 3061-7252

Email: toldo@usp.br

Email: toledorodrigo@usp.br

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to declare.

Grants: The study was partially supported by São Paulo State Research Foundation (FAPESP) Grant #08/58552-0 and School of Medicine Foundation (FFM). RAT holds a CAPES fellowship, DML-JR holds a FAPESP Post-Doc Fellowship, and SPAT is partially supported by FFM.

ABSTRACT

The identification of mutations in the *Aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP)* gene in a subset of cases with familial isolated pituitary adenoma (FIPA) has recently expanded our knowledge on the pathophysiology of inherited pituitary adenomas disorders. However, the genetic causes of the majority (85%) of the overall FIPA families and of half of the families with isolated familial somatotropinoma (IFS) are still not determined. Several studies and reviews have assessed the clinical and genetic features of *AIP*-mutated FIPA patients, which may range from complete asymptomatic adults/elders to patients with large, early-onset and aggressive pituitary tumors. Herein, we aimed to briefly revise data on the 11q13 locus and other loci potentially implicated in genetic susceptibility to FIPA: 2p16-12; 3q28; 4q32.3-4q33; chr 5, 8q12.1, chr 14, 19q13.4 and 21q22.1. These candidate regions may contain unidentified gene(s) mutated in *AIP*-negative FIPA families. Worthwhile, the better knowledge of these susceptibility loci may disclose modifier genes possibly playing role of deteriorating or protective effects on the marked phenotypic diversity of *AIP*-mutated families.

Introduction

The prevalence of pituitary adenomas has been largely underestimated. Recent data indicate that about 10% of the healthy population may present pituitary abnormalities compatible with silent pituitary adenomas [1]. Autopsy studies revealed that 6 to 22% of the investigated individuals had developed pituitary tumors [2] and the overall rate of symptomatic pituitary adenomas in general population is about 1 in 1.000 [3].

Although the majority of the pituitary adenomas are sporadic, up to 5% of the patients may present the familial forms of the disease that are usually associated with inherited multiglandular neoplastic syndromes, such as multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and Carney complex (CNC), or with an entity that seems to involve exclusively the pituitary gland, familial isolated pituitary adenoma (FIPA) [4-6]. FIPA is defined as the occurrence of pituitary adenomas of any tumour type among ≥ 2 related family members in the absence of MEN1 or Carney complex. Importantly, nearly all types of anterior pituitary adenomas have been described in FIPA families, which may be classified as presenting a heterogeneous FIPA (relatives with different types of pituitary tumors) or a homogenous FIPA (all relatives with the same type of pituitary tumor) [6], as isolated familial somatotropinoma (IFS) [7].

During the last decade, our knowledge on the genetic susceptibility to familial pituitary disorders has greatly increased due to the identification of the genes responsible for MEN1 and CNC syndromes [8,9]. Approximately 80% of patients with MEN1 and up to 60% of cases with CNC harbor germline mutations in the *MEN1* and *PRKAR1A* genes, respectively. The observed loss of the remaining wild-type allele in tumor samples of MEN1 and CNC patients indicates that these two genes present tumor suppressor roles. Recently, a first gene associated with FIPA, the *aryl hydrocarbon receptor interacting protein* (*AIP*), has been identified [10]. However, germline mutations in the *AIP* gene occur of only about 15% of the FIPA families and 50% of the IFS families, indicating for additional undetermined FIPA susceptibility gene(s) [11]. Interestingly, the highly variable (usually low) penetrance of pituitary disease and the marked phenotypic diversity observed in *AIP*-mutated families strongly also suggest that other modifier genes may be playing a role in FIPA [12,13].

Herein, we focused to collect and review the already identified candidate loci potentially underlying the genetic susceptibility to FIPA. In the near future, further investigation of these loci may greatly increase our overall understanding of the familial pituitary disorders.

The 11q13 locus and the *AIP* gene

The identification of 11q13-LOH in somatotropinomas of IFS patients has, accordingly to the Knudson's two-hit hypothesis for tumorigenesis, implicated the 11q13 locus in FIPA [14,15]. Gadelha *et al.* documented positive linkage to 11q13 in IFS and further studies were able to narrow down the candidate region to 11q13.1 – 11q13.3 [16-18]. Subsequently, as up to 40% of the *MEN1* patients may develop pituitary tumors, the *MEN1* gene (11q13) has been screened in FIPA, however no mutations were identified in several studied families [17-21].

In 2006, Vierimaa and colleagues combined comprehensive single nucleotide polymorphism and expression analysis to investigate a large Finnish pedigree with pituitary adenoma predisposition (PAP) and were able to describe the first germline mutations and somatic inactivations in the *AIP* gene [ref. 22; and revised in ref. 23]. The *AIP* gene, also known as *ARA9* or *XAP2*, is located at the 11q13.3 and encodes for the AIP protein, which contains one FKBP-homology and three tetratricopeptide domains [24-25]. Throughout these domains, AIP interacts with several partners, such as AHR (dioxin receptor), HSP90, PDE2A, PDE4A5, PRAR and surviving protein. Although the definitive pathophysiological mechanisms of AIP are yet to be clarified, there are strong evidences indicating that *AIP* acts as a tumor suppressor gene through cAMP regulation by interaction with phosphodiesterases (PDE) type 2A and type 4A [26,27]. Recently, Leontiou *et al.* have further investigated naturally occurring *AIP* mutations shown that mutant AIP proteins lacks it's interaction *in vitro* with phosphodiesterase type 4A (PDE4A) [28].

To date, about thirty different *AIP* inactivating mutations have been identified: they occur scattered throughout the gene, present incomplete penetrance and may lead to variable pituitary disease expressivity. Although the most frequent pituitary adenomas observed in *AIP* mutation carriers are GH-, GH/PRL- and

PRL-secreting, ACTH-secreting and non-secreting pituitary adenomas have been also reported [10-12]. Importantly, early-onset, large and aggressive pituitary tumors are observed within the *AIP*-mutated FIPA families. The readers can find detailed reviews of the clinical, molecular and genetic features of large cohorts with FIPA in the recent reviews by Daly *et al.* [29,30]. Cazabat *et al.* proposed a genotype:phenotype correlation: patients with *AIP* mutations resulting in a truncated protein are significantly younger than those bearing a mutation which preserves the structure of the C-terminal end of the protein [31].

Thus, the identification of *AIP* mutations has largely broadened the spectrum of molecular defects that can give rise to familial pituitary adenoma susceptibility. However, even when analysis of large mutations was performed, the majority of the overall FIPA genealogies (>70%) still have no identified genetic etiology indicating for the existence of other FIPA gene(s), as discussed below.

ADDITIONAL SUSCEPTIBILITY GENES/LOCI TO FIPA

11q13 (non-*AIP*)

It has been demonstrated that both *MEN1* and *AIP* 11q13-genes play an important role on the pituitary cells, as *MEN1*- and *AIP*-mutated patients are prone to develop almost all anterior pituitary tumor types [11,32]. The potential unidentified susceptibility gene(s) to FIPA might be located at the 11q13 region or at other chromosome regions. In this regard, interesting data at the somatic level on the analysis of the familial pituitary tumors are available. It seems that 50% of the IFS patients with somatotropinomas presenting 11q13-LOH have a *AIP* germline mutation [28]. These data argue for the hypothesis that an additional tumor suppressor gene at 11q13 would be implicated in familial pituitary syndromes. If this gene is really there, 11q13 could be considered a gene cluster potentially implicated in the pituitary tumorigenesis. Thus, it would be interesting to search whether the amplitude of somatic losses at specific candidate areas of this cluster would be associated with tumor aggressiveness.

CDKN1B / p27Kip1

Pellegata *et al.* recently shown that germline mutations in the *cdkn1b* gene, which encodes the *p27Kip1* cyclin-dependent kinase inhibitor 1B cause the MENX syndrome in rats, a condition is characterized by the occurrence of multiple MEN1- and MEN2-related tumors [33-34]. In the study, the authors also reported the first *CDKN1B* germline mutation identified in humans. The mutation was found in one family with a MEN1-like phenotype (MEN4 syndrome), involving cases with acromegaly, hyperparathyroidism, renal angiomyolipoma and testicular cancer [34]. Subsequently, another *CDKN1B* germline mutation was described in one sporadic MEN1 patient with pituitary adenoma (Cushing's disease) [35].

Recently, three other novel mutations were identified in a large cohort of patients with MEN1-states without a detectable *MEN1* mutation [36]. On contrary to the previous reports, none of these later *CDKN1B*-positive patients had developed pituitary adenomas. These data suggested that the tumoral susceptibility caused by *CDKN1B* mutations warrants further characterization and that the association of *CDKN1B* mutations with pituitary disease may be lower than previously thought. Recently, the *CDKN1B* gene was screened in an international cohort of 86 FIPA families and no significant association has been identified, suggesting that the *CDKN1B* gene may not play an important role in the etiology of FIPA kindreds [37].

Using automated direct sequencing, we have recently analyzed in our laboratory three additional FIPA families for *CDKN1B* and no detectable mutation has been found (Toledo RA, unpublished data), however the analysis for large deletions of *CDKN1B* has not been performed in above cited studies. Beside mutations in *CDKN1B*, Agarwal *et al.* have shown rare germline mutations in other genes encoding cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKI; *CDKN2B/p15INK4b*, *CDKN2C/p18-INK4C*, *CDKN1A/p21CIP1*) in the studied NIH cohort [36]. Mutation of *CDKN1A/p21CIP1* was associated with pituitary tumors (macroprolactinomas). Overall, role of the CDKI genes in susceptibility to familial pituitary is still undetermined due to the limited number of mutated patients reported.

2p16-12

Stratakis *et al* have identified the 2p16 chromosome region as the second locus for the Carney complex (CNC-2), a familial tumoral endocrine syndrome that involves skin and cardiac myxomas, Cushing syndrome, and acromegaly (in up to 10% of the cases) [38]. In further studies, this research group has assessed tumors from patients with CNC, including one GH-secreting pituitary adenoma, and documented amplification of 2p16, indicating that this region is likely to contain proto-oncogene(s) related to the endocrine tumorigenesis and CNC-2 [39].

Gadelha *et al*. have shown that the 2p16/CNC-2 region is potentially implicated in IFS, as a suggestive linkage (LOD-score = 2.5) was obtained [16]. Interestingly, a pituitary adenoma sample from an IFS patient could be assessed and no LOH was observed, which strengthens the hypothesis that a proto-oncogene rather than a tumor suppressor gene may occur in this region. Stratakis and Kirschner have used the genetic data reported by Gadelha *et al* [16] to recalculate the LOD scores applying different assumptions and parameters: the analysis yielded two-point LOD score of up to 3.0 in one IFS family [40]. As far as we known, no other report on the potential role of the 2p16/CNC-2 region in FIPA has been published to date.

3q28, 4q32.3-4q33, Chr 5, 8q12.1, Chr 14, 19q13.4 and 21q22.1

In Vierimaa's *et al* study, besides 11q13.3, suggestive linkages have been observed to 4q32.3-4q33, chromosomes 5, 8 and 14, indicating for potential additional susceptibility loci to pituitary tumors [10]. Although after the removal of linkage disequilibrium only the 11q13 region remained with a LOD-score higher than 3.0, it would be worthwhile to further analyze the 4q32.3-4q33 region, as well as chromosomes 5, 8 and 14 loci in additional FIPA families, as they may contain FIPA susceptibility gene(s) not yet identified. Further, also using a genome-wide strategy, Khoo *et al*. have studied a large family with acromegaly harboring a germline *AIP* mutation [41]. They were able to identify the region previously reported by Vierimaa, 8q12.1, as well as three novel potential FIPA susceptibility loci: 3q28, 19q13.4, and 21q22.1 (ref). No further

report in FIPA families has been published on genes at these novel candidate regions to FIPA.

MODIFIER GENES IN *AIP*-MUTATED FAMILIES

The knowledge that *AIP*-mutation positive carriers may develop large, early-onset, and aggressive pituitary tumors has an important clinical impact regarding the management of FIPA families. However, several studies including our own, have demonstrated that *AIP*-mutated patients, even within the same families, may present marked variation in the phenotypic presentation and disease outcome [11-13]. For example, we have described the novel Y268X *AIP* germline mutation in a IFS family with two siblings presenting with early-onset acromegaly (~20 y-old) due to large pituitary tumors, which we follow in our Hospital for 30 years; interestingly, the *AIP* mutation was also present in an asymptomatic brother with 41 y-old [12]. Furthermore, in a large FIPA family with ten *AIP*-mutated relatives described by Naves et al, only three of them developed pituitary tumors, in accordance with the original report of Vierimaa *et al.* that *AIP* mutation is associated with incomplete (probably median/low) penetrance of pituitary disease [10]. On the genetic point of view, these clinical-genetic data argue for the existence of modulating factors in FIPA families harboring a germline mutation in the *AIP* gene.

To address the wide phenotypic variation observed in the IFS relatives harboring the Y268X *AIP* mutation, we selected to study the genes encoding the somatostatin receptors 2 and 5 (*SSTR2* and *SSTR5*), as these receptors are known to be involved in somatostatin-mediated GH suppression and *SSTR5* variants had been previous described in association with higher GH and IGF levels within patients with sporadic acromegaly [12]. To our knowledge, this was the first study that approached the hypothesis of possible modifier genes in FIPA. In an ongoing study in our laboratory, we had the opportunity to expand the analysis on potentially modifier genes in this IFS family and confirmed putative involvement of other susceptibility genes in FIPA families bearing *AIP* mutations (Toledo RA, unpublished data; partially presented during the Pituitary Today Meeting 2008; Angra dos Reis, Brazil). Recently, Khoo *et al.* have identified the 3q28, 8q12.1, 19q13.4 and 21q22.1 regions as suggestive

modifier loci (LOD-scores between 1.1 and 2.2) in a large FIPA family from Borneo harboring a *AIP* mutation [41]. Further comprehensive investigations on the role of known (and novel) susceptibility loci in FIPA are warrant to the better understanding of the underlying causes acting upon the FIPA phenotype that could possibly explain the low penetrance and the wide clinical range observed in FIPA families.

SUMMARY

- The *AIP* gene is the only identified susceptibility gene to FIPA so far. *AIP* germline mutations occur in approximately 15% of the FIPA families and 50% of the IFS families.
- *AIP* germline mutations are accompanied by loss of the wild-type allele in the pituitary tumors, suggesting for a tumor suppressor role of *AIP*.
- Patients positive for *AIP* mutations are prone to larger and early-onset pituitary tumors comparing with cases with sporadic pituitary tumors.
- *AIP* mutations are associated with susceptibility to nearly all types of adenomas of the anterior pituitary glands, although GH-; GH/PRL-; PRL-secreting are the more frequent.
- The wide inter- and intra-familial phenotypic variation and the highly variable (usually low) penetrance of pituitary disease observed in patients bearing *AIP* mutations suggest for the existence of modifier genes playing role in FIPA.
- There is evidence for a second FIPA gene at 11q13 (besides *AIP*) as only a subset of IFS patients with somatotropinomas presenting 11q13-LOH harbors a *AIP* germline mutation.
- The *CDKN1B/p27Kip1* gene seems not to play an important role in the etiology of FIPA.
- Several loci with suggestive linkage to FIPA have been identified: 3q28, 4q32.3-4q33, Chr 5, 8q12.1, Chr 14, 19q13.4 and 21q22.1. These loci may contain unidentified genes causative of FIPA and/or genes that may play role as phenotypic modifiers in FIPA families.
- Suggestive linkage to IFS and 2p16 has been reported. This locus has positive linkage to a subset of families with Carney complex (CNC-2). No 2p16-LOH was observed in pituitary tumors of patients with IFS and CNC. Amplification of 2p16 has been demonstrated in CNC tumors (including pituitary adenomas), suggesting that a proto-oncogene involved in the endocrine tumorigenesis is likely to exist in this locus.

References

- 1) Hall WA, Luciano MG, Doppman JL, Patronas NJ, Oldfield EH: Pituitary magnetic resonance imaging in normal human volunteers: occult adenomas in the general population. *Ann Intern Med* 1994; 120; 817– 820.
- 2) Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, McCutcheon IE: The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* 2004; 101; 613-9
- 3) Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA, Beckers A: High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4769–4775.
- 4) Agarwal SK, Ozawa A, Mateo CM, Marx SJ: The MEN1 gene and pituitary tumours. *Horm Res* 2009; 71; 131-8
- 5) Boikos SA, Stratakis CA. Pituitary pathology in patients with Carney Complex: growth-hormone producing hyperplasia or tumors and their association with other abnormalities. *Pituitary* 2006; 9; 203-9.
- 6) Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ciccarelli A, Valdes-Socin H, Rohmer V, Tamburrano G, Borson-Chazot C, Estour B, Ciccarelli E, Brue T, Ferolla P, Emy P, Colao A, De Menis E, Lecomte P, Penfornis F, Delemer B, Bertherat J, Wémeau JL, De Herder W, Archambeaud F, Stevenaert A, Calender A, Murat A, Cavagnini F, Beckers A: Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91; 3316-23
- 7) Soares BS, Frohman LA: Isolated familial somatotropinoma. *Pituitary* 2004; 7; 95-101
- 8) Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR, Debelenko LV, Zhuang Z, Lubensky IA, Liotta LA, Crabtree JS, Wang Y, Roe BA, Weisemann J, Boguski MS, Agarwal SK, Kester MB, Kim YS, Heppner C, Dong Q, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ: Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science* 1997; 276; 404-407.
- 9) Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, Stratakis CA: Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet* 2000; 26; 89-92
- 10) Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gündogdu S, De Menis E, Mäkinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA: Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science* 2006; 312; 1228-30
- 11) Daly AF, Vanbellinghen JF, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, Naves LA, Guitelman MA, Murat A, Emy P, Gimenez-Roqueplo AP, Tamburrano G, Raverot G, Barlier A, De Herder W, Penfornis A, Ciccarelli E, Estour B, Lecomte

P, Gatta B, Chabre O, Sabaté MI, Bertagna X, Garcia Basavilbaso N, Stalldecker G, Colao A, Ferolla P, Wémeau JL, Caron P, Sadoul JL, Oneto A, Archambeaud F, Calender A, Sinilnikova O, Montañana CF, Cavagnini F, Hana V, Solano A, Delettieres D, Luccio-Camelo DC, Basso A, Rohmer V, Brue T, Bours V, Teh BT, Beckers A: Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92; 1891-6

12) Toledo RA, Lourenco DM Jr, Liberman B, Cunha-Neto MB, Cavalcanti MG, Moyses CB, Toledo SPA, Dahia PL: Germline mutation in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene in familial somatotropinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92; 1934-1937

13) Naves LA, Daly AF, Vanbellinhen JF, Casulari LA, Spilioti C, Magalhães AV, Azevedo MF, Giacomini LA, Nascimento PP, Nunes RO, Rosa JW, Jaffrain-Rea ML, Bours V, Beckers A: Variable pathological and clinical features of a large Brazilian family harboring a mutation in the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene. *Eur J Endocrinol* 2007; 157; 383-91

14) Yamada S, Yoshimoto K, Sano T, Takada K, Itakura M, Usui M, Teramoto A: Inactivation of the tumor suppressor gene on 11q13 in brothers with familial acrogigantism without multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82; 239-42.

15) Gadelha MR, Prezant TR, Une KN, Glick RP, Moskal SF 2nd, Vaisman M, Melmed S, Kineman RD, Frohman LA: Loss of heterozygosity on chromosome 11q13 in two families with acromegaly/gigantism is independent of mutations of the multiple endocrine neoplasia type I gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84; 249-56

16) Gadelha MR, Une KN, Rohde K, Vaisman M, Kineman RD, Frohman LA: Isolated familial somatotropinomas: establishment of linkage to chromosome 11q13.1-11q13.3 and evidence for a potential second locus at chromosome 2p16-12. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85; 707-14.

17) Luccio-Camelo DC, Une KN, Ferreira RE, Khoo SK, Nickolov R, Bronstein MD, Vaisman M, Teh BT, Frohman LA, Mendonça BB, Gadelha MR: A meiotic recombination in a new isolated familial somatotropinoma kindred. *Eur J Endocrinol* 2004; 150; 643-8

18) Soares BS, Eguchi K, Frohman LA: Tumor deletion mapping on chromosome 11q13 in eight families with isolated familial somatotropinoma and in 15 sporadic somatotropinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90; 6580-7

19) Teh BT, Kytölä S, Farnebo F, Bergman L, Wong FK, Weber G, Hayward N, Larsson C, Skogseid B, Beckers A, Phelan C, Edwards M, Epstein M, Alford F, Hurley D, Grimmond S, Silins G, Walters M, Stewart C, Cardinal J, Khodaei S, Parente F, Tranebjaerg L, Jorde R, Salmela P: Mutation analysis of the MEN1 gene in multiple endocrine neoplasia type 1, familial acromegaly and familial isolated hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83; 2621-6

- 20) Jorge BH, Agarwal SK, Lando VS, Salvatori R, Barbero RR, Abelin N, Levine MA, Marx SJ, Toledo SP: Study of the multiple endocrine neoplasia type 1, growth hormone-releasing hormone receptor, Gs alpha, and Gi2 alpha genes in isolated familial acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86; 542-4
- 21) De Menis E, Prezant TR: Isolated familial somatotropinomas: clinical features and analysis of the MEN1 gene. *Pituitary* 2002; 5; 11-5
- 22) Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gündogdu S, De Menis E, Mäkinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA: Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science* 2006; 312; 1228-30
- 23) Karhu A, Aaltonen LA. Susceptibility to pituitary neoplasia related to MEN-1, CDKN1B and AIP mutations: an update. *Hum Mol Genet.* 2007 Apr 15;16 Spec No 1:R73-9.
- 24) Carver LA, LaPres JJ, Jain S, Dunham EE, Bradfield CA: Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J Biol Chem* 1998; 273; 33580–33587
- 25) Meyer BK, Petrusis JR, Perdew: GH Aryl hydrocarbon (Ah) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones* 2000; 5; 243–254
- 26) Bolger GB, Peden AH, Steele MR, MacKenzie C, McEwan DG, Wallace DA, Huston E, Baillie GS, Houslay MD: Attenuation of the activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 by interaction with the immunophilin XAP2. *J Biol Chem* 2003; 278; 3351-3363
- 27) de Oliveira SK, Hoffmeister M, Gambaryan S, Muller-Esterl W, Guimaraes JA, Smolenski AP: Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 2007; 282; 13656-13663
- 28) Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JA, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A Jr, Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, Peters G, Bolger GB, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M: The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93; 2390-2401.
- 29) Daly AF, Tichomirow MA, Beckers A: Update on familial pituitary tumors: from multiple endocrine neoplasia type 1 to familial isolated pituitary adenoma. *Horm Res* 2009; 71 Suppl 1; 105-11

- 30) Daly AF, Tichomirowa MA, Beckers A: Genetic, molecular and clinical features of familial isolated pituitary adenomas. *Horm Res* 2009; 71 Suppl 2; 116-22
- 31) Cazabat L, Guillaud-Bataille M, Bertherat J, Raffin-Sanson ML: Mutations of the gene for the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in pituitary adenomas. *Horm Res*. 2009; 71;132-41.
- 32) Vergès B, Boureille F, Goudet P, Murat A, Beckers A, Sassolas G, Cougard P, Chambe B, Montvernay C, Calender A: Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87; 457-65
- 33) Piotrowska K, Pellegata NS, Rosemann M, Fritz A, Graw J, Atkinson MJ: Mapping of a novel MEN-like syndrome locus to rat chromosome 4. *Mamm Genome* 2004; 15; 135-41.
- 34) Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Höfler H, Fend F, Graw J, Atkinson MJ: Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:15558-63
- 35) Georgitsi M, Heliövaara E, Paschke R, Kumar AV, Tischkowitz M, Vierimaa O, Salmela P, Sane T, De Menis E, Cannavò S, Gündogdu S, Lucassen A, Izatt L, Aylwin S, Bano G, Hodgson S, Koch CA, Karhu A, Aaltonen LA: Large genomic deletions in AIP in pituitary adenoma predisposition. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93; 4146-51
- 36) Agarwal SK, Mateo CM, Marx SJ: Rare germline mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes in multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94; 1826-34.
- 37) MA Tichomirowa, AF Daly, J Pujol, L Naves, P Rodien, JF Vanbellinghen, ML Jaffrain-Rea, V Rohmer, B Estour, P Lecomte, F Borson-Chazot, A Penfornis, M Yaneva, S Zacharieva, JL Wemeau, MC Vantyghem, E Cicarelli, A Colao, P Ferolla, R Cozzi, F Cavagnini, W de Herder, F Archambeaud, D Gaillard, C Fajardo Montanana, JL Sadoul, K von Werder, M Guitelman, V Bours, A Barlier, N Pellegata, A Beckers: An Analysis of the Role of Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B (*CDKN1B*) Gene Mutations in 86 Families with Familial Isolated Pituitary Adenomas (FIPA). The Annual Meeting of The Endocrine Society 2009, Whashington, Poster P2-118.
- 38) Stratakis CA, Carney JA, Lin JP, Papanicolaou DA, Karl M, Kastner DL, Pras E, Chrousos GP: Carney complex, a familial multiple neoplasia and lentiginosis syndrome. Analysis of 11 kindreds and linkage to the short arm of chromosome 2. *J Clin Invest* 1996; 97; 699-705
- 39) Matyakhina L, Pack S, Kirschner LS, Pak E, Mannan P, Jaikumar J, Taymans SE, Sandrini F, Carney JA, Stratakis CA: Chromosome 2 (2p16) abnormalities in Carney complex tumours. *J Med Genet* 2003; 40:268-77

40) Stratakis CA, Kirschner LS: Isolated familial somatotropinomas: does the disease map to 11q13 or to 2p16? *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85; 4920-1.

41) Khoo SK, Pendek R, Nickolov R, Luccio-Camelo DC, Newton TL, Massie A, Petillo D, Menon J, Cameron D, Teh BT, Chan SP. Genome-wide scan identifies novel modifier loci of acromegalic phenotypes for isolated familial somatotropinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2009; [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19443539

Table 1: Genetics of Familial pituitary adenoma syndromes

Syndrome	Susceptibility Genes/Loci	Evidence	Pituitary disease	Ref
MEN1	<i>MEN1</i> (11q13)	Germline mutation, LOH	Mostly prolactinomas, non-secreting adenomas, GH-secreting adenomas	Larson Chandra Verges Agarwal
CNC	<i>PPKR1A</i> (17q22-24)	Germline mutation, LOH	GH- and GH/PRL-secreting adenomas	Kirschner
	2p16 – CNC2 oncogene (?)	Positive linkage	GH-secreting adenoma	Stratakis
MEN4	<i>CDKN1B/p27Kip1</i>	Germline mutation	GH-secreting (familial) and ACTH-secreting (sporadic) adenomas ^{##}	Pellegata Georgtis JCEM
FIPA	<i>AIP</i>	Germline mutation, LOH	GH-, PRL-, GH/PRL-, ACTH-, TSH-secreting and non-secreting adenomas	Vierima, Daly, Toledo
	Other TSG gene at 11q13	11q13 LOH in somatotropinomas from IFS patients without <i>AIP</i> mutation	GH-secreting adenomas	Leontiou
	2p16 CNC2 oncogene (??)	Suggestive/Positive linkage	GH-secreting adenomas	Gadelha, Stratakis Toledo unpublished
	3q28	Suggestive linkage LOD = 1.1	GH-secreting adenoma only GH-, PRL-, GH/PRL-secreting adenomas	Khoo, 2009
	4q32.3-4q33	Suggestive linkage LOD = 3.15*		Vierimaa
	Chr 5	Suggestive linkage LOD = 3.21*		Vierimaa
	Chr 8	Suggestive linkage LOD = 3.08*		Vierimaa
	8q12.1	Suggestive linkage LOD = 1.8		Khoo, 2009
	Chr 14	Suggestive linkage LOD = 3.59*		Vierimaa
	19q13.4	Suggestive linkage LOD = 2.2		Khoo, 2009

	21q22.1	Suggestive linkage LOD = 1.4		Khoo, 2009
MEN1- related states	<i>CDKN2B/p15INK4b</i>	Gemline mutation (rare)	The N41D and L64R identified pathological mutations were not associated with pituitary tumors ^{##}	Agarwal, 2009
	<i>CDKN2C/p18-INK4C</i>	Gemline mutation (rare)	The V31L identified pathological mutation was not associated with pituitary tumors ^{##}	
	<i>CDKN1A/p21CIP1</i>	Gemline mutation (rare)	PRL-secreting adenoma ^{##}	
	<i>CDKN1B/p27Kip1</i>	Gemline mutation (rare)	The ATG-7G>C; P95S and stop>Q (TAA/CAA) identified pathological mutations were not associated with pituitary tumors ^{##}	

*After linkage disequilibrium removal, these LOD scores were not significant anymore (Vierimaa O, 2006 Online supplemental data).

^{##} = A more complete characterization of the phenotype of the patients harboring mutations in the genes encoding cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) is still in progress as to date few patients harboring mutations have been reported.

Syndromes (OMIM): MEN1 = Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (131100); CNC = Carney Complex (type 1, 160980) (type 2, 605244); MEN4 = Multiple Endocrine Neoplasia type 4 (MEN1-like) (610755); FIPA = Familial isolated pituitary adenoma (102200).

Clinical Endocrinology

Germline mutation and somatic loss of the AIP in pituitary and nonpituitary endocrine tumors of patients from a FIPA family.

Journal:	<i>Clinical Endocrinology</i>
Manuscript ID:	CEN-2009-000643
Manuscript Type/Office:	10 Rapid Communication
Date Submitted by the Author:	02-Sep-2009
Complete List of Authors:	<p>Toledo, Rodrigo; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Unidade de Endocrinologia Genética LIM25</p> <p>Mendonça, Berenice B; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42</p> <p>Fragoso, Maria Candida B V; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42</p> <p>Longuini, Viviane C; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Unidade de Endocrinologia Genética LIM25</p> <p>Almeida, Madson; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42</p> <p>Junior, Delmar Muniz L; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Unidade de Endocrinologia Genética LIM25</p> <p>Soares, Ibere Cauduro; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Unidade de Patologia Hepática LIM14</p> <p>Mariani, Beatriz; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42</p> <p>Buscarilli, Michelle; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Unidade de Endocrinologia Genética LIM25</p> <p>Alves, Venancio; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Unidade de Patologia Hepática LIM14</p>

	Bronstein, Marcello; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Unidade de Neuroendocrinologia Toledo, Sergio; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Unidade de Endocrinologia Genética LIM25
Key Words:	Familial acromegaly, Pituitary, IFS, FIPA, AIP, Adrenal

For Peer Review

Germline mutation and somatic loss of the AIP in pituitary and nonpituitary endocrine tumors of patients from a FIPA family.

Rodrigo A. Toledo, Berenice B. Mendonca, Maria Candida B. V. Fragoso, Viviane C. Longuini, Madson Q. Almeida, Delmar M. Lourenço-JR, Iberê C. Soares, Beatriz M. P. Mariani, Michelle B. Moraes, Venancio A. Alves, Marcello D. Bronstein, Sergio P. A. Toledo.

Unidade de Endocrinologia Genética, LIM/25 (RAT, VCL, DMLJ, MBM, SPAT); Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular, LIM/42 (BBM, MCBVF, MQA, BMPM); Unidade de Neuroendocrinologia (MDB) da Disciplina de Endocrinologia; Unidade de Patologia Hepática, LIM/14 (ICS, VAA), Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Brazil.

Abbreviated Title: Inactivation of *AIP* in a nonpituitary endocrine tumor in a FIPA patient.

Key words: Familial acromegaly, IFS, FIPA, AIP, LOH, adrenocortical tumor, B-cell lymphoma.

Word Count: Text: 2392 words; Abstract: 231 words.

Figures: 3

Tables: 1

Corresponding authors:

Sergio P. A. Toledo, Professor

Rodrigo A. Toledo, PhD

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo, 455 - 5º andar

Cerqueira Cesar, 012406-903

São Paulo, Brazil

Tel: +5511-30617226

FAX: +5511-30617252

E-mail: toledo@usp.br

Email: toledorodrigo@usp.br

DISCLOSURE STATEMENT: M.D.B. received consultant and lecturing fees from Novartis Pharmaceuticals. The other authors have nothing to declare.

Grants: The study was supported by São Paulo State Research Foundation (FAPESP). R.A.T. holds a PhD fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); D.M.L. and S.P.A.T. are partially supported by Fundação Faculdade de Medicina.

ABSTRACT

Objective Nonpituitary tumors have been reported in a subset of FIPA patients harboring germline mutations in the *AIP* pituitary tumor suppressor gene. However, no further investigation of these tumors has been reported. Here we investigated *AIP* status in pituitary and nonpituitary tumors in a mother-daughter pair with familial acromegaly.

Patients A *MEN1*-negative and *p53*-negative mother-daughter pair with acromegaly due to somatotropinoma. Subsequently, the mother developed a large virilizing adrenocortical carcinoma (ACC), thyroid nodule and grade II B-cell non-Hodgkin's lymphoma.

Design Mutational analysis was performed by automated sequencing; loss-of-heterozygosity (LOH) analysis was carried out by sequencing and microsatellite analysis; *AIP* expression was assessed through quantitative PCR (qPCR) and immunohistochemistry.

Results The functional inactivating mutation c.241C>T (R81X), which blocks *AIP* interaction with phosphodiesterase 4A (PDE4A), was identified in heterozygous state in the leukocyte DNA of both patients. Analysis of the tumoral DNA revealed that the *AIP* wild-type allele was lost in the daughter's somatotropinoma and the mother's ACC. Both tumors displayed low levels of *AIP* protein expression. Low *AIP* gene expression was confirmed by qPCR in the ACC. No evidence of LOH was observed in the DNA sample from the mother's B-cell lymphoma and this tumor displayed normal *AIP* immunostaining.

Conclusions Our data confirmed the role of *AIP* in familial pituitary somatotropinoma and indicated for the first time that the tumor suppressor gene *AIP* may also be implicated in development of nonpituitary tumors.

INTRODUCTION

Acromegaly/gigantism is characterized by excess of GH largely due to GH-secreting pituitary adenomas¹. Although most cases are sporadic, familial forms may occur in association with inherited syndromes such as MEN1, Carney complex (CNC), pituitary adenoma predisposition (PAP) and familial isolated pituitary adenoma (FIPA), which includes isolated familial somatotropinoma (IFS)²⁻⁴.

Germline mutations and somatic inactivation of the *aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP)* gene have been identified in patients with PAP². The role of *AIP* in FIPA patients has been confirmed and more than thirty different *AIP* inactivating mutations scattered throughout the gene have been identified⁵. GH-, GH/PRL- and PRL-secreting pituitary adenomas are the most common clinical features of *AIP* mutation carriers, although ACTH-secreting and non-functioning pituitary adenomas have also been reported^{5,6}. *AIP* mutations accounts for approximately 15% of families with FIPA and in 50% of those with IFS^{3,5}. While *AIP* mutations appears to be very rare in cases with sporadic pituitary disease^{7,8} and in cases suspect of MEN1 without a detectable mutation in the *MEN1* gene⁹, they can be found in children adolescents with GH-secreting tumours, even in the absence of family history¹⁰.

Although no systematic clinical survey of nonpituitary neoplasms has been reported, concomitant nonpituitary tumors, including thyroid, adrenal and MEN1-related tumors were reported in a subset of *AIP* mutation-positive PAP and FIPA families^{10,11} (Prof. Albert Beckers, unpublished data; Drs. Outi Vierimaa and Pasi Salmela, unpublished data). Considering that *AIP*, which is widely expressed, and when mutated fail to interact with phosphodiesterases type 4A (PDE4A) and type 2A (PDE2A), likely causing disruption of the cAMP signaling pathway^{12,13}, and that defects in the cAMP cascade have been implicated in thyroid and adrenal tumorigenesis^{14,15}, mutations in *AIP* could also be expected to predispose to a broader spectrum of endocrine tumors. However, no further genetic investigation of nonpituitary tumors in *AIP*-mutated patients has been performed so far.

In this study we have investigated tumoral samples from a somatotropinoma, an adrenocortical carcinoma and a grade II B-cell non-Hodgkin's lymphoma from a mother-daughter pair with IFS harboring a functional *AIP* germline mutation.

For Peer Review

SUBJECTS

In brief, we have investigated the germline and somatic status of AIP in a previously reported Brazilian family (mother-daughter pair) with early-onset acromegaly (25 y-old and 14 y-old, respectively) due to invasive pituitary macroadenomas, followed in our institution for the last decade¹⁶. Since the initial report of a GH-secreting pituitary adenoma, the index case (mother) has subsequently developed multiple endocrine and non-endocrine neoplasias: virilizing adrenocortical carcinoma, grade II B-cell non-Hodgkin lymphoma and thyroid nodules. As mutations in the *MEN1* and *p53* genes had been previously excluded^{16,17}, we hypothesized that the *AIP* gene could be implicated in the tumor susceptibility observed in these patients. A commercially available RNA/cDNA pool of normal adrenals (N=61) obtained from autopsies (Clontech, Palo Alto, CA), as well as normal pituitary and adrenal tissues also obtained from autopsies, were used as controls. The mother's somatotropinoma and thyroid neoplasm were not available for study. Detailed clinical and genetic information are provided in the following paragraphs.

CLINICAL FEATURES

The index patient was diagnosed with acromegaly due to a pituitary macroadenoma at 25 years of age (1986). MEN1 and CNC syndromes were ruled out in the absence of characteristic biochemical and clinical features of these syndromes (such as hyperparathyroidism and enteropancreatic tumors for MEN1, and spotty skin pigmentation, cutaneous myxomas and Cushing's syndrome for CNC). She underwent transsphenoidal surgery followed by radiotherapy, and exhibited persistently normal basal serum levels of GH and IGF1 after surgery. At present (47 years old), GH and IGF1 levels remain within the normal range and pituitary MRI is normal, indicating that she may have been cured of her pituitary disease.

Thirteen years after pituitary surgery (1999), she presented with virilization and secondary amenorrhea, associated with high serum levels of total testosterone (538 ng/dL; nv, 15-80 ng/dL) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) (>10.000 ng/mL; 350-4300 ng/mL). Abdominal CT scan revealed a large heterogeneous mass (9.0 x 8.9 cm) in the right adrenal gland, involving and

compressing the vena cava and the lower portion of the liver (19). The tumor was surgically excised *en bloc* without rupturing the organ capsule through a classic lombotomy, and right nephrectomy and extensive local lymph nodes resection were performed. Histopathological analysis excluded invasion of local lymph nodes, liver or vena cava, and the tumor was staged as MacFarlane-II and Weiss-III (high nuclear grade, absence of clear cells and diffuse architecture), indicating adrenocortical carcinoma. There has been no biochemical or imaging evidence of tumor recurrence in 9 years of post-surgical follow-up (1999-2008).

At the age of 42 (2001), the patient developed an apparently indolent, slow-growing follicular B-cell non-Hodgkin lymphoma, grade 2 (WHO classification). Immunophenotype was ascertained by immunohistochemical studies of lymph node biopsy samples. Samples stained positive for anti- BCL-2, CD10, CD20 and CD68 antibodies and stained negative for CD3 (in the follicles).

The patient also presented two solid thyroid nodules of 7 mm and 11 mm, without adenomegaly, that had been identified in previous cervical ultrasonograms (1999). Pelvic imaging studies (2001) showed ovaries of 5.1 cm and 7.8 cm, respectively, two ovarian cysts (4.7 cm and 5.5 cm) and up to 2 cm-enlargement of periaortic, cava-aortic and iliac lymph nodes. She underwent hysterectomy due to adenomyosis, and ooforectomy (right ovary) due to enlarged follicle cysts. Both paraffin blocks and frozen tissue samples of the daughter's GH-secreting pituitary adenoma and mother's adrenocortical tumor and B-cell non-Hodgkin lymphoma were available for study. Samples from thyroid and ovarian tissues and the mother's somatotropinoma were not available.

FAMILY HISTORY

The index patient has two daughters (dizygotic twins) and one son (Figure 1A). One of the female twins was evaluated at 14 years of age. She was 167 cm tall and presented with mild acromegaloid features, but no signs of gigantism. GH and IGF-1 serum levels were high whereas prolactin was normal. MRI revealed a large pituitary adenoma with suprasellar extension, as well as invasion of the cavernous and sphenoid sinuses. The tumor was resistant to somatostatin

1
2
3 analog therapy. The patient subsequently underwent two transcranial surgeries,
4 the latter using a transcavernous approach. Histopathological analysis indicated
5 pituitary adenoma and immunohistochemistry was positive for GH. No clinical
6 and biochemical features of MEN1 and CNC syndromes were observed in this
7 patient. She has been followed up periodically since 2000 and adrenal
8 involvement has been excluded by clinical assessment, determination of
9 adrenal steroid levels and imaging studies (abdominal CT scans). The other
10 female twin and the son were clinically and hormonally normal.

11
12 The index patient reported that one of her sisters also exhibited thyroid nodules
13 and that her mother and another sister had ovarian cysts. These individuals
14 were not available for clinical assessment.

15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60

GENETIC (NON-AIP) FEATURES

MEN1 gene

As previously reported, the index patient does not harbor a germline *MEN1* mutation however she and her acromegalic daughter share thirteen microsatellite loci at chromosomal region 11q13¹⁶.

P53 gene

Furthermore, the index patient does not have a germline or somatic R337H *TP53* mutation, which is commonly identified in children and less frequently in adult patients with adrenocortical neoplasms in southern Brazil¹⁷.

METHODS

The present study was approved by the local ethics committee (Cappesq) of our institution (protocol 0437/08). Each patient and all control subjects gave written informed consent.

AIP germline mutation analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood using standard salting-out protocol and PCR reactions were performed as previously described². Sequencing of both DNA strands was performed from purified PCR products using Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and an automated sequencer (ABI Prism 3130xl DNA Analyser, Applied Biosystems).

Loss-of-heterozygosity analysis

Two different approaches (both intragenic and extragenic) were used in order to verify whether the *AIP* wild-type allele was lost in the tumors. First, we performed PCR amplification and automated sequencing. Second, we conducted haplotyping analysis using the D11S1258-11q13 microsatellite marker located close (67,069,747-67,069,958 bp, Ensembl) to the *AIP* gene 11q13.3 locus (67,007,097-67,015,150 bp, Ensembl).

Quantitative mRNA analysis

Quantitative PCR (qPCR) was performed with an ABI Prism 7700 Sequence Detector, using TaqMan Gene Expression Assays (Hs00610222_m1 for *AIP* and 43263 for β -actin) following the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). A cycle threshold (CT) value in the linear range of amplification was selected for each sample in triplicate and normalized to β -actin expression levels. Relative expression levels were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, where $\Delta\Delta CT$ is the difference between the selected ΔCT value of a particular sample and the ΔCT of a pool of 61 normal adrenals obtained from autopsies (Clontech, Palo Alto, CA).

AIP immunohistochemistry

Slides were deparaffinized, hydrated and subsequently incubated in a 10 mM citrate buffer, pH 6.0, on a steamer for 40 min at 95 °C. After several washes, each set of slides was incubated overnight with anti-ARA9/AIP monoclonal primary antibody (clone 35-2, Novus Biologicals, Littleton, CO), and then with Novolink (Vision Biosystems™, Victoria, Au) secondary peroxidase short polymer system.

Detailed information on qPCR and immunohistochemistry protocols can be obtained upon request.

For Peer Review

RESULTS

AIP germline status in the IFS patients

A heterozygous nucleotide change c.241C>T (R81X) in exon 2 of *AIP* was identified in genomic DNA samples from the two patients (mother and daughter) with acromegaly (Fig. 1). The R81X is a known functional mutation predicted to lead to a truncated protein lacking the tetratricopeptide repeat (TPR) carboxy terminal domains essential to the AIP binding to the aryl hydrocarbon receptor (AHR) and heat shock 90 (HSP90)¹⁸. Previous *in vitro* studies of the R81X mutation have shown that it blocks the interaction of wild type AIP and phosphodiesterase type 4A (PDE4A), potentially disrupting the cAMP cascade¹⁹.

AIP somatic status in the somatotropinoma, adrenocortical tumor and B-cell non-Hodgkin lymphoma

Sequencing of *AIP* in tumoral DNA samples revealed a complete loss of the remaining wild-type allele “c” in both pituitary and adrenocortical tumors (Fig. 2B, 3B). Samples from the adrenocortical tumor and B-cell non-Hodgkin lymphoma were analyzed by the *AIP*-flanking microsatellite marker D11S1258 and LOH was confirmed in the adrenocortical tumor (Fig. 3B), while the lymphoma showed maintenance of heterozygosity at the *AIP* locus (data not shown).

AIP gene expression in normal adrenals and in the adrenocortical tumor of the FIPA *AIP*-mutated patient

The mean cycle threshold (Ct) values of *AIP* and β -actin in the pool of 61 normal adrenal samples were 25.42 and 22.49, respectively, while in the adrenocortical carcinoma of the FIPA *AIP*-mutated case was 31.53 and 27.28. Using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method to determine relative expression, we observed decreased expression of *AIP* in the adrenocortical carcinoma in comparison to pooled normal adrenals ($2^{-\Delta\Delta CT} = 0.48$) (Fig. 3C). These data are in accordance with our analysis of somatic status of AIP which showed LOH in this nonpituitary (adrenocortical) tumor, as shown in Figure 2B.

AIP immunohistochemistry

Pituitary tissue: Decreased AIP immunostaining was observed in the pituitary adenoma from the daughter harboring the R81X germline mutation, in contrast to intense cytoplasmic AIP positivity in normal pituitary glands obtained from autopsy and in a somatotropinoma from a patient with sporadic acromegaly carrying no *AIP* germline mutation (Fig. 2C).

Adrenal tissue: The adrenocortical carcinoma showed positive staining for two markers of adrenal cortical differentiation used as positive controls, Melan A and 35betaH11(data not shown), and complete loss of AIP immunoreactivity (Fig. 3D). Moderate and strong staining of AIP-positive cells was observed in normal adult (Fig. 3D) and infant adrenal tissue, respectively.

Grade II B-cell non-Hodgkin lymphoma: Normal expression of the AIP protein was observed in the index patient's B-cell lymphoma in comparison to tonsillar lymphoid tissue used as control (not shown).

DISCUSSION

Extra-pituitary tumors have been identified in PAP/FIPA patients harboring *AIP* mutations. As mutant *AIP* fails to interact with cAMP-specific PDE4A and therefore is likely to disrupt the cAMP signaling pathway^{12,19}, a pathway previously implicated in both pituitary and nonpituitary tumorigenesis through defects in *PRKAR1A* and *GNAS1*, further investigation of the role of *AIP* in these concomitant nonpituitary tumors is warranted. Here, we present the first germline and somatic investigation of pituitary and nonpituitary tumors (somatotropinoma, adrenocortical and grade II B-cell non-Hodgkin lymphoma) in IFS patients.

We initially found that both mother and daughter with acromegaly harbored a functional cAMP pathway-disrupting germline mutation in *AIP* (c.241C>T; R81X). Through sequencing analysis of tumoral samples, the remaining wild-type allele C was shown to be lost in the daughter's GH-secreting pituitary adenoma and in the mother's adrenocortical carcinoma. LOH was confirmed by the analysis of the D11S1258 repeat marker located at the *AIP* locus (11q13.3). In addition, we observed a decreased expression of *AIP* mRNA and protein in the adrenocortical tissue indicating the absence of expression of this tumor suppressor protein in this tumor (Fig. 3C and 3D). In contrast, no LOH and normal *AIP* protein expression was verified in the B-cell non-Hodgkin lymphoma from the same patient. According to the Knudson two-hit model, these findings confirm that *AIP* plays a tumor suppressor role in the pituitary, as previously reported^{2,3,4,8}, and suggest that *AIP* may also be implicated in nonpituitary tumorigenesis. Interestingly, previous genetic studies have strongly suggested the existence of an as-yet unidentified tumor suppressor gene at 11q13 implicated in adrenocortical tumorigenesis^{21,22}.

Of note, a female patient harboring a germline nonsense *AIP* mutation, L210X, has been reported to develop a broad panel of neoplasias involving the pituitary, adrenocortical and thyroid glands, suggesting tumor susceptibility similar to that observed in our index case¹⁰. This patient presented with secondary amenorrhea at the age of 25 and was diagnosed with acromegaly at 27 years of age. Subsequently, she developed a 19-mm non-secretory adrenocortical adenoma and a 4-cm thyroid adenoma (Table 1). Georgtzi *et al.*,

1
2
3
4 studying 91 cases with *MEN1*-related tumors and no *MEN1* mutation, detected
5 two cases (2.2 %) with *AIP* germline mutations¹¹. Recently, several cases of
6 thyroid disorders, including nodular goiters, follicular adenomas, and follicular
7 and papillary thyroid carcinomas, have been described in European cases
8 harboring *AIP* mutations (Prof. Beckers, Liège, FIPA Workshop May 2009
9 Liège; Drs. Outi Vierimaa and Pasi Salmela, University of Helsinki, PhD Thesis).

10
11
12
13
14 These data suggest that the occurrence of nonpituitary tumors in FIPA cases
15 might be related to the primary *AIP* germline event. However, systematic clinical
16 screenings for nonpituitary tumors in large series of FIPA families are needed
17 so that information on the tumoral susceptibility caused by *AIP* germline defects
18 can be gathered.
19
20
21
22

23
24 In conclusion, our data confirms the tumor suppressor role of *AIP* in pituitary
25 adenomas in IFS/FIPA and indicates that it may be implicated in the
26 development of nonpituitary tumors in *AIP*-mutated patients. Due to the
27 potentially important clinical implications of these findings, further genetic
28 investigation of concomitant nonpituitary tumors and expanded clinical
29 surveillance of *AIP*-mutated patients are encouraged.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Patricia L. Dahia (San Antonio Cancer Institute, University of Texas) for providing the AIP antibody; Elisangela Quedas and Cinthia B. Moyses (University of São Paulo) for technical assistance.

For Peer Review

REFERENCES

- 1-Melmed S (2006) Medical progress: acromegaly. *N Engl J Med*, **355**, 2558-2573
- 2-Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gundogdu S, De Menis E, Makinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA (2006) Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science*, **312**, 1228-1230
- 3-Daly AF, Vanbellinghen JF, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, Naves LA, Guitelman MA, Murat A, Emy P, Gimenez-Roqueplo AP, Tamburrano G, Raverot G, Barlier A, De Herder W, Penfornis A, Ciccarelli E, Estour B, Lecomte P, Gatta B, Chabre O, Sabate MI, Bertagna X, Garcia Basavilbaso N, Staldecke G, Colao A, Ferolla P, Wemeau JL, Caron P, Sadoul JL, Oneto A, Archambeaud F, Calender A, Sinilnikova O, Montanana CF, Cavagnini F, Hana V, Solano A, Delettieres D, Luccio-Camelo DC, Basso A, Rohmer V, Brue T, Bours V, Teh BT, Beckers (2007) Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 1891-1896
- 4-Soares BS, Frohman LA (2004) Isolated familial somatotropinoma. *Pituitary*, **7**, 95-101.
- 5-Daly AF, Tichomirowa MA, Beckers A (2009) Genetic, molecular and clinical features of familial isolated pituitary adenomas. *Horm Res*, **71** Suppl 2:116-22.
- 6-Toledo RA, Lourenco DM Jr, Liberman B, Cunha-Neto MB, Cavalcanti MG, Moyses CB, Toledo SPA, Dahia PL (2007) Germline mutation in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene in familial somatotropinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 1934-1937
- 7-Barlier A, Vanbellinghen JF, Daly AF, Silvy M, Jaffrain-Rea ML, Trouillas J, Tamagno G, Cazabat L, Bours V, Brue T, Enjalbert A, Beckers A (2007) Mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene are not highly prevalent among subjects with sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 1952-5.
- 8-Iwata T, Yamada S, Mizusawa N, Golam HM, Sano T, Yoshimoto K (2007) The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene is rarely mutated in sporadic GH-secreting adenomas. *Clin Endocrinol*, **66**, 99-502
- 9-Igreja S, Chahal HS, Akker SA, Gueorguiev M, Popovic V, Damjanovic S, Burman P, Wass JA, Quinton R, Grossman AB, Korbonits M (2009) Assessment of p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) and aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) genes in multiple endocrine neoplasia (MEN1) syndrome patients without any detectable MEN1 gene mutations. *Clin Endocrinol*, **70**, 259-64.

10-Cazabat L, Libe R, Perlemoine K, Rene-Corail F, Burnichon N, Gimenez-Roqueplo AP, Dupasquier-Fediaevsky L, Bertagna X, Clauser E, Chanson P, Bertherat J, Raffin- Sanson ML (2007) Germline inactivating mutations of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in a large cohort of sporadic acromegaly: mutations are found in a subset of young patients with macroadenomas. *Eur J Endocrinol*, **157**, 1-8

11-Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, Tuppurainen K, Makinen MJ, Vierimaa O, Paschke R, Saeger W, van der Lijdt RB, Sane T, Robledo M, De Menis E, Weil RJ, Wasik A, Zielinski G, Lucewicz O, Lubinski J, Launonen V, Vahteristo P, Aaltonen LA (2007) Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**, 4101-4105

12-Bolger GB, Peden AH, Steele MR, MacKenzie C, McEwan DG, Wallace DA, Huston E, Baillie GS, Houslay MD (2003) Attenuation of the activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 by interaction with the immunophilin XAP2. *J Biol Chem*, **278**, 3351-3363

13-de Oliveira SK, Hoffmeister M, Gambaryan S, Muller-Esterl W, Guimaraes JA, Smolenski AP (2007) Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, **282**, 13656-13663

14-Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, **417**, 949-54.

15-Groussin L, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Jullian E, Delemer B, Zacharieva S, Pignatelli D, Carney JA, Luton JP, Bertagna X, Stratakis CA, Bertherat J (2002) Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD. *Am J Hum Genet*, **71**, 1433-42.

16-Luccio-Camelo DC, Une KN, Ferreira RE, Khoo SK, Nickolov R, Bronstein MD, Vaisman M, Teh BT, Frohman LA, Mendonca BB, Gadelha MR (2004) A meiotic recombination in a new isolated familial somatotropinoma kindred. *Eur J Endocrinol*, **150**, 643-648

17-Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB (2001) An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children

and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 4970-4973

18-Meyer BK, Petrulis JR, Perdew GH (2000) Aryl hydrocarbon (Ah) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones*, **5**, 243-254

19-Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JA, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A Jr, Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, Peters G, Bolger GB, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M (2008) The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, **93**, 2390-2401.

20-Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G, Kirschner MA (2000) Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer*, **88**, 711-36.

21-Kjellman M, Roshani L, Teh BT, Kallioniemi OP, Höög A, Gray S, Farnebo LO, Holst M, Bäckdahl M, Larsson C (1999) Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16. *J Clin Endocrinol Metab*, **84**, 730-5

22-Heppner C, Reincke M, Agarwal SK, Mora P, Allolio B, Burns AL, Spiegel AM, Marx SJ (1999) MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*, **84**, 216-9.

LEGENDS:**FIGURE 1 – GENEALOGY; IDENTIFICATION OF A FUNCTIONAL *AIP* MUTATION LIKELY TO DISRUPT THE CAMP SIGNALING PATHWAY**

A The index patient developed acromegaly, adrenocortical carcinoma and B-cell lymphoma. One of her daughters had acromegaly due to a large and invasive pituitary. **B** The known *AIP* functional mutation c.241C>T (R81X) was identified in genomic DNA samples from the two patients (mother and daughter) with acromegaly but not in the three unaffected family members.

FIGURE 2 – LOSS OF *AIP* IN THE FAMILIAL SOMATOTROPINOMA

A MRI of the index patient's daughter revealed a large and invasive pituitary adenoma (somatotropinoma) which was resistant to treatment with somatostatin analog. She inherited the heterozygous R81X *AIP* germline mutation (Fig. 1B) from the index case. **B** Sequencing analysis of *AIP* in tumoral DNA samples revealed that only the R81X-mutated allele (t) was present in the somatotropinoma, indicating somatic loss and therefore inactivation of wild-type *AIP*. **C** Immunohistochemical analysis showed positive AIP protein expression in normal pituitary and in a GH-secreting pituitary adenoma of a patient with sporadic acromegaly without *AIP* mutation. The somatotropinoma of the patient harboring the R81X germline mutation and somatic loss of the gene presented low expression of AIP protein.

FIGURE 3 – LOSS OF *AIP* IN THE ADRENOCORTICAL TUMOR

A Abdominal computed tomography scan of the index case when presenting with virilization and high serum levels of adrenal steroids revealed a large heterogeneous mass (9.0 x 8.9 cm) in the right adrenal gland, which was surgically excised and histopathologically classified as adrenocortical carcinoma. **B** Sequencing and microsatellite (D11S1258 *AIP*-flanking marker) analyses of DNA samples from the tumor revealed loss of the *AIP* wild-type allele. **C** The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to compare expression of *AIP* mRNA transcript in pooled normal pituitary glands (Ct-AIP=25.66, Ct- β -actin=24.24), pooled normal adrenal glands (Ct-AIP=25.42; Ct- β -actin=22.49) and in the adrenocortical carcinoma from the index case, in which the *AIP* wild-type allele

was lost (Ct-AIP=31.53, Ct- β -actin=27.28). Using the mean value of cycle thresholds of the normal adrenal pool as a reference (1.0) and decreased *AIP* expression in the adrenocortical carcinoma (0.48). **D** Immunohistochemistry using *AIP* antibody showed low/moderate staining in a normal adrenal gland obtained from autopsy, while complete loss of *AIP* immunoreactivity was observed in the adrenocortical carcinoma from the index patient, which stained positive for Melan A and 35betaH11 used as controls.

TABLE 1 – *AIP*-positive patients with concomitant pituitary, thyroid and adrenal neoplasias.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Table 1: *A/P*-positive patients with concomitant pituitary, thyroid and adrenal neoplasias.

Patient	<i>MEN1</i> germline mutation	<i>A/P</i> germline mutation	Affected glands	Pituitary tumor	Family history	Non-pituitary tumors	Somatic loss of <i>A/P</i>		Reference
							LOH	Low protein expression	
I	negative	R81X (inactivating)	Pituitary Adrenal Thyroid	Somatotropinoma (25 y-old)	Yes, one daughter with acromegaly	Virilizing adrenocortical carcinoma 9,0 x 8,9 cm (38 y-old) non-Hodgkin B-cell lymphoma(42 y-old) Thyroid nodules 7 mm and 11 mm (38 y-old)	Adrenocortical carcinoma Somatotropinoma (daughter's)	Adrenocortical carcinoma Somatotropinoma (daughter's)	Present study
II	N.D. no history of MEN1	L201X (inactivating)	Pituitary Adrenal Thyroid	Somatotropinoma (27 y-old)	No	Non-functioning adrenocortical adenoma 19 mm (41 y-old) Microfollicular and trabecular thyroid adenoma 4 cm (58 y-old)	N.D.	N.D.	Cazabat (2007)

N.D. = no data.