

Vania dos Santos Nunes

*Frequência da Neoplasia Endócrina Múltipla tipo1
em um grupo de pacientes com adenoma hipofisário:
aspectos clínicos e estudo genético familiar.*

Tese apresentada ao programa de pós-graduação Fisiopatologia em Clínica Médica para obtenção do título de Doutor em Endocrinologia e Metabologia – Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

UNESP – Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu
Departamento de Clínica Médica
2009

Vania dos Santos Nunes

*Frequência da Neoplasia Endócrina Múltipla tipo1
em um grupo de pacientes com adenoma hipofisário:
aspectos clínicos e estudo genético familiar.*

Tese apresentada ao programa de pós-graduação Fisiopatologia em Clínica Médica para obtenção do título de Doutor em Endocrinologia e Metabologia – Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Orientadora: Prof^a Adjunta Célia Regina Nogueira

Botucatu

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Nunes, Vania dos Santos.

Freqüência da neoplasia endócrina múltipla tipo 1 em um grupo de pacientes com adenoma hipofisário: aspectos clínicos e estudo genético familiar / Vania dos Santos Nunes. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual

Paulista, 2009.

Orientadora: Célia Regina Nogueira

Assunto CAPES: 40101061

1. Metabolismo 2. Endocrinologia 3. Doenças endócrinas

CDD 616.43

Palavras chave: Adenoma hipofisario; Fatores preditivos; Gene *MEN1*;
Neoplasia endócrina múltipla tipo 1

Dedicatória

Há alguns anos, enquanto assistia a uma das aulas do magistério, fui questionada por uma das minhas professoras se haveria a possibilidade de algum aluno da sala desistir do curso para fazer medicina. Na opinião dela, isso era impossível.

A professora não estava totalmente errada. Naquela época, a nossa realidade não nos dava muitas esperanças; nós estávamos numa escola pública, preparando-nos para dar aulas para crianças de 1ª a 4ª série, e, para não ter que trabalhar “fora”, ganhávamos uma bolsa de estudos.

Conclui o magistério, mas depois daquela indagação, a vontade de ser médica nunca mais saiu de dentro de mim. Resolvi então ouvir o meu coração; enquanto trabalhava à tarde com as crianças, fazia cursinho pela manhã. Nisto, começaram a surgir os primeiros conflitos: dificuldade em acompanhar a classe, pouco tempo para estudar, preconceito de pessoas que não acreditavam em mim, e por final: como eu me manteria financeiramente num curso de medicina?

Enfim, chegou o primeiro vestibular, o segundo; o terceiro... Que decepção!

Um dia eu perdi a esperança, e fui então pressionada a desistir de medicina para fazer qualquer outro curso universitário.

Só que antes de abandonar o sonho, eu participei de uma reunião de jovens cristãos, cujo líder pregava sobre qual milagre nós gostaríamos que fosse realizado em nossas vidas. E que o recado do criador para cada um de nós naquela noite era: o que é impossível para nós é possível para Deus. Em meio a lágrimas, eu voltei para casa convicta de que estudar medicina não era apenas um sonho particular; mas era um propósito de Deus na minha vida, e por isso eu não podia desistir.

Depois disso, não teve jeito; apesar das incertezas de muitos, do apoio de poucos, continuei a lutar, e finalmente passei no vestibular para medicina na FAMEMA.

Passados 12 anos, questiono-me: como cheguei até aqui? Além de ter conseguido cursar medicina, trabalho numa Universidade pública e estou prestes a receber o título de doutora em Endocrinologia e Metabologia.

Por isso, a minha dedicatória vai para aquele que me tem capacitado para esta jornada, que tem sido a minha força, o meu socorro, a minha inspiração, o meu amor. Obrigada, querido Deus! Faço minhas as palavras do Rei Davi: nós adoramos a Deus porque ele dirige todas as coisas. Riquezas e honras vêm somente do Senhor... Sua mão controla força e poder, e é por sua vontade que os homens se tornam importantes e recebem força (I Cr 29:11-12).

Agradecimientos

Aos meus pais, Maria José e Waldemar, pela educação, base e valores de vida.

Aos meus irmãos, Walter, Everton, Waldir, Valéria e Vagner, que são os meus exemplos de superação e princípios. Às minhas cunhadas e sobrinhos por fazerem os meus irmãos felizes.

À minha orientadora, Prof^a. Célia Regina Nogueira, que tem sido um instrumento de Deus para me abençoar. Obrigada pela orientação, por sempre estar disponível quando eu precisei, pela confiança, carinho e amizade.

Às minhas professoras, Gláucia M.F. Mazeto, Walkyria de Paula Pimenta, Ana Valéria B. Castro, que juntas com a minha orientadora incentivaram a minha vida acadêmica, e foram meus exemplos de dedicação, seriedade e humanidade pela maneira com que administram as atividades de assistência, residência médica, pesquisa e graduação.

À Denise Perone pela orientação dada na parte de biologia molecular, em especial às reações de sequenciamento. Obrigada pela disponibilidade em me ajudar todas as vezes que precisei.

Ao Prof. Peter Kopp pelos seus comentários, sugestões, e esclarecimentos de algumas dúvidas durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Carlos Roberto Padovani que me auxiliou na análise estatística dos resultados do trabalho.

Ao Prof. Celso Luís Marino que permitiu que realizássemos as reações de sequenciamento no seu laboratório, e à Virgínia Elias Coscrato pela disponibilidade e dedicação em nos ajudar na manipulação do sequenciador.

À Sueli Ap Clara, pela convivência no laboratório, pelas extrações do DNA, e ajuda na formatação da tese.

A toda equipe do laboratório de Biologia Molecular, em especial ao Sandro José Conde que me ensinou os primeiros passos no laboratório, e me auxiliou na padronização das temperaturas da PCR.

Aos médicos endocrinologistas, Adriana Mendes, Bibiana Colenci e Fabrício Galan, pelo apoio e convivência nestes anos.

Aos médicos residentes, Susan, Flávia, Daniel, André, Daniela, Gregório, Fausto, Mônica, Mariana, Benigno, Renata, que me ajudaram na coleta de dados e atendimento dos pacientes, e todos os dias me propiciam um ambiente de trabalho feliz.

Aos funcionários do departamento de Clínica Médica pelo apoio e carinho.

Às professoras Márcia Guimarães e Paula Hokama pelas sugestões e correções dadas no meu exame de qualificação.

Agradeço a todos os pacientes com MEN1 e seus familiares que participaram deste estudo.

Aos meus amigos do grupo de oração, além dos já citados, Pedro, Mário, Fernanda, Marcelo. Obrigada pela amizade e orações de vocês que muito me têm fortalecido.

Aos meus amigos de longa data, Heleny e Milton, Daniel e Aline, Alice, Vitória, Juliana, Claudinha e Milla. Obrigada por acreditarem em mim, por não terem poupado esforços em me ajudar, pelas palavras de afirmação e encorajamento, e por inúmeras vezes dizerem que me amam.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	x
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xvi
<i>Resumo</i>	xviii
<i>Abstract</i>	xxi
1. <i>Introdução</i>	1
1.1. Aspectos Clínicos da MEN1.....	3
1.1.1. Hiperparatireoidismo Primário.....	3
1.1.2. Tumores enteropancreáticos.....	5
1.1.3. Tumores Hipofisários.....	7
1.1.4. Outros tumores relacionados à MEN1.....	8
1.1.5. MEN1 e resistência à insulina.....	10
1.2. O Gene <i>MEN1</i>	12
1.3. Proteína Menin.....	13
1.3.1. Domínio funcional da menin.....	14
1.3.2. Regulação do crescimento e ciclo celular.....	17
1.3.3. Reparo do DNA.....	19
1.3.4 Regulação da transcrição gênica.....	21
1.3.4.1. Interação da menin com junD.....	21
1.3.4.2. Interação com o fator TGFβ.....	24
1.3.4.3. Associação com a histona metiltransferase.....	25
1.3.4.4. Interação com IGFBP2.....	26
1.3.4.5. Interação com NFκB.....	27
1.3.5. Regulação da estabilidade genômica.....	28
1.3.6. Controle da Apoptose.....	29
1.4. Participação da Menin nos Tumores Endócrinos.....	30
1.5. Mutações e Polimorfismos do Gene <i>MEN1</i>	33
1.6. Rastreamento Genético.....	38
2. <i>Objetivos</i>	41
3. <i>Pacientes e Métodos</i>	43

3.1. Avaliação da frequência da MEN1 num grupo de pacientes com AH.....	44
3.1.1. Rastreamento Genético.....	45
3.2. Extração e quantificação do DNA genômico.....	46
3.3. Amplificação do gene <i>MEN1</i>	49
3.4. Sequenciamento do gene <i>MEN1</i>	51
3.4.1. Reação de sequenciamento.....	52
3.4.2. Reação de precipitação.....	52
3.5. Familiares de paciente com diagnóstico clínico de MEN1 e ausência de mutação.....	54
3.6. Metodologia aplicada para avaliação hormonal e bioquímica.....	55
3.7. Avaliação Radiológica.....	56
3.8. Familiares de pacientes com diagnóstico clínico de MEN1 com mutação identificada.....	56
4. <i>Resultados</i>	57
4.1. Frequência da MEN1 em pacientes com AH e fatores preditivos para esta neoplasia.....	58
4.2. Estudo genético.....	63
4.3. Rastreamento familiar dos pacientes com diagnóstico clínico da MEN1.....	64
4.3.1. Pacientes com mutação identificada.....	64
4.3.2. Familiares dos pacientes sem mutação no <i>MEN1</i>	69
5. <i>Discussão</i>	76
6. <i>Conclusões</i>	92
7. <i>Referências Bibliográficas</i>	95
8. <i>Anexos</i>	116

Lista de Abreviaturas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AH	Adenoma hipofisário
AP-1	Ativador da proteína 1
ASK	Ativador da fase-S kinase
bp	Pares de base
CDC	Ciclo de divisão celular
CDK	Quinase dependente da ciclina
CNF	Clinicamente não funcionando
dsDNA	DNA de cadeia dupla
FANC D2	Anemia de Fanconi grupo de complementação D2
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDP	Guanosina difosfato
gene <i>Hox</i>	Gene que leva à inibição do crescimento celular
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GH	Hormônio de crescimento
GHRH	Hormônio liberador do hormônio de crescimento
GTP	Guanosina trifosfato
HDACs	Histonas deacetilases
HPP	Hiperparatireoidismo Primário
IGF-I	Fator de crescimento insulina semelhante I
IGFBP2	<i>Insulin-like growth factor binding protein 2</i>
JunD	Proteína da família jun que participa da transcrição gênica
LH	Hormônio luteinizante
LOH	Perda da heterozigosidade
MAC	Macroadenoma
MEN1	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1
<i>MEN1</i>	Gene da Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1
MIC	Microadenoma
MLL	<i>Mixed-lineage leukemia</i>
NF-κB	Fator nuclear kappaB

NLS	Sinal de localização nuclear
NM	Matriz nuclear
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pem	Proteína de expressão embrionária e placentária
PRL	Prolactina
PTH	Paratormônio
PTH-rp	Peptídeo relacionado ao PTH
RNM	Ressonância Magnética
RPA2	Proteína de replicação subunidade 2
Smad 3	Proteínas citoplasmáticas da família das Smads
TGF β	Fator de crescimento de transformação beta
TSH	Hormônio tireoestimulante
VIP	Peptídeo vaso intestinal

Lista de Figuras



Figura 1	LOH (perda da heterozigossidade). Modelo de Knudson; a expressão fenotípica da mutação germinativa somente é evidenciada após a mutação somática no segundo alelo.....	13
Figura 2	Representação esquemática da organização genômica do <i>MEN1</i> ; da sua proteína codificada menin, e das regiões que ela interage com outras proteínas.....	15
Figura 3	Representação da regulação do ciclo celular pela menin.....	20
Figura 4	Representação da interação menin-junD.....	23
Figura 5	Sumário da menin com suas proteínas interativas (MIPs) e suas principais ações.....	32
Figura 6	Representação dos sítios das nove mutações que apresentam com uma frequência maior que 1,5% (I-IX).....	36
Figura 7	A: distribuição dos 90 pacientes conforme padrão de secreção hormonal.....	60
Figura 8	Amplificação dos nove exons do gene <i>MEN1</i>	63
Figura 9	Herodograma da primeira família.....	64
Figura 10	Resultado do sequenciamento do gene <i>MEN1</i> da paciente 1.....	65
Figura 11	Resultado do sequenciamento do gene <i>MEN1</i> dos paciente 2 e 3.....	66
Figura 12	Sequenciamento genético de um dos tios paternos da paciente caso índice.....	66
Figura 13	Herodograma do paciente 9.....	67
Figura 14	Sequenciamento do gene <i>MEN1</i> do paciente 9.....	68
Figura 15	Resultado do sequenciamento do exon 9 do gene <i>MEN1</i> dos pacientes 4 e 8.....	70

Figura 16	Heredograma do paciente 4.....	70
Figura 17	Heredograma da paciente 8.....	71
Figura 18	Resultado do sequenciamento da fita sense do exon 10 do gene <i>MEN1</i> do paciente 5.....	72
Figura 19	Heredograma da paciente 5.....	72
Figura 20	Resultado do sequenciamento da fita sense do exon 9 do gene <i>MEN1</i> da paciente nº 6.....	73
Figura 21	Resultado do sequenciamento da fita sense do exon 9 do gene <i>MEN1</i> da paciente 7.....	73
Figura 22	Heredograma da paciente 6.....	74
Figura 23	Esquema do mecanismo do <i>splicing</i>	84
Figura 24	c-DNA do gene <i>MEN1</i> de uma paciente com uma mutação IVS4 + 1 G>A obtido pelo RT-PCR com primers do exon 3 a 6 do gene.....	85

Lista de Tabelas



Tabela 1	Tumores associados com MEN1 e sua penetrância.....	11
Tabela 2	Funções da menin indicada pela sua interação direta com diversas proteínas e outras moléculas.....	16
Tabela 3	Representação das mutações germinativas mais frequentes no gene <i>MEN1</i> que juntas representam 20.6% de todas as mutações germinativas reportadas.....	37
Tabela 4	Programa de investigação clínica proposto pelo consenso de MEN1 aos familiares de pacientes acometidos que tiveram o rastreamento genético positivo.....	40
Tabela 5	Doze pares de <i>primers</i> que foram usados para amplificação os nove éxons do gene.....	50
Tabela 6	Descrição dos dez pacientes com diagnóstico de MEN1; apresentação dos dados clínicos e laboratoriais.....	61
Tabela 7	Regressão logística múltipla da MEN1.....	62
Tabela 8	Resultados dos exames bioquímicos e hormonais dos filhos dos pacientes índices, cujo estudo genético não evidenciou mutação.....	75

Resumo

A Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (MEN1; OMIM 131100) é uma doença genética, herdada de forma autossômica dominante, caracterizada pela presença de tumores em pelo menos dois dos seguintes tecidos endócrinos: paratireóide, enteropancreático e adenohipófise. Além destes componentes maiores, tumores adrenocorticais, carcinóides, lipomatose, angiofibroma e colagenoma facial têm sido associados. Trata-se de uma síndrome rara com uma prevalência estimada de 2-3/100000 indivíduos, causada por mutações inativadoras no gene *MEN1*. Este, por sua vez, codifica uma proteína chamada menin, que tem demonstrado interagir com diversas proteínas envolvidas em processos celulares essenciais, como controle do crescimento e ciclo celular, reparo de DNA, regulação da transcrição gênica, regulação estabilidade genômica, e controle da apoptose. A identificação do gene *MEN1* possibilitou a detecção de mutações causadoras da doença e, com isto, a confirmação do diagnóstico clínico em pacientes acometidos, bem como o diagnóstico precoce em familiares assintomáticos. É preconizada a pesquisa dos principais tumores associados a MEN1 em pacientes já com o diagnóstico da síndrome ou nos portadores da mutação, mas a abordagem inversa que é a investigação da MEN1 em pacientes com diagnóstico inicial apenas de um dos principais tumores associados tem sido pouco explorada. Por isto, esta pesquisa consistiu em avaliar a frequência da MEN1 em

um grupo de pacientes com adenoma hipofisário (AH) e identificar, nestes indivíduos, variáveis capazes de prever com alta probabilidade esta neoplasia. Nos pacientes acometidos, foi realizado o estudo genético e o rastreamento familiar para MEN1. O estudo evidenciou dez pacientes com MEN1, mostrando uma frequência desta neoplasia em AH de 11%. A maioria (70%) tinha Hiperparatireoidismo Primário (HPP), todos os indivíduos acometidos eram assintomáticos, e tiveram indicação de tratamento cirúrgico no diagnóstico. Os resultados da análise de regressão logística múltipla mostraram-se não significativos para as variáveis: sexo, idade e tipo de AH, mas significativos para microadenoma (MIC)/macroadenoma (MAC), indicando uma razão de chance 4,5 vezes menor em pacientes com MAC em relação ao MIC, para a predição de MEN1. O estudo genético mostrou mutação no *MEN1* em quatro pacientes; nos três primeiros, foi encontrada a mutação intrônica IVS4 + 1 G>A, e no último a mutação intrônica IVS3 +1 C>T. Nos demais pacientes, foram encontrados apenas polimorfismos, sendo um deles inédito. O estudo identificou uma frequência alta de MEN1 em pacientes com AH. Como o HPP em sua maioria é assintomático, sugerimos que todo paciente com AH devesse ter o seu perfil do cálcio analisado.

Descritores: Neoplasia Endócrina múltipla tipo 1, Adenoma Hipofisário, Fatores Preditivos, Gene *MEN1*.

Abstract

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1; OMIM 131100) is a genetic disease, inherited in the dominant autosomal form and characterized by the presence of tumors in at least two of the following endocrine tissues: parathyroid, enteropancreatic and adenopituitary. Besides the aforementioned major components, adrenocortical and carcinoid tumors, lipomas, collagenomas and facial angiofibromas have been associated with the disease. MEN1 is a rare disease, with an estimated prevalence of 2-3/100000 individuals; it is caused by inactivated mutations of the *MEN1* gene. This gene encodes one protein called menin, which has been shown to interact with a number of proteins that are involved in essential cell processes such as cell division and proliferation, DNA repair, transcriptional regulation, genome stability, and apoptosis control. The *MEN1* gene identification has enabled the detection of *MEN1* mutations and the confirmation of the disease's clinical diagnosis as well as its early diagnosis in asymptomatic relatives. The screening of these principal tumors associated with MEN1 has been recommended in patients with MEN1 syndrome or *MEN1* mutation. However, the inverse approach (i.e., the investigation of MEN1 in patients with an initial diagnosis of only one of the principal tumors) has been little explored. For this reason, the present study aimed to evaluate the frequency of MEN1 in a group the patients with pituitary adenoma (PA), and to identify, in these individuals, variables capable of predicting this neoplasia with a high

probability. In the patients with MEN1 clinical diagnosis, both the genetic study and familial screening were accomplished. The study presented 10 patients with MEN1, resulting in a frequency of this neoplasia in AP of 11%. The majority of the patients (70%) had Primary Hyperparathyroidism (HPP); all these individuals were asymptomatic and had surgical treatment indicated at diagnosis. Multiple logistic regression analysis demonstrated non-significance for the following variables: sex, age and PA type, but significance for microadenoma (MIC)/ macroadenoma (MAC), indicating an odds ratio 4.5 times lower in MAC patients in relation to MIC ones, for the prediction of MEN1. The genetic study showed *MEN1* mutations in four patients, including three with the intronic mutation IVS4 + 1 G>A, while the fourth presented the intronic mutation IVS3 +1 C>T. In the other patients only polymorphisms were found, including one unpublished polymorphism. The study identified a high frequency of MEN1 in PA patients. As PHP is mostly asymptomatic, we suggest that all PA patients should have their calcium profile analyzed.

Descriptors: Multiple endocrine neoplasia type 1, Pituitary adenoma, Predictive factors, *MEN1* gene.

1. Introdução

A Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (MEN1; OMIM 131100) foi descrita em 1954 por Wermer; é uma doença genética, herdada de forma autossômica dominante, caracterizada pela presença de tumores em pelo menos dois dos seguintes tecidos endócrinos: paratireóide, enteropancreático e adenohipófise (1). Trata-se de uma síndrome rara com uma prevalência estimada de 2-3/100000 indivíduos (2) e já foi descrita em todos os grupos etários (5-81 anos). A doença é considerada familiar quando um indivíduo afetado possui pelo menos um parente do primeiro grau com no mínimo um dos principais tumores relacionados (3-4).

As manifestações clínicas da doença estão geralmente relacionadas com a hipersecreção do órgão afetado, e menos frequentemente aos seus sítios primários ou metástases (5). A maioria dos tumores apresenta características benignas, mas alguns tumores enteropancreáticos, como os gastrinomas, e os tumores carcinóides podem ser malignos, sendo estes os principais responsáveis pela mortalidade dos pacientes acometidos (2,6).

1.1. Aspectos Clínicos da MEN1

1.1.1. Hiperparatireoidismo Primário

O Hiperparatireoidismo Primário (HPP) é a expressão clínica mais comum nos pacientes com MEN1, chegando a quase 100% de penetrância em torno dos 50 anos de idade (4, 6, 7,8). Ao contrário dos pacientes com diagnóstico inicial de HPP, em que somente 2% a 4% dos casos têm MEN1 (9).

O HPP, na maioria das vezes, é decorrente de uma hiperplasia de duas ou mais glândulas paratireóides, mas adenomas solitários também podem ser vistos, e o início da doença da-se geralmente próximo dos 25 anos de idade. Já o HPP esporádico tem como causa mais frequente um único adenoma de paratireóide, e a neoplasia normalmente surge a partir da quinta década de vida (2).

A apresentação clínica é semelhante aos casos esporádicos; incluindo as manifestações decorrentes do estado de hipercalcemia (fraqueza muscular, adinamia, alterações comportamentais, desidratação), alterações consequentes ao aumento da excreção renal de cálcio (nefrolitíase, nefrocalcinose), e alterações ósseas (osteíte fibrosa cística). Mas, na maioria das vezes, os

pacientes são assintomáticos, ou oligossintomáticos (10). Afora estes pacientes, a manifestação clínica mais comum do HPP é a nefrolitíase.

O diagnóstico laboratorial dá-se pelas dosagens de cálcio e paratormônio (PTH) séricos. Além da hipercalcemia, a maioria dos pacientes tem níveis de PTH elevados, mas em até 10% dos casos podem-se encontrar valores normais (10).

O tratamento do HPP associado a MEN1 é cirúrgico, mas o momento para o procedimento ainda é controverso. Uma cirurgia mais precoce poderia minimizar o tempo de exposição ao HPP. Porém, ainda não há um consenso se os critérios clínicos e laboratoriais para indicar a cirurgia deveriam ser os mesmos usados para os casos esporádicos (9).

Já o tipo do tratamento cirúrgico recomendado para o HPP associado a MEN1 tem sido diferente dos casos esporádicos. A paratireoidectomia minimamente invasiva, atualmente empregada para os últimos, não tem sido recomendada aos primeiros. Para estes, a paratireoidectomia subtotal (ou total com autoimplante em antebraço) simultânea a timectomia preventiva, tem sido o procedimento inicial mais comum (9, 11). Por isto é importante o diagnóstico pré-operatório preciso da MEN1.

Num período de 8 a 12 anos, a taxa de recorrência do HPP associado a MEN1 após a cirurgia subtotal é de 50% nos

pacientes que ficaram com o perfil do cálcio normal, fazendo com que os pacientes operados numa idade jovem tenham frequentes reoperações da paratireóide (9).

1.1.2. Tumores enteropancreáticos

Os tumores enteropancreáticos compõem a segunda manifestação clínica mais comum da MEN1, estando presentes em 30 a 75% dos pacientes em diferentes séries (5, 9,12,13). Entretanto, lesões não funcionantes ou clinicamente silenciosas são encontradas em quase 100% dos casos em cirurgias ou em necropsias de indivíduos com idade acima de 40 anos (9, 14). Estes tumores neuroendócrinos são frequentemente multicêntricos e podem sofrer transformação maligna e causar metástases. A maioria deles demonstra hiperplasia de múltiplos tipos celulares e produz vários peptídeos e aminas biogênicas. Os hormônios produzidos mais frequentemente são gastrina, insulina, glucagon, somatostatina, peptídeo vaso intestinal (VIP) e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (12). As manifestações clínicas dependem da quantidade e tipo dos hormônios neuroendócrinos produzidos.

O gastrinoma é o tumor enteropancreático funcionante mais frequente, encontrado em 40% dos pacientes com a síndrome

(14), e 25% dos pacientes com gastrinoma têm MEN1. Este costuma ser múltiplo, menor que um centímetro, submucoso, locado no duodeno, e menos comumente no pâncreas (13). A sua malignização é a principal causa da mortalidade dos pacientes acometidos, sendo que metade dos indivíduos tem metástase antes do diagnóstico (9). A apresentação clínica dá-se pela Síndrome de Zollinger Ellison que é definida pelos sinais e sintomas do aumento da secreção gástrica ocasionada pela hipergastrinemia. Os sintomas incluem diarreia, refluxo esofágico e úlcera péptica de repetição. O diagnóstico laboratorial deste tumor é estabelecido pela elevação dos níveis séricos da gastrina junto ao aumento da secreção de ácido gástrico.

O insulinoma é o segundo tumor enteropancreático funcional mais comum, presente em 10% a 30% dos casos, e raramente é a primeira manifestação da MEN1 (9, 13). Coincidentemente 10% dos pacientes com insulinoma têm MEN1 (15). As manifestações clínicas, bem como critérios diagnósticos são os mesmos dos casos esporádicos; hipoglicemia, hiperinsulinemia, aumento da pró-insulina e peptídeo C.

Outros sinais clínicos incluem intolerância a glicose, perda de peso e eritema necrolítico migratório, decorrente de um glucagonoma; diarreia, hipercalemia e acidose metabólica decorrente de um tumor secretor do VIP. Um número limitado de tumores também

pode secretar o hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH), o ACTH e o peptídeo relacionado ao PTH (PTH-rp) (12-13).

1.1.3. Tumores Hipofisários

Enquanto o HPP e os tumores enteropancreáticos ocorrem em aproximadamente 90% e 60% dos pacientes acometidos, respectivamente, a frequência do adenoma hipofisário (AH) nesta neoplasia é muito variável; oscilando de 16% a 65% (16), dependendo da metodologia aplicada.

Os AHs são a primeira manifestação da MEN1 em 25% dos casos (17). Com exceção dos gonadotropinomas verdadeiros (9), todos os subtipos de AH têm sido associados a MEN1. Os prolactinomas são os mais frequentes, seguidos dos secretores do hormônio de crescimento (GH), dos clinicamente não funcionantes (CNF), e menos frequentemente dos secretores do ACTH e dos secretores do hormônio tireoestimulante (TSH) (4, 7, 16). Quanto aos sinais e sintomas, e tratamento são semelhantes aos dos casos esporádicos (9,13).

Embora alguns trabalhos tenham reportado que os MICs (tumores < 1 cm) são mais frequentes na MEN1, sendo

responsáveis por até dois terços dos casos (9,13), outros trabalhos têm apontado que os AHs associados a esta neoplasia, quando comparados aos esporádicos, são maiores e mais agressivos (18-19).

1.1.4. Outros tumores relacionados à MEN1

Além da associação das neoplasias descritas, os portadores da MEN1 possuem predisposição ao desenvolvimento de outros tumores como de adrenais, carcinóides, angiofibromas faciais, collagenomas, lipomas, feocromocitomas, meningiomas; dentre outros (tabela 1) (4, 6, 7, 12,13).

Os tumores carcinóides ocorrem em aproximadamente 3% dos pacientes com MEN1, podem acometer o timo, o pulmão, o estômago ou o duodeno. A maioria dos pacientes é assintomática, sendo incomum a aparição dos sintomas usuais da síndrome carcinoide (rubor facial, diarreia e broncoespasmo). O carcinoide do timo é mais frequente em homens, é potencialmente agressivo e de mau prognóstico se detectado tardiamente. Por este motivo, a retirada profilática do timo concomitante à paratireoidectomia tem sido recomendada (12). O carcinoide do estômago ocorre principalmente em

pacientes com antecedentes de gastrinoma e associado ao tratamento crônico com inibidores de bomba de prótons (20).

As doenças adrenocorticais podem ocorrer em até 40% dos pacientes com MEN1 (21). A maioria é adenoma não funcionante, mas adenomas causando hiperaldosteronismo primário, síndrome de Cushing, feocromocitoma e até carcinoma, também podem ocorrer (21-22).

Os angiofibromas faciais são encontrados em até 85% dos pacientes com MEN1 (9, 12, 23); eles são pápulas acneiformes que não regredem e podem ter extensão além das bordas dos lábios. Os collagenomas também são comuns, estando presentes em até 72% dos casos (9, 12, 23). Devido à alta frequência destes tumores, alguns trabalhos têm sugerido que eles podem ser úteis no diagnóstico precoce dos portadores de MEN1 (24).

Os tumores de tireoide associados a MEN1 consistem em adenomas, bóciolos coloides ou carcinomas. Mas devido à alta frequência da neoplasia tireoidiana, tem se sugerido que a sua associação com MEN1 é acidental e sem significado clínico (9,23).

Recentemente descrevemos um relato de caso de um paciente que apresentava critérios clínicos para MEN1 e Complexo de Carney (25) (Anexo1). Outras associações da MEN1 com outras neoplasias endócrinas múltiplas não têm sido descritas.

1.1.5. MEN1 e resistência à insulina

Foi sugerido que os pacientes com MEN1 têm resistência insulínica, quando comparados a familiares sem a doença. A partir disto, um estudo recente (26) propôs investigar a prevalência das anormalidades glicêmicas numa grande família com a síndrome, usando como controle os parentes sem a neoplasia. Foi concluído que Diabetes Mellitus e intolerância à glicose foram significativamente mais frequentes nos pacientes com MEN1 que no grupo controle, e isto esteve fortemente associado ao HPP descontrolado e à hiperestimulação enteropancreática.

Tabela 1. Tumores associados com MEN1 e sua penetrância (4, 6, 7, 12,13).

Síndrome	Localização	Penetrância
MEN 1	<i>Tumor endócrino</i>	
	Paratireoide	90 %
	Enteropancreaticos	
	• Gastrinoma	40%
	• Insulinoma	10%
	• Não funcionante	20%
	• Outros	2%
	Adrenal:	
	• Não funcionante (córtex)	20%
	• Feocromocitoma	< 1%
	Hipófise:	
	• Prolactinoma	20%
	• Outros	17%
	Carcinoides:	
	• Estômago	10%
	• Timo	2%
	• Brônquio	2%
<i>Tumores não endócrinos</i>		
Lipomas	30%	
Angiofibroma facial	5%	
Colagenoma	70%	
Ependimoma	1%	
Meningiomas	5%	

MEN1: neoplasia endócrina múltipla tipo 1.

1.2. O Gene *MEN1*

O gene *MEN1* é classificado como um gene de supressão tumoral, que controla diretamente o crescimento e morte celular em tecidos selecionados. Este gene contribui para a formação de tumores pelo mecanismo da perda da heterozigosidade, consistente com a hipótese de desenvolvimento tumoral elaborada por Knudson (27); em que dois eventos são necessários para a completa inativação de gene de supressão tumoral: primeiro a mutação germinativa em um dos alelos, e posteriormente a mutação somática no outro (Fig. 1). Ou seja, a expressão fenotípica da mutação germinativa somente é evidenciada após a mutação somática no segundo alelo.

O gene foi mapeado em 1987 por Larsson *et al.* (28) e está localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q13). Posteriormente, diferentes grupos na Europa e Estados Unidos analisaram todos os genes contidos neste locus, culminando em 1997 na identificação do gene que foi denominado *MEN1* (29-30). Este gene contém 10 éxons que se estende em mais de 9 kb do DNA genômico e codifica uma proteína que contém 610 aminoácidos, denominada menin (28). O transcrito principal do gene é um mRNA de 2.8Kb. No entanto, pelo menos seis transcritos alternativos têm sido descritos com variações apenas no conteúdo da sua região não traduzida 5', e não na

sua região codificadora (5,31). Uma variante adicional muito rara, que resulta em um aumento de 15 pares de bases na junção exon2-intron2, também tem sido reportada (5,32).

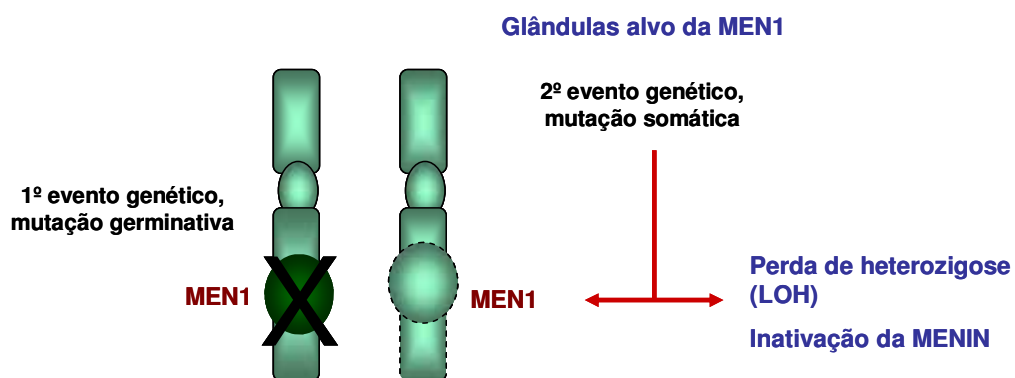


Figura 1. LOH (perda da heteroziguidade). Modelo de Knudson; a expressão fenotípica da mutação germinativa somente é evidenciada após a mutação somática no segundo alelo. Adaptado de Toledo RA, 2007.

1.3. Proteína Menin

A menin é uma proteína nuclear, mas que pode também ser encontrada no citoplasma durante a divisão celular (33-34); é expressa de forma variável tanto em tecidos endócrinos, como em tecidos não endócrinos. Os principais dados obtidos sobre sua função são oriundos de estudos *in vitro* (35).

1.3.1. Domínio funcional da menin

A menin tem pelo menos três sinais de localização nuclear (NLSs) funcionais e independentes no seu seguimento C-terminal; nos códons 479-497 (NLS1), 546-572 (NLS2) e 588-608 (NLS3) (5). Esta proteína contém cinco motivos (sequência curta indicativa de uma característica específica de um gene), cuja presença é consistente com a ligação específica da menin a GTP (guanosina trifosfato) ou a GDP (guanosina difosfato) (5,36). O truncamento ou a instabilidade dos produtos de um gene *MEN1* pode levar à perda da regulação transcricional e/ou hidrólise da GTP, que é um possível mecanismo da formação de tumores na MEN1 (37). A menin também tem mostrado se ligar ao dsDNA (DNA de cadeia dupla) diretamente em uma sequência independente pela sua região carboxi-terminal.

Evidências emergentes têm demonstrado que a menin interage com diversas proteínas que estão envolvidas em processos celulares essenciais, como: controle do crescimento e ciclo celular; reparo de DNA; regulação da transcrição gênica; regulação estabilidade genômica; e controle da apoptose (figura 2, tabela 2).

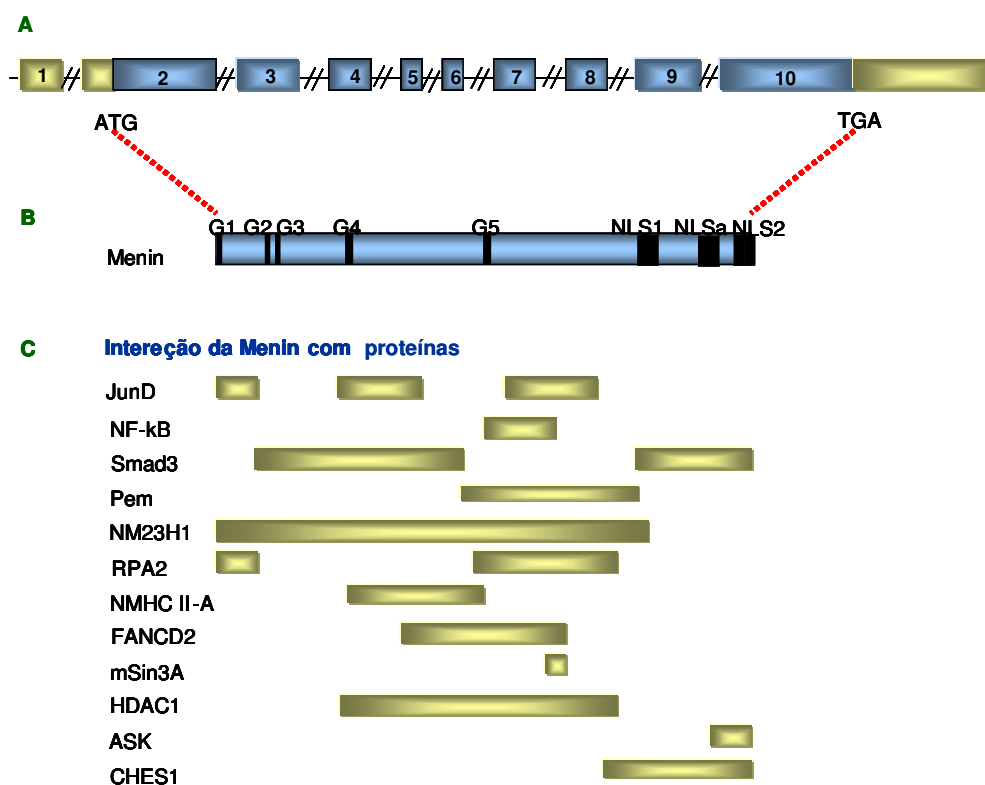


Figura 2. Representação esquemática da organização genômica do *MEN1*; da sua proteína codificada menin, e das regiões que ela interage com outras proteínas.

A: O gene consiste em 10 exons e codifica uma proteína de 610 aminoácidos, a região codificadora é organizada em 9 exons e 8 introns; o exon 1, a parte 5' do exon 2 e a parte 3' do exon 10 não são transcritos. A região promotora está localizada dentro de 100 pares de base *upstream* do exon 2. **B:** a menin tem três sinais de localização nuclear (NLS) nos códons 479-497 (NLS1), 546-572 (NLSa), 588-608 (NLS2) e cinco sítios GTPase (G1-G5). **C:** regiões da menin que estão implicadas na sua ligação com diversas proteínas iterativas. Estas são JunD (códons 1-40, e 139-242, e 323-428), NF-kB (fator nuclear kappaB) (códons 305-381), Smad 3 (códons 40-278, e 477-610), Pem (proteína de expressão embrionária e placentária), (códons 278-476); NM23H1 (códons 1-486); RPA2 (proteína de replicação subunidade 2) (códons 1-40, e 286-448); NMHC II-A (códons 154-306); FANCD2 (Anemia de Fanconi grupo de complementação D2) (códons 219-395); mSin3A (códons 371-387); HDAC1 (histona deacetilase) (códons 145-450); ASK (ativador da quinase fase-S) (códons 558-610); e CHES1 (códons 428-610). As regiões que a menin interage com outras proteínas como GFAP (proteína glial fibrilar ácida), vimentina, Smad1/5, Runx2, MLL (*mixed-lineage leukemia*) e o receptor alfa do estrogênio ainda não foram determinados. Adaptado de Balogh K, 2006.

Tabela 2. Funções da menin indicada pela sua interação direta com diversas proteínas e outras moléculas (5).

Função	Interação	Autores/ano
Regulação da Transcrição	JunD	Agarwal <i>et al.</i> (1999)
	NFkB	Heppner <i>et al.</i> (2001)
	Pem	Lemmens <i>et al.</i> (2001)
	Sin3A	Kim <i>et al.</i> (2003)
	Smad1	Sowa <i>et al.</i> (2004)
	Smad3	Kaji <i>et al.</i> (2001)
	Smad 5	Sowa <i>et al.</i> (2004)
	Runx2	Sowa <i>et al.</i> (2004)
	MLL	Hughes <i>et al.</i> (2004); Yokoyama <i>et al.</i> (2004)
	Receptor α do estrogênio	Dreijerink <i>et al.</i> (2006)
Estabilidade genômica	CHES1	Busygina <i>et al.</i> (2006)
	DNA de cadeia dupla	La <i>et al.</i> (2004)
	RPA2	Sukhodolets <i>et al.</i> (2003)
Divisão celular	FANCD2	Jin <i>et al.</i> (2003)
	NMMHCII-A	Obungu <i>et al.</i> (2003)
	GFAP	Lopez-Egido <i>et al.</i> (2002)
Controle do ciclo celular	Vimentina	Lopez-Egido <i>et al.</i> (2002)
	nm23	Ohkura <i>et al.</i> (2001)
	ASK	Schnepp <i>et al.</i> (2004)

NF-kB: fator nuclear kappaB; Pem: proteína de expressão embrionária e placentária; MLL: *mixed-lineage leukemia*; RPA2: proteína de replicação subunidade 2; FANCD2: Anemia de Fanconi grupo de complementação D2; GFAP: proteína glial fibrilar ácida; ASK: ativador da fase - S quinase.

1.3.2. Regulação do crescimento e ciclo celular

Quando a célula inicia o ciclo celular, a expressão da *menin* transitoriamente diminui seguida de um aumento na progressão celular para a fase S (Fig 3). Por isso, esta proteína é considerada repressora da proliferação celular, e a eliminação da mesma em células epiteliais do intestino de rato levou ao aumento da proliferação celular (38). Além disso, a análise do perfil do ciclo celular destas células, com a expressão diminuída da *menin*, revela que o número de células na fase G1 está diminuído, enquanto o número de células na fase S está aumentado (39). Mas, ainda permanece incerto como a *menin* interfere na cinética desta transição da fase G1 para S, e se a sua restauração em células desprovidas pode modificar este processo.

A *menin* também tem se mostrado interagir com outras proteínas que são cruciais para a proliferação celular, como o ASK (ativador da fase-S kinase), um componente do complexo quinase ASK-7 do ciclo de divisão celular (CDC). A participação do ASK na indução da proliferação celular *in vivo* parece depender da presença da *menin*, pois ASK induz a proliferação celular na ausência da *menin*, mas não na em sua presença (40). Ou seja, a *menin* pode reprimir a proliferação celular pela inibição do ASK.

Outros estudos recentes também demonstram que a menin participa na regulação da expressão das proteínas p18 e p27, conhecidas como inibidoras da CDK (quinase dependente da ciclina), que podem causar parada na G1 e terminação da síntese do DNA na fase S (36, 39). A expressão da proteína p53 segue a mesma cinética, quando ela está elevada ativa a produção da p21, e tem uma importante função regulatória na parada da G1 e provavelmente também na interface G2-M. Sendo assim, a menin tem a mesma função do p53 de controle na fase G1-S. Esses inibidores da CDK, similarmente a menin, são também altamente expressos nas células quiescentes e têm uma função regulatória importante na parada da G1, sugerindo que a menin pode potencialmente funcionar similarmente aos inibidores da CDK (36). Menin também interage com as proteínas de filamento intermediário tipo III, como a GFAP (proteína glial fibrilar ácida) e a vimentina. Menin e GFAP se associam às células do glioma na fase S-G2 do ciclo celular. A rede de filamento intermediário pode servir como uma rede de sequestro citoplasmático para a menin na fase S e início da fase G2 do ciclo celular (41). É proposto também que a menin tenha uma função inibitória no início da fase S do ciclo celular, e deve ser transferida ao citoplasma para permitir que esta fase prossiga (42-43). Neste modelo, a função da rede de filamento intermediário é sequestrar a menin longe do núcleo e os seus genes alvos (44).

1.3.3. Reparo do DNA

Há evidências de que a menin interfira no sistema de reparo de DNA. Tratamentos químicos em células de paciente acometidos pela MEN1 apresentaram maiores taxas de alterações cromossômicas espontâneas e mitoses com divisão centroméricas prematuras (34, 45).

A menin tem se mostrado associar com a cromatina e a matriz nuclear (NM), e a irradiação γ das células aumentou o acúmulo da menin na NM e diminuiu sua quantidade na fração solúvel. Isto sugere que o dano do DNA induzido pela irradiação γ leva a translocação da menin à NM, e a partir disto ela pode reparar o dano ao DNA (36). A associação da menin com a cromatina e a NM pode também ser crucial para outras funções da menin, como por exemplo, a regulação da transcrição gênica.

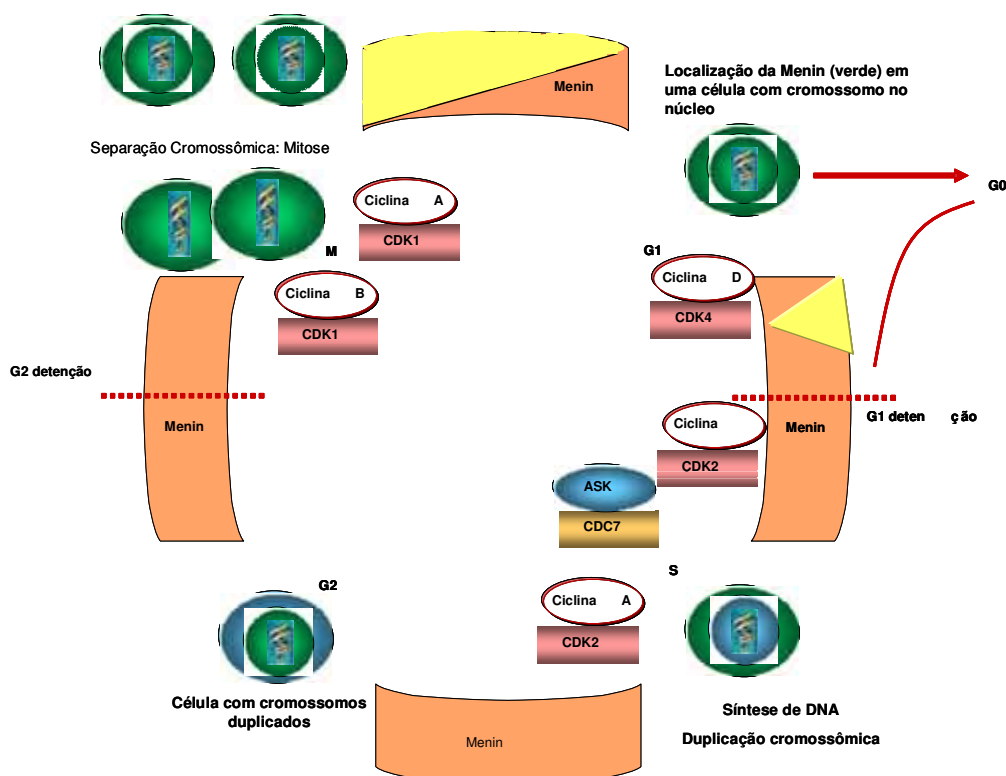


Figura 3. Representação da regulação do ciclo celular pela menin. As fases do ciclo celular são mostradas como M (mitose e divisão celular), S (Síntese de DNA e duplicação cromossômica), G1 e G2 (fases de brecha), G0 (fase de descanso). Os pontos de controle são indicados pelas linhas em travessão (paradas G1 e G2). A progressão pelo ciclo celular depende da atividade das quinases dependentes da ciclinas (CDKs), que são positivamente reguladas pelas ciclinas. O ASK (ativador da fase-S kinase) junto com a proteína kinase CDC7 serve como reguladora da fase S. A menin tem mostrado diminuir o número de células em G1, mas aumenta o número de células em G2-M. Com isto, a expressão do nível da menin (ilustrada nas áreas em amarelo) é relativamente alta nas células durante G0-G1, depois transitoriamente diminui quando as células entram no ciclo celular, e aumenta novamente quando a célula entra na fase S. Adaptado de Balogh K, 2006.

1.3.4 Regulação da transcrição gênica

Estudos recentes sugerem que a *menin* exerce seus efeitos predominantemente por meio da inibição da transcrição gênica. Alternativamente, ela também pode influenciar a expressão de genes alvos. Por exemplo, a expressão ectópica da *menin* inibe a atividade promotora dos genes da prolactina nos tumores hipofisários e da insulina nas células dos insulinomas (39,46).

1.3.4.1. Interação da *menin* com *junD*

Um dos mecanismos pelos quais a *menin* reprime a transcrição, é pela sua ligação com a *JunD*. Esta, por sua vez, faz parte de um complexo protéico que juntos formam um fator de transcrição chamado AP-1 (ativador da proteína 1) (3, 36). AP-1, então, é um composto das proteínas *jun* (*v-jun*, *c-jun*, *junB*, *junD*) e *fos* (*v-fos*, *c-fos*, *fosB*, *fra1* e *fra2*) (47). Estas proteínas em forma de homodímeros ou heterodímeros se ligam a uma sequência de DNA chamada AP-1, para depois ativarem a transcrição gênica.

JunD pode normalmente existir formando um complexo com *menin*, ou de uma forma livre (36). A fração livre promove o

crescimento celular e a fração ligada a JunD promove a supressão do crescimento celular. Por isso que a interação de menin com junD impedirá a transcrição gênica (Fig 4).

Descobriu-se também que há duas isoformas de JunD expressas em todos os tipos de células e tecidos: uma forma longa e completa (junD-FL) e a outra truncada (junD-T). A menin suprime a atividade de transcrição da primeira, mas não da segunda, o que faz da junD-FL um alvo funcional da menin (36).

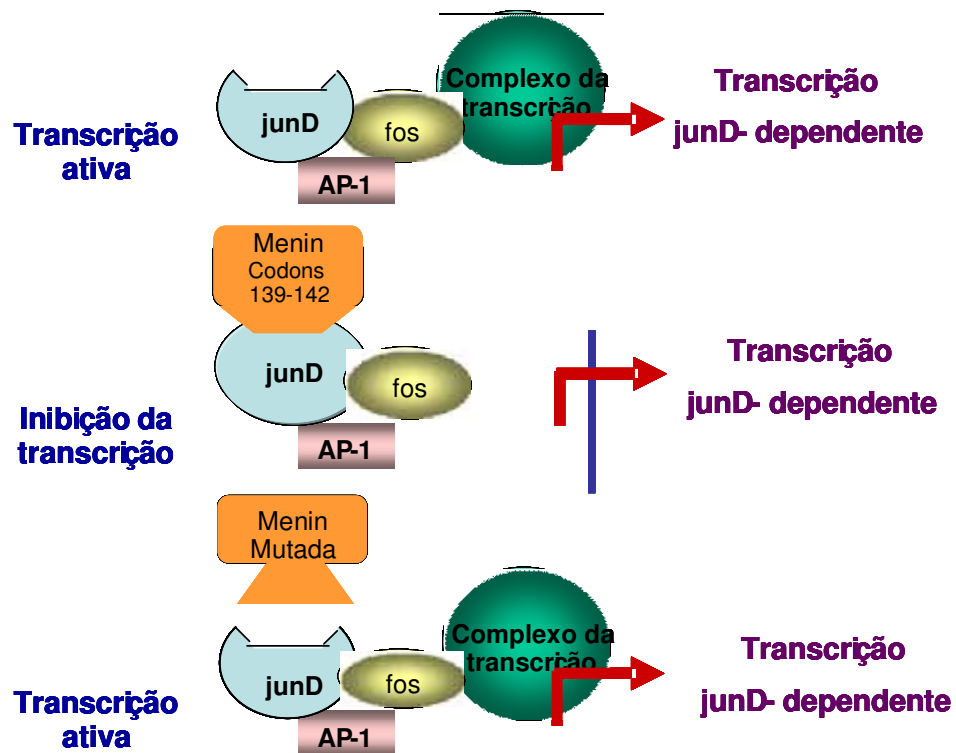


Figura 4. Representação da interação menin-junD. Os fatores transcripcionais junD e fos interagem com AP-1 (ativador da proteína 1) e com isto ativam a transcrição gênica. A interação junD com menin inibe a transcrição genética. Por isso mutações nos códons onde estas proteínas se interagem predispõem a formação de tumores. Adaptado de Hoff AO, 2000.

Os pontos de ligação da JunD com menin dão-se entre os códons 1-40, 139-242, e 323-428. Portanto mutações missense no gene *MEN1* entre estes códons inibem a interação destas duas proteínas, podendo levar a formação de tumores.

1.3.4.2. Interação com o fator TGF β .

O TGF β (fator de crescimento de transformação beta) além de estar envolvido em diferentes processos biológicos durante o desenvolvimento embrionário, exerce diversas funções na homeostase tecidual do organismo adulto. Na célula normal, existe um delicado equilíbrio na regulação negativa e positiva de proliferação determinando um ciclo celular normal. No câncer, essa homeostase fica alterada pelo aumento do sinal estimulatório (oncogene e agentes mitogênicos), ou pela diminuição dos sinais inibitórios (supressor tumoral e indutores de apoptose) (48). Em geral, nas células de origem epitelial, o TGF β age como "supressor tumoral", impedindo a progressão do ciclo celular. Alterações dos componentes da via da sinalização do mesmo são observadas em uma ampla gama de tumores humanos (49).

O TGF β pertence à uma família de fatores de crescimento que promovem diferentes respostas biológicas ligando-se a

dois pares de receptores de membranas do tipo I e do tipo II. O tipo I propaga a sinalização por meio da ativação e fosforilação de proteínas citoplasmáticas da família das Smads conhecidas como R-Smads (*receptor-regulated Smads*), Smad2 e Smad3. A fosforilação das R-Smads permite a sua interação com o co-Smad (*common-mediator Smad*), Smad4, formando um complexo capaz de atingir o núcleo, onde irão modular a transcrição de genes-alvos (49). Foi visto que fisiologicamente a menin interage com a Smad1, Smad3 e Smad 5 e uma função prejudicada da mesma pode bloquear os efeitos transcricionais do TGF β mediado pela Smads (5,36). Com isto, pode alterar a homeostase do TGF β e propiciar a formação de tumores.

1.3.4.3. Associação com a histona metiltransferase

MLL (*mixed-lineage leukemia*) é um proto-oncogene que é mutado numa variedade de leucemias humanas (50). Como resultado de uma translocação cromossômica, MLL é fundido com uma de mais de 40 proteínas de padrão diferente, para produzir uma coleção diversa de proteínas de fusão quimérica (51,52,53). Apesar da sua diversidade, as fusões protéicas parecem ativar MLL por meio de dois mecanismos alternativos, dimerização ou oligomerização (50). Ambos os mecanismos resultam na expressão inapropriada de um subconjunto

de genes *Hox*. Estes codificam fatores de transcrição que têm um papel importante no desenvolvimento dos animais; agrupam-se num clúster ou conjunto de genes que é o resultado da duplicação de um gene primordial.

A proteína menin, por sua vez, é um componente essencial para o complexo MLL, ela é necessária para a manutenção da expressão do gene *Hox* (50), mais especificamente os genes *Hoxa9* e *Hoxc8* (39, 54, 55). Este complexo menin-MLL têm uma atividade metiltransferase histona específica para H3K4 (*histone H3 lysine 4*) e ativa a transcrição gênica (36,39). Além do mais, nesta cooperação interativa com as proteínas MLL, diretamente a menin regula também a expressão dos genes *p27^{kip1}* e *p18^{ink4c}*, que junto com a regulação do gene *Hox* leva à inibição do crescimento celular, ou da sua diferenciação (36,39).

1.3.4.4. Interação com IGFBP2

Menin causa supressão do IGFBP2 (*insulin-like growth factor binding protein 2*) endógeno, que por sua vez, inibe a proliferação celular induzida pelos fatores de crescimento insulina símile (36). Esta

supressão em parte é executada por meio da alteração da estrutura da cromatina do promotor do gene do IGFBP2 (56).

A ablação do *MEN1* em fibroblastos embrionários de ratos reduziu a expressão deste gene, e aumentou a expressão do *IGFBP-2*. E a complementação das células desprovidas de menin com esta proteína restaurou a expressão do mesmo, sugerindo fortemente uma essencial função da menin na regulação da transcrição deste gene (39).

1.3.4.5. Interação com NF-kappaB.

O NF-kappaB (NFkB) é um fator de transcrição que participa da resposta imune, da transformação celular, oncogênese, e serve como um mediador positivo do crescimento celular (57). No citoplasma ele é inativo porque está ligado ao seu inibidor (Ikb). Após um estímulo adequado, o Ikb é fosforilado, e esta fosforilação libera o NFkB que se transloca para o núcleo, e ao se ligar a moléculas coativadoras, causa a acetilação de histonas e conseqüentemente a transcrição genética. A menin tem mostrado inibir a atividade transcricional também por meio de sua ligação com o NFkB (36,57).

Sendo assim, a perda desta repressão por uma menin alterada poderá levar à formação de tumores.

A acetilação e deacetilação das histonas têm uma função crucial na remodelação da cromatina e regulação da expressão gênica (58-59). A acetilação pode ser revertida pelas histonas deacetilases (HDACs) que removem o grupo acetil das histonas, e com isto reprimem a transcrição gênica (39). Foi sugerido recentemente que a menin pode inibir a transcrição de certos genes via o recrutamento das HDACs às regiões promotoras (39). Como isto ocorre e a relação disto com o NFkB precisam ser elucidados, mas a menin pode utilizar um mecanismo comum para exercer seus efeitos supressores; agindo como repressora do JunD por exemplo, ou recrutando elementos repressores da transcrição como as HDACs (60).

1.3.5. Regulação da estabilidade genômica

Diversos estudos prévios reportaram aumento da quebra de cromossomos em linfócitos de pacientes com MEN1 (61), o que diretamente atenta à função da menin na estabilidade do DNA. Ela interage com diversas proteínas que estão envolvidas no reparo do DNA como a FANCD2 (Anemia de Fanconi grupo de complementação

D2). O *FANCD2* é um dos sete genes mutados na anemia de Fanconi, uma doença genética associada à falência medular progressiva e predisposição à leucemia mielóide aguda (36). A interação entre menin e *FANCD2* é aumentada pela irradiação γ , e pode ser regulada pela fosforilação, que, além disso, aumenta a função dessas proteínas no reparo do DNA (62).

A menin também tem estado no controle da estabilidade genômica por causa da sua interação com a RPA2 (proteína de replicação subunidade 2), que é uma proteína heterotrimérica requerida para o reparo, replicação e recombinação do DNA (5,36,63).

1.3.6. Controle da Apoptose

Tem se proposto a participação da menin no controle da apoptose por diversos mecanismos. Ela interage com as proteínas Bax e Bak, que são pró-aptóicas e junto com a menin formam um caminho para a morte celular (64). Deleções no gene *MEN1* diminuíram a apoptose induzida pelo fator necrose tumoral alfa (TNF- α), que é uma citocina mediadora deste processo. Além disso, a menin induz a expressão da caspase 8 (39), que é uma protease com um papel

essencial na apoptose em todo tipo de célula e em todo organismo multicelular já estudado. Inclusive, alguns estudos experimentais sugeriram que a menin suprime a tumorigênese pela promoção da apoptose, pelo menos em parte, pela modulação da expressão desta protease (39).

1.4. Participação da Menin nos Tumores Endócrinos

Estudos em diversos tecidos humanos mostraram que a expressão da menin é baixa nos tumores tireoidianos, embora seja abundante nos tumores adrenocorticais e paratireoidianos (36). Mostram uma importante função da expressão da menin nas neoplasias da paratireóide e glândula adrenal, mas menos importantes nos tumores tireoidianos (65).

O TGF β é um regulador negativo da proliferação das células da paratireóide e da secreção do PTH. E a perda da sua sinalização pela inativação da menin, provavelmente contribui para a tumorigênese paratireoidiana (65).

Embora a menin tenha uma limitada função no desenvolvimento e progressão dos tumores pituitários esporádicos, a sua participação na hipófise foi demonstrada pelos tumores hipofisários associados à MEN1 (66,67). Foi mostrado que a activina, um membro

da super família TGF β , regula negativamente a expressão da prolactina (PRL), inibe a secreção basal do GH e do ACTH, mas estimula a síntese e secreção do hormônio folículo estimulante (FSH). Além disso, a activina suprime a transcrição e expressão do Pit-1, um fator transcricional hipofisário, que tem uma função essencial no desenvolvimento e manutenção das células lactotróficas e regulação da expressão da PRL e GH. Como mencionamos anteriormente, a fosforilação das Smads é a reguladora chave dos efeitos nucleares dos TGF β . E o mesmo se dá com a activina, de maneira que a interação da menin com as Smads, especificamente a Smad 3, pode alterar a ação inibitória da activina no crescimento celular da hipófise (36).

Quanto aos tumores pancreáticos, tem sido mostrado que a menin inibe a transcrição da insulina e a proliferação celular na linhagem das células do insulinoma, sugerindo que a disfunção da menin exerce uma função importante na tumorigênese dos insulinomas (36).

Outras recentes funções reconhecidas da menin foi sua participação na linhagem e diferenciação osteoblástica e na hematopoiese (36).

Em suma, a menin tem mostrado exercer funções essenciais e por isso tem sido considerada como proteína guardião do genoma (34) (figura 5). Mas, para uma compreensão mais completa de

suas principais atividades no processo celular, novos estudos ainda são necessários (36).

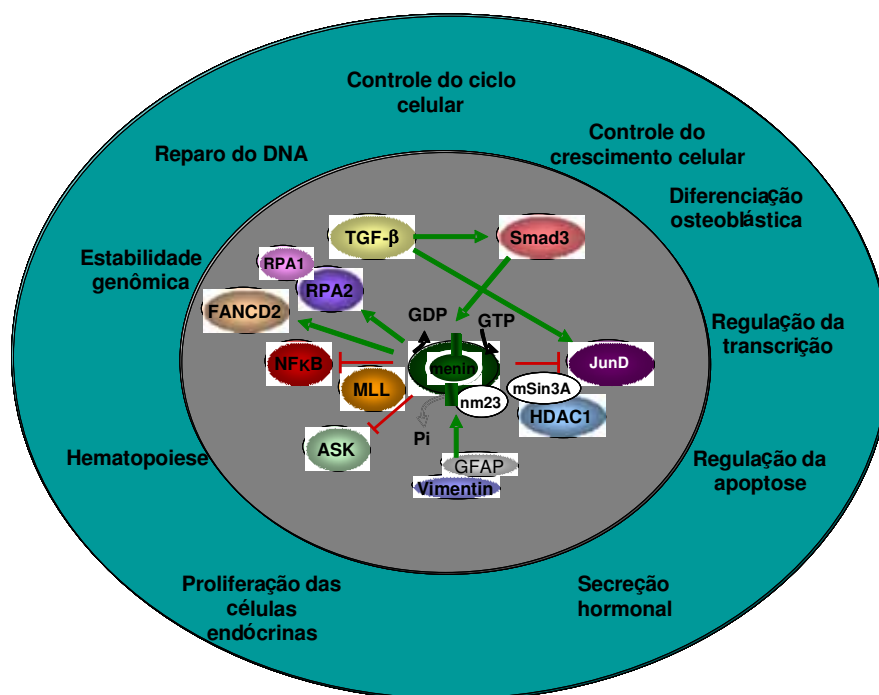


Figura 5. Sumário da menin com suas proteínas interativas (MIPs) e suas principais ações. Menin e suas MIPs são apresentadas no centro da figura, as linhas vermelhas estão representando a inibição e as flechas verdes estão indicando ativação. No centro, a menin é desenhada dentro de um oval, representando sua atividade GTPase que requer nm23. A membrana nuclear está omitida. As funções são mostradas na área verde sombreada. Adaptado de Balogh K, 2006.

1.5. Mutações e Polimorfismos do Gene *MEN1*

A identificação do gene *MEN1* possibilitou a detecção de mutações causadoras da doença, e com isto a confirmação do diagnóstico clínico em pacientes acometidos, bem como o diagnóstico precoce em familiares assintomáticos.

Mutações germinativas no gene *MEN1* são encontradas em cerca de 80 a 90% dos pacientes com a doença familiar, que tiveram o estudo genético realizado (9). Recentemente foi construída uma base de dados das mutações publicadas no *MEN1* desde a identificação do mesmo em 1997 (5). Os autores identificaram 159 artigos reportando 1,336 anormalidades na sequência do *MEN1*; 1,133 mutações germinativas e 203 mutações somáticas. Estas consistiam em 459 tipos diferentes de mutações germinativas e 167 tipos diferentes de mutações somáticas. Sendo que 61 mutações germinativas eram semelhantes às mutações somáticas, o que totalizou em 565 diferentes mutações no gene *MEN1*.

Por meio do estudo de diversas famílias portadoras da *MEN1* e de tumores esporádicos, pode-se afirmar que não existe correlação genótipo-fenótipo nesta neoplasia (7,68). Ou seja, famílias com manifestações clínicas muito semelhantes não tiveram a mesma

mutação e, da mesma forma, famílias com a mesma mutação não demonstram manifestações clínicas específicas àquela mutação (12).

As mutações encontradas estão dispersas por toda a região codificadora e nos limites éxon-intron do gene (sítio de *splice*) (5), cujas principais classes são: a) mutações com troca de sentido (*missense*) (20%), b) mutações sem sentido (*nonsense*) (23%), c) deleções ou inserções de mudança de quadro (*frameshift*) (41%), d) mutações em sítio de *splice* (9%), e) deleções ou inserções *in frame* (6%), f) deleções inteiras ou parciais do gene (1%).

As mutações *frameshift* e *nonsense*, que são a maioria, resultam na formação de uma proteína truncada com a perda de seu domínio funcional, incluindo o NLS na região C-terminal (5). Ou seja, além de possuírem uma conformação anômala podem ter sua função nuclear inativada. Já as mutações no sítio de *splice* podem introduzir sequências intrônicas na sequência codificadora do RNAm maduro, que no final introduzirá aminoácidos adicionais , causando com isto um *frameshift*, ou ainda podem excluir o exon a jusante ou a montante, levando a um polipeptídeo não-funcional, devido a perda de um grupo de aminoácidos importantes (5). Mutações *missense* podem levar à inativação da *menin* por afetar funcionalmente resíduos de aminoácidos críticos envolvidos na interação e na atividade supressora do tumor. Por exemplo, algumas mutações *missense* no *MEN1* têm mostrado afetar

a capacidade de ligação da menin a outras proteínas que incluem JunD (69), nm23 (70), RPA2 (71), Sin3A (72), MLL (73) e o receptor α do estrogênio (74). Outras mutações missenses resultaram na redução da estabilidade proteica e aumento da degradação proteolítica (75), sugerindo com isto outro mecanismo para a patogênese deste tipo de mutação.

Há algumas mutações que são mais frequentes que outras (figura 6 e tabela 3), como por exemplo, nos códons 83-84, 210-211, 460 e 516, que apresentam respectivamente frequência de 4,5%, 2.5% e 2.6% e 2.7% das mutações descritas (5). Estas regiões de DNA são consideradas instáveis, e podem predispor a um deslizamento da enzima DNA polimerase, ocasionando com isto pequenas inserções ou deleções de nucleotídeos (76). Os nucleotídeos 98, 120, e 415 também tiveram mutações em mais de 1,5% das famílias afetadas. Entretanto, apesar disto, não podemos afirmar que há áreas específicas no *MEN1* para a avaliação mutacional (*hot spot*), de maneira que a pesquisa de mutações deve ser realizada em todo o gene.

Um total de 24 polimorfismos (12 na região codificadora [10 sinônimas e duas não sinônimas], nove nos introns, e três na região não traduzida) do gene *MEN1* também foi reportado (tabela 3).

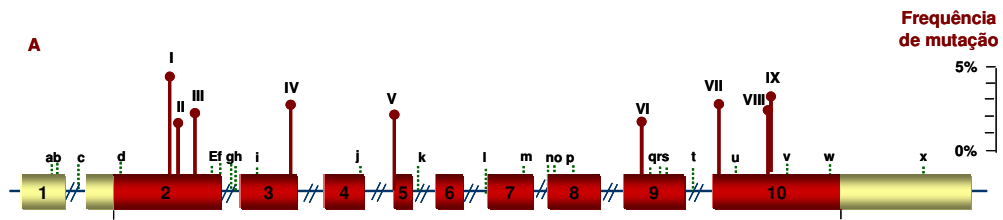


Figura 6. Representação dos sítios das nove mutações que apresentam com uma frequência maior que 1,5% (I-IX). À direita está apresentada a frequência de cada mutação e nas linhas verticais estão suas respectivas localizações. Adaptado de Lemos MC,2008.

Tabela 3. Representação das mutações germinativas mais frequentes no gene *MEN1* que juntas representam 20.6% de todas as mutações germinativas reportadas.

Mutação ^a	Mudança na sequência do DNA ^b	Exon	Códon	Efeito	Frequência (%) ^c
I	c.249_252 de lGTCT	2	83-84	fs	4,5
II	c.292C>T	2	98	ns, Arg98Ter	1,5
III	c.358_360delAAG	2	120	if	1,7
IV	c.628_631delACAG	3	210-211	fs	2,5
V	c.784-9G>A	Intron 4	-	sp	1,9
VI	c.1243C>T	9	415	ns, Arg415Ter	1,5
VII	c.1378C>T	10	460	ns, Arg460Ter	2,6
VIII	c.1546delC	10	516	fs	1,8
IX	c.1546_1547insC	10	516	fs	2,7

^anúmero da mutação referida na figura 6;

^bas mutações são numeradas em relação à sequência referente ao cDNA do *MEN1*;

^cfrequências baseadas nas 1133 mutações germinativas independentemente reportadas;

fs mutação frameshift; ns mutação nonsense, sp mutação em sítio de splice, if mutação in frame. Adaptado de Lemos MC, 2008.

1.6. Rastreamento Genético

O rastreamento para a MEN1 é muito importante; o estudo genético não orientará diretamente um tratamento específico, mas propiciará um diagnóstico mais precoce das neoplasias associadas. Além disso, um programa de rastreamento pode ser suspenso em não portadores de mutações e intensificado em pessoas que têm uma mutação identificada (12).

De acordo com o último e único consenso sobre as neoplasias endócrinas múltiplas (9), os candidatos para pesquisa de mutação no gene *MEN1* são: pacientes índices (presença de pelo menos dois dos três principais tumores associados); parentes de primeiro grau dos casos índices; pacientes que apresentam características sugestivas de MEN1, mas sem os critérios diagnósticos clássicos (por exemplo: portadores de tumores paratireoidianos múltiplos antes dos 30 anos ou de tumores enteropancreáticos múltiplos em qualquer idade).

O consenso também propõe aos pacientes com o rastreamento genético positivo um seguimento anual com exames laboratoriais, e de imagem a cada três anos, a fim de se diagnosticar precocemente HPP, tumores enteropancreáticos, AH, tumores carcinoides, dentre outros (tabela 4) (9).

É então preconizada a pesquisa dos principais tumores associados a MEN1 em pacientes já com o diagnóstico da síndrome ou nos portadores da mutação. Mas a abordagem inversa que é a investigação da MEN1 em pacientes com diagnóstico inicial apenas de um dos principais tumores associados tem sido pouco explorada.

Tabela 4. Programa de investigação clínica proposto pelo consenso de MEN1 aos familiares de pacientes acometidos que tiveram o rastreamento genético positivo (9).

Tumor	Idade para início (anos)	Testes bioquímicos anuais	Teste de imagem a cada 3 anos
Adenoma de paratireóide	8	Cálcio (Ca ⁺⁺) PTH	Nenhum
Gastrinoma	20	gastrina	Nenhum
Insulinoma	5	Glicemia de jejum	
Outro tumor enteropancreático	20	Cromogranina A, glucagon, proinsulina	¹¹¹ In-DTPA octreotide scan; CAT ou RMN
Adenoma hipofisário	5	PRL; IGF-I	RMN
Tumor carcinoide	20	Nenhum	CAT

PRL: prolactina, PTH: paratormônio, IGF-I: fator de crescimento insulina símile 1, CAT: tomografia, RMN: ressonância magnética.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho consistiram em:

1. Avaliar a frequência da MEN1 em um grupo de pacientes com AH;
2. Identificar nestes indivíduos variáveis capazes de prever com alta probabilidade esta neoplasia;
3. Nos pacientes acometidos, realizar o estudo genético e o rastreamento familiar para MEN1.

3. Pacientes e Métodos

3.1. Avaliação da frequência da MEN1 num grupo de pacientes com AH

A casuística foi composta de 102 pacientes com diagnóstico de AH acompanhados no ambulatório de Distúrbios da Hipófise da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, durante os anos de 2005 a 2007. Todos estes pacientes tiveram este diagnóstico confirmado por Ressonância Magnética (RNM), biópsia de tumor, ou hipersecreção hormonal. Os indivíduos tiveram os seus prontuários estudados quanto à presença de MEN1, por meio da avaliação laboratorial para HPP, e para algum tumor enteropancreático.

Os critérios diagnósticos para HPP foram: cálcio sérico maior que 10,2 mg/dL (valor de referência: 8,5 a 10,2mg/dL) , hipercalciúria (cálcio em urina de 24h maior que 4mg/kg), paratormônio (PTH) maior que 65 ng/L e função renal normal. Os critérios diagnósticos para os tumores enteropancreáticos foram: hipersecreção hormonal e confirmação com o estudo imunoistoquímico da lesão.

Posteriormente, foi realizado um estudo retrospectivo das seguintes variáveis em relação à MEN 1: idade, sexo, tamanho do tumor; MIC ou MAC, tipo de AH (secretor de PRL, GH, ACTH, TSH, LH/FSH, ou CNF).

Foram excluídos do trabalho os pacientes cujo padrão de secreção hormonal do AH não tenha sido definido, e os pacientes que apresentaram apenas o AH como critério diagnóstico para MEN1 e não tiveram a avaliação laboratorial para HPP, ou a tiveram, mas a mesma não foi concluída.

A análise de regressão logística múltipla (77) foi empregada para determinar as variáveis preditivas mais fortemente associadas à presença de MEN1. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.1.1. Rastreamento Genético

A pesquisa de mutação foi realizada primeiramente nos indivíduos afetados, e depois nos respectivos familiares que ainda não tinham sido investigados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Anexo 2), com o consentimento informado dos pacientes que foram submetidos ao rastreamento genético e clínico (Anexo 3).

A extração do DNA, sua amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e purificação dos fragmentos amplificados foram realizados no Laboratório Experimental da Clínica Médica da

Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, o sequenciamento automático do DNA foi feito no Laboratório Biogen do Instituto de Biociências – UNESP de Botucatu.

3.2. Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico foi isolado de leucócitos periféricos (sangue total) pelo método de *Salting out* (15), as etapas foram:

a) Coleta do material: Foram coletados 5 mL a 10 mL de sangue periférico em tubo Falcon de 15 mL, contendo EDTA 0,4 mM, pH 8,0. O material foi armazenado por pelo menos uma semana na geladeira à temperatura de 2°C a 8°C.

b) Lise das hemácias: Para cada 5 mL de sangue total foi completado o volume para 15 mL de tampão TE (5 mL de solução Tris 1M, pH 8,0; 100 µL de EDTA 0,5M, pH 8,0; 500 mL q.s.p de H₂O mQ) em tubo graduado de centrífuga de 15mL. O material foi homogeneizado por inversão e centrifugado a 1500 RPM por 10 min, para separação dos leucócitos.

c) Lavagem: Após a centrifugação, o sobrenadante (com hemácias lisadas) foi descartado e mais 15 mL do tampão TE foram adicionados ao sedimento leucocitário. O material foi novamente agitado, centrifugado, e o sobrenadante desprezado. Esta etapa foi repetida por quatro vezes até que o sedimento leucocitário se tornou esbranquiçado.

d) Lise dos leucócitos: O sedimento leucocitário foi então ressuspenso em 3 mL de solução Buffer A (2 mL de EDTA 0,5M, 5 mL de solução Tris 1M, pH 8,0, 40 mL solução NaCl 5M, 500 mL q.s.p. de H₂O mQ), 200 µL de SDS 10% (Sigma-Aldrich, MO, USA), e 100 µL de solução proteinase K (100 mg de proteinase PK, 1 mL de SDS 10%, 40 µL de EDTA 0,5M, 8,96 mL de H₂O mQ) (Invitrogen, SP, Brasil). A seguir este material foi incubado *overnight* em banho-maria a 37°C.

d) Precipitação: Após a incubação, foi adicionado 1 mL de NaCl 5M, o material foi agitado vigorosamente durante 30 minutos, e em seguida centrifugado a 4°C, 2500 RPM por 15 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga graduado de 15 mL e foi adicionado lentamente pelas paredes do tubo 10 mL de etanol 100% (mantido -20°C). O material foi misturado vagarosamente por inversão até o aparecimento de um precipitado fibrilar (DNA). O DNA precipitado foi “pescado” e transferido para um microtubo de 1,5 mL e deixado para

secar à temperatura ambiente. Após o DNA estar seco, o sedimento foi então ressuspensão em H₂O mQ estéril, e incubado em banho-maria a 37°C por 15 minutos, depois desse tempo, foi colocado à temperatura ambiente *overnight*.

A integridade das moléculas de DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). O procedimento foi realizado na voltagem de 80V por aproximadamente 45 minutos com tampão TAE (Tris/Ácido acético/EDTA) 1X. Posteriormente, o gel foi colocado sobre a transluminação ultravioleta (aparelho *Foto UV 450 DNA Transilluminator*), e o DNA visualizado e captado pelo programa de computador *Labworks* (Ultra-Violet Products Ltd, Upland, CA, USA). O DNA digerido com a enzima de restrição *HindIII* (Invitrogen, SP, Brasil) foi usado como padrão (100 pb) para comparação de peso molecular.

A concentração das amostras de DNA foi obtida por espectrofotometria, com leitura à densidade óptica de 260 nm (1DO = 50 µg/mL). Depois da quantificação, foi realizada a diluição das amostras para que a concentração final de DNA destas amostras ficasse em torno de 500 ng/µL.

3.3. Amplificação do gene *MEN1*

As reações de PCR realizadas no estudo envolveram toda a região codificadora do gene *MEN1* que inclui o exon 2 ao exon 10 (o exon 1 não é transcrito), os sítios de *splicing* também foram amplificados.

Na amplificação dos nove exons, foram utilizados 12 pares de *primers* (tabela 4). Para o exon 3 e uma parte do exon 10 foram utilizados *primers* intrônicos previamente descritos (16). Enquanto para os demais exons foram utilizados *primers* intrônicos desenhados em nosso laboratório.

Tabela 5. Doze pares de *primers* que foram usados para amplificação os nove éxons do gene.

nº	“Sense primer”	“Antisense primer”	Fragmento (bp)	Exon
1	TCCCTCCCCCGGCTTGCCTT	ACGTTGGTAGGGATGACGCG	220	2
2	TGCTGGGCTTCGTGGAGCAT	GAGACACCCCCTTCTCGAGG	220	2
3	GCCCGCTTCACCGCCAGAT	GGAGGGTTTTGAAGAAGTGG	230	2
4	GCACAGAGGACCCTCTTTCATTAC*	TGGGTGGCTTGGGCTACTACAG*	306	3
5	AGGGTGGGCCATCATGAGAC	TAGCCCAGTCCTGCCCCATT	207	4
6	CATAACTCTCTCCTTCGGCT	TCTGCACCCTCCTTAGATGC	260	5/6
7	GGATCCTCTGCCTCACCTCC	GCAGGCCCTAGTAGGGGGAT	189	7
8	TTCAGACCCTACAGAGACCC	GCCATGAAACTGAAGGCAC	391	8
9	AGAGACTGATCTGTGCCCTC	AGACCTCTGTGCAGCTGTCC	227	9
10	ACCTTGCTCTCACCTTGCTCTC	CTCCTTCATGCCCTTCATCTTCTC	374	10
11	AGAAGCCAGCACTGGACAAG	CCCACAAGCGGTCCGAAGTCC*	376	10
12	GGGTCCAGTGCTCACTTTCC	CAAGCGGTCCGAAGTCCCA	218	10

* Primes descritos previamente (16), os demais foram desenhados em nosso laboratório. Bp: pares de base

Para um volume final de 25 µL foram utilizados 2,5 µL de tampão Masafumi 10X (1,5 M Tris pH 8,8; 1 M MgCl₂; 1 M (NH₄)₂SO₄; 11 µL β-mercaptoetanol e H₂O qsp 1,5 mL), 10 mM de dNTPs (Invitrogen, SP, Brasil), 0,5 µL de *primer sense* e *antisense* (15 pmol/µL) (Invitrogen, SP, Brasil), 0,175 µL da Taq DNA polimerase (5 U/µL) (Invitrogen, SP, Brasil) e 10% DMSO (Sigma-Aldich, MO, USA). A concentração de DNA utilizada foi de 500 ng, completando-se o volume para 25 µL com água ultrapura.

A amplificação foi realizada no termociclador da marca Eppendorf com gradiente de temperatura, sendo o mesmo programado da seguinte maneira: um ciclo de 5 minutos a 94°C (etapa 1); um ciclo de 45 segundos a 94°C, para desnaturação do DNA (etapa 2); um ciclo de 45 segundos a 63°C, para o pareamento dos *primers* (etapa 3); um ciclo de 60 segundos a 72°C, para a extensão dos *primers* (etapa 4); repetição de 36 vezes, a partir da etapa 2 (etapa 5); um ciclo de 10 minutos a 72°C (etapa 6); temperatura de 4°C (etapa 7). Todos os exons foram submetidos a este mesmo gradiente de temperatura, e não ocorreu qualquer dificuldade na amplificação dos mesmos.

Posteriormente os produtos da PCR, 9 exons do gene *MEN1*, foram purificados pelo *Kit Rapid PCR Purification Systems* (Marligen Bioscience, Alemanha).

3.4. Sequenciamento do gene *MEN1*

Os produtos amplificados pela PCR foram utilizados para o sequenciamento gênico automático, no aparelho Sequenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA).

As reações de sequenciamento foram realizadas para um volume final de 10 μL contendo: 1 μL de *primer sense* a 1,6 pmol/ μL , 2 μL de Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing v 3.1 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA), 1 μL de tampão Save Money, 1,5 μL de amostra e 4,5 μL de água ultrapura.

3.4.1. Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento o termociclador, foi programado da seguinte forma: um ciclo de 10 segundos à temperatura de 96°C, um ciclo de 5 segundos à temperatura de 50°C e um ciclo de 4 min à temperatura de 60°C; tendo sido repetido 25 vezes todas as etapas anteriores, terminando com a temperatura de 4°C. Para atingir as várias temperaturas desejadas, foi realizado um escalonamento de 1°C por 1 segundo.

3.4.2. Reação de precipitação

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram então submetidos à precipitação alcoólica, utilizando-se o seguinte protocolo: para cada amostra da reação de sequenciamento foram

acrescidos 80 μ L de isopropanol a 75%. A solução foi homogeneizada e deixada à temperatura ambiente, protegida da luz, por 15 min. O material foi então submetido à centrifugação 4000 RPM por 45 min, a 4°C, depois foi descartado o sobrenadante e dado um “spin” invertido na placa com as reações de sequenciamento. Posteriormente foram adicionados 150 μ L de etanol a 70% e o material foi novamente centrifugado 4000 RPM por 12 min, a 4°C. O etanol foi descartado, e em seguida foi dado um outro “spin” invertido na placa com as reações de sequenciamento. A seguir, as amostras ficaram 60 minutos protegidas da luz para secar. Posteriormente foram adicionados 10 μ L de formamida HiDi; elas foram então homogeneizadas e colocadas a uma temperatura de 95°C por 5 min para denaturação, e em sequência foram colocadas no gelo.

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram submetidos à eletroforese capilar no sequenciador automático ABI 3100 da Applied Biosystems, onde os fragmentos marcados com fluorescência migraram ordenadamente no interior dos capilares e à medida que foram excitados por um feixe de laser emitiram luz em diferentes comprimentos de onda que foram detectados por uma câmara. Em seguida, essa informação foi transmitida ao computador e processada. Ao final da corrida, os dados foram recuperados em formato de eletroferograma ou de texto (fasta), seguindo-se a análise

de sua sequência, que foi comparada com a sequência NM_130800.2 do gene *MEN1* (Genbank, NCBI, NIH).

3.5. Familiares de paciente com diagnóstico clínico de MEN1 e ausência de mutação

Para os familiares de primeiro grau dos pacientes com diagnóstico clínico de MEN1, cujo estudo genético tenha sido negativo para mutações, foi realizado um rastreamento clínico para esta neoplasia. Este foi adaptado de um programa de *screening* proposto pelo consenso para familiares de casos índices com mutação (9). Sendo assim, além de uma avaliação clínica para investigar sinais e sintomas de possíveis tumores, foram solicitados os seguintes exames:

- 1) *Bioquímicos*: cálcio sérico e urinário, glicose;
- 2) *Hormonais*: PTH, GH, prolactina, insulina. Se GH > 0,4 ng/mL foi realizada a dosagem do GH após o teste de tolerância à glicose;
- 3) *Exames de imagens (apenas para os pacientes sintomáticos ou com exames laboratoriais sugestivos)*: RNM de hipófise, Tomografia computadorizada (TC) de abdome.

3.6. Metodologia aplicada para avaliação hormonal e bioquímica

Para os exames laboratoriais citados acima foram utilizados as seguintes metodologias e os respectivos valores de referência:

- Prolactina: quimioluminescência, valor de referência: mulher 1,9-25 ng/mL e homem 2,5-17 ng/mL.
- GH: quimioluminescência, para o rastreamento negativo da Acromegalia foi considerado normal < 0,4 ng/mL.
- PTH: quimioluminescência; valor de referência 11 a 65 pg/mL.
- Cálcio sérico: química seca; valor de referência 8,4 a 10,2 mg/dL.
- Cálcio urinário: química seca, valor de referência homem < 300 mg/24h; mulher < 250mg/24h.
- Insulina basal: quimioluminescência; valor de referência: 6 a 27 μ UI/mL.
- Glicemia de jejum: química seca, valor normal < 100 mg/dL.

3.7. Avaliação Radiológica

A região hipofisária foi avaliada por ressonância magnética obtendo-se cortes coronais e sagitais em T1 com TR 350 ms e TE=20 ms utilizando-se um aparelho Tesla 0,5 (Sigma GE, Milwaukee, Wisconsin, USA). Quando necessário, a tomografia computadorizada de pâncreas e/ou adrenal foi realizada em cortes axiais de 5X5 mm.

3.8. Familiares de pacientes com diagnóstico clínico de MEN1 com mutação identificada

Os parentes de primeiro grau dos casos índices (com mutação no *MEN1*) com rastreamento genético positivo foram encaminhados a um ambulatório específico de neoplasias endócrinas, onde estão sendo investigados de acordo com os exames citados na tabela 4. Os familiares com o rastreamento genético negativo tiveram alta ambulatorial.

4. Resultados

4.1. Frequência da MEN1 em pacientes com AH e fatores preditivos para esta neoplasia

Dos 102 pacientes inicialmente inseridos no estudo, foram excluídos 12; em cinco deles havia dúvida no padrão de secreção hormonal, dois não tinham cálcio e PTH dosados (um MIC-PRL, e outro MIC-ACTH), e cinco apresentavam o perfil do cálcio alterado e a investigação para o HPP não tinha sido terminada (dois MIC-PRL, um MAC-CNF, um MIC-ACTH, um MAC-GH).

Dos 90 pacientes inclusos, 33 eram homens e 57 eram mulheres. Quanto ao tipo do AH, 36 (40%) eram PRL, 34 (37,8%) eram CNF, 14 (15,6%) apresentavam AH secretor de GH, cinco eram (5,6%) secretores de ACTH, um (1%) secretor de TSH (figura 7.A). Quanto ao tamanho do tumor, 66 (67%) eram MAC e 24 (33%) eram MIC. Todos os pacientes realizaram RNM de hipófise e avaliação hormonal para avaliação do tumor. Com exceção dos PRLs, em que apenas 14% dos pacientes foram submetidos à ressecção cirúrgica da lesão, nos demais tipos de AH, a maioria dos pacientes foi submetida à cirurgia, e com isto teve a confirmação diagnóstica pela RNM de hipófise, avaliação hormonal e anátomopatológico do tumor (figura 7.B).

Dos critérios diagnósticos para MEN1, além do AH, seis pacientes tinham apenas o HPP, uma paciente tinha HPP, insulinoma e

gastrinoma, e três pacientes tinham apenas o insulinoma, sendo que um destes apresentava insulinoma maligno com metástase hepática (tabela 6). Totalizaram dez pacientes com MEN 1, mostrando uma frequência desta neoplasia em AH de 11%.

De outros tumores relacionados, um paciente que apresentava Acromegalia e HPP, apresentava também lipoma e carcinoma papilífero de tireoide, e o paciente com insulinoma maligno apresentava também um adenoma de adrenal clinicamente não funcionante (tabela 6).

Dos pacientes com HPP, todos eram assintomáticos, só tiveram o diagnóstico pelo rastreamento, e todos tinham indicação de paratireoidectomia ao diagnóstico (cálcio sérico maior que 11,2, e/ou cálcio urinário maior que 400mg/24h, e/ou nefrolitíase). Todos tinham função renal normal, um dos pacientes era transplantado do rim, mas antes do transplante já apresentava um padrão laboratorial de HPP, com hipercalcemia e hipofosfatemia, padrão este que se manteve após o transplante, e estabilização da função renal. Três pacientes pertenciam à mesma família.

Os resultados da análise de regressão logística múltipla mostraram-se não significativos para as variáveis: sexo, idade e tipo de AH, mas significativo para MIC/MAC, indicando uma razão de chance 4,5 vezes menor em pacientes com MAC em relação ao MIC, para a

predição de MEN1 (tabela 7). Embora não significativo, há um acúmulo de 1,29 vezes na probabilidade de MEN1 para a sequência de secreção tumoral PRL, GH, ACTH, CNF e TSH (tabela 7).

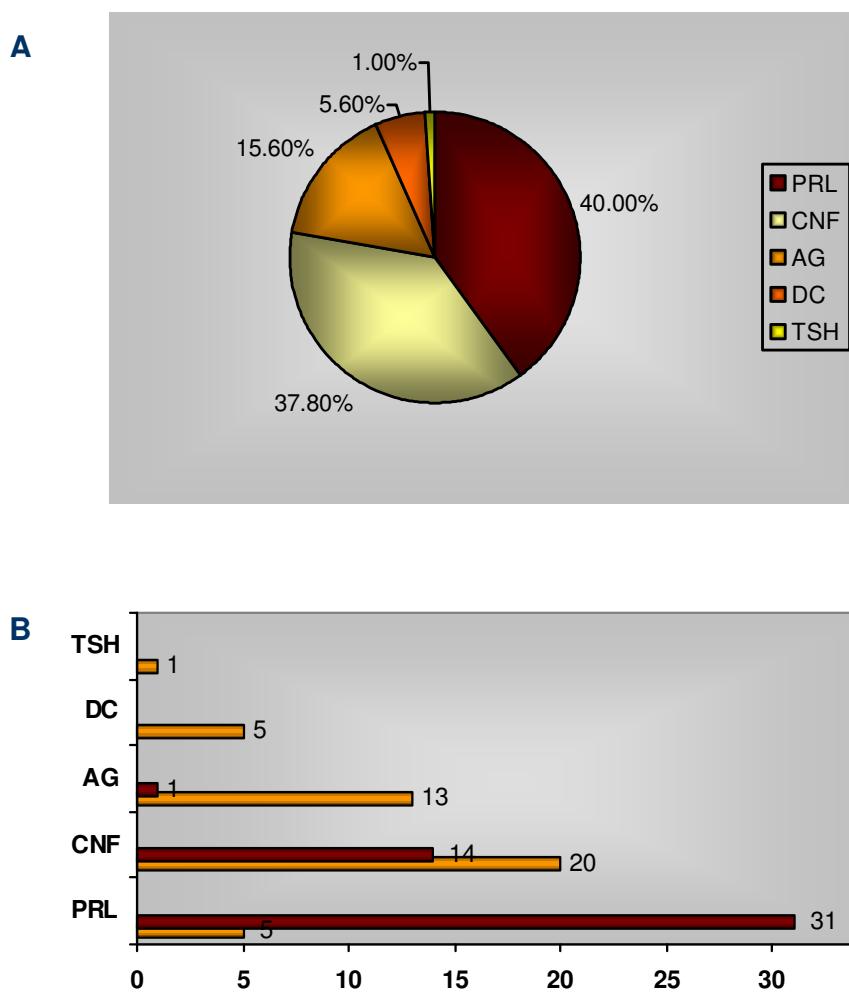


Figura 7. A: distribuição dos 90 pacientes conforme padrão de secreção hormonal; 40% dos adenomas eram prolactinomas (PRL), 37,8% eram clinicamente não funcionantes (CNF), 15,6% eram acromegálicos (AG), 5,6% tinham doença de Cushing (DC) e 1% tumor secretor de TSH (TSH). B: tipo do adenoma hipofisário (AH) conforme padrão de secreção hormonal; em cor laranja estão representados os pacientes cuja confirmação diagnóstica deu-se por Resonância Magnética de hipófise (RNM), avaliação hormonal e anátomopatológico do tumor; em marrom estão representados os pacientes cujo diagnóstico ocorreu apenas pela RNM e avaliação hormonal.

Tabela 6. Descrição dos dez pacientes com diagnóstico de MEN1 ; apresentação dos dados clínicos e laboratoriais.

Pacientes n	Adenoma Hipofisário			Hiperparatireoidismo			Outras doenças
	Idade ao diagnóstico (anos)	Tipo do AH Tamanho Mic/Mac	Idade ao diagnóstico (anos)	Cálcio mg/dL	PTH pg/mL	Tu entero-pancreático	
1	F 21	PRL Mic	23	11,4	99,8	Insulinoma e gastrinoma	
2	F 20	CNF Mic	20	12,25	170	Não	
3	M 51	CNF Mic	51	11,6	276	Não	
4	M 45	AG Mac	53	11,9	76,4	Não	Ca de Tireóide, hemangioma
5	F 23	AG Mac	38	12,6	156	Não	Hepático, lipoma
6	F 53	CNF Mac	61	11	135	Não	Litíase renal e hidronefrose
7	F 56	AG Mac	-	9,7	122	insulinoma	
8	F 55	CNF Mic	-	10,6	76	insulinoma	
9	M 56	CNF Mic	-	9,9	35,2	Insulinoma maligno	Adenoma de adrenal
10	M 44	AG Mac	47	11,7	161	Não	

PRL: Prolactinoma, GH: Acromegalia, ACTH: Doença de Cushing, CNF: Clinicamente não Funcionante, TSH: Tireotropinoma.

Mic: microadenoma (<1cm), Mac: macroadenoma (>1cm). Valores de referência do cálcio e PTH 8-10 e 13-65 respectivamente.

Tabela 7. Regressão logística múltipla da MEN1 (90 pacientes).

Variável	Coefficiente (erro padrão)	P- valor	OR (IC 95%)
Constante	-1,548 (2,111)	-	0,21
Idade (anos)	0,027 (0,026)	>0,05	1,03 (0,89; 1,08)
Sexo (M/F)	0,009 (0,747)	>0,05	1,01 (0,23; 4,36)
Tipo do AH (PRL,GH,ACTH,CNF,TSH)	0,254 (0,265)	>0,05	1,29 (0,77; 2,17)
Micro/Macro	-1,520 (0,773)	<0,05	0,22 (0,05; 0,99)

PRL: Prolactinoma, GH: Acromegalia, ACTH: Doença de Cushing, CNF: Clinicamente não Funcionante, TSH: Tireotropinoma.

4.2. Estudo genético

Os nove exons do gene *MEN1* de nove pacientes foram amplificados (figura 8) e posteriormente foram submetidos ao sequenciamento automático. Após análise das regiões codificadoras e dos sítios de “splice” dos mesmos, foram encontradas duas mutações, três polimorfismos e uma nova variação alélica. O paciente 10 foi o único que não concordou em participar do estudo genético. As alterações de DNA identificadas neste estudo tiveram como referência para o gene *MEN1* a sequência NM_130800.2 (Genbank, NCBI, NIH).

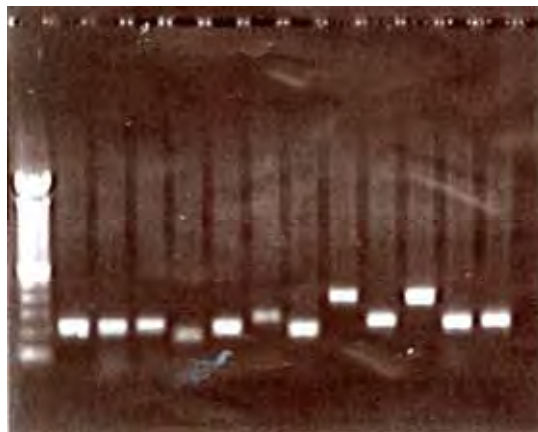


Figura 8. Amplificação dos nove exons do gene *MEN1*. Da esquerda para a direita: exons 2a, 2b, 2c, 3, 4, 5/6, 7, 8, 9, 10a, 10b e 10c.

4.3. Rastreamento familiar dos pacientes com diagnóstico clínico da MEN1

4.3.1. Pacientes com mutação identificada

Foram encontradas mutações nos pacientes 1, 2, 3, 9, sendo os três primeiros pertencentes à mesma família. Na paciente nº1 (figura 9), foi encontrada uma mutação em sítio de “splice”: uma transição G→A na primeira base do intron 4 (IVS4 + 1 G>A) e dois polimorfismos: uma transição C→T no códon 418 (N418N) e uma T→C no códon 433 (H433H) (figura 10).

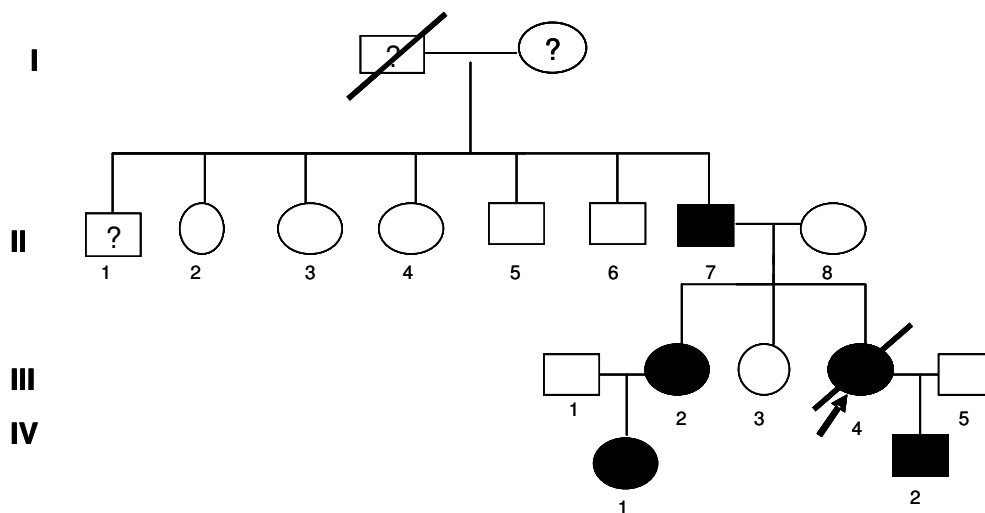


Figura 9: Heredograma da primeira família. A seta indica o paciente caso índice, os quadros com preenchimento negro são os pacientes com a mutação intronica (IVS4 + 1 G>A), os sem preenchimento são os que tiveram o estudo genético realizado e a mutação não foi identificada. Os quadros com ponto de interrogação representam os pacientes que ainda não foram submetidos ao estudo genético.

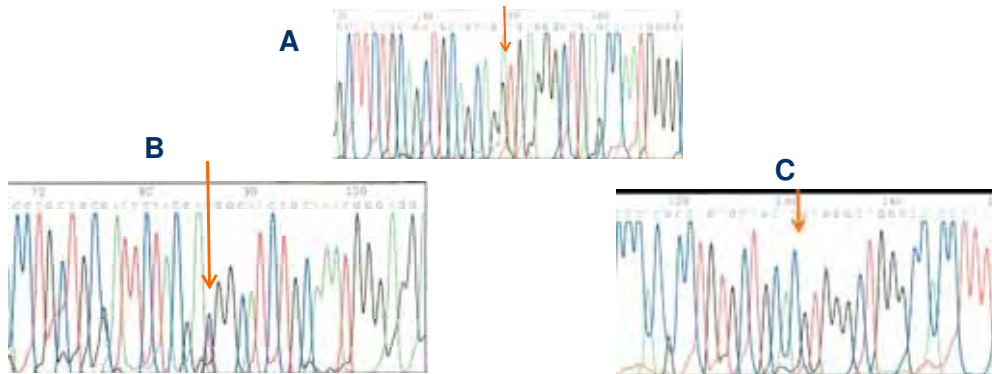


Figura 10. Resultado do sequenciamento do gene *MEN1* da paciente 1. **A:** fita sense do sítio de splice entre o exon 4 e intron 4; a seta assinala a troca do nucleotídeo G pelo A em heterozigose. **B:** fita sense do exon 9; a seta assinala a troca do nucleotídeo C pelo T em heterozigose no códon 418. **C:** fita sense do exon 9; a seta assinala a troca do nucleotídeo T pelo C em homozigose no códon 433.

Nos pacientes 2 (III-2) e 3 (II-7), foi encontrada a mesma mutação IVS4 + 1 G>A (Figura 11). Pode-se também realizar o rastreamento genético nos pacientes II-2, II-3, II-4, II-5, II-6, III-3, IV-1 e IV-2 (Figura 9), tendo sido encontrada a mutação intrônica (IVS4 + 1 G>A) apenas nestes dois últimos. O paciente IV-2 tem 10 anos e já foi submetido ao rastreamento clínico para MEN1, e até este momento foi evidenciado apenas um cálcio discretamente elevado ((10,7 mg/dL), com PTH e cálcio urinário normais. O paciente II-1 não aceitou fazer o estudo genético, e a paciente IV-1 tem menos de cinco anos de idade.

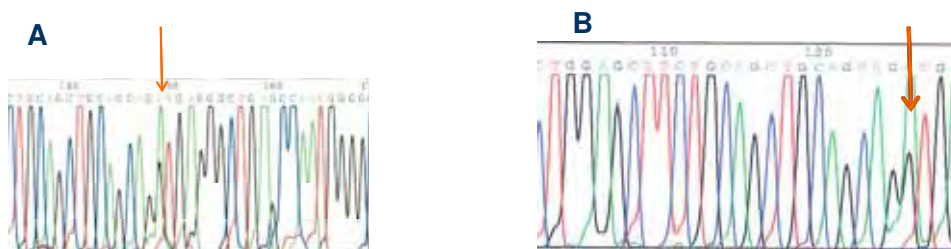


Figura 11. Resultado do sequenciamento do gene *MEN1* dos paciente 2 e 3, **A** e **B** respectivamente: fita sense do sítio de splice entre o exon 4 e intron 4; a seta assinala a troca do nucleotídeo G pelo A em heterozigose.

Somente nos indivíduos II-2, II-3, II-4, II-5 e II-6 foi encontrada uma transversão C→A no códon 72, o que leva à troca do aminoácido prolina por histidina (P72H) (Figura 12). Mediante este achado, estes pacientes também foram submetidos ao rastreamento clínico por meio de RNM de hipófise, dosagem sérica de cálcio, PTH e prolactina, porém, não foram encontradas alterações.

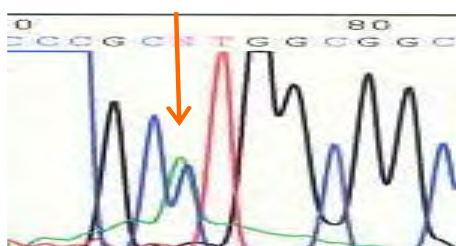


Figura 12. Sequenciamento genético de um dos tios paternos da paciente caso índice. A seta demonstra a transversão em heterozigose C→A no códon 72 do exon 2, o que ocasiona a troca do aminoácido prolina por histidina (P72H).

No paciente n°9 (figura 13), foi identificada uma mutação intrônica; uma transição C→T na posição -6 bp do intron 3 (IVS3 +1 C>T), e dois polimorfismos: o N418N e o H433H (Figura 14). Quanto ao rastreamento genético familiar (figura 13), o mesmo foi realizado apenas em seus dois filhos. O estudo genético para esta mutação foi negativo no indivíduo II-2, mas positivo na paciente II-1, cuja pesquisa clínica da neoplasia, por meio dos bioquímicos e eletrólitos citados no item 3.6, estava normal.

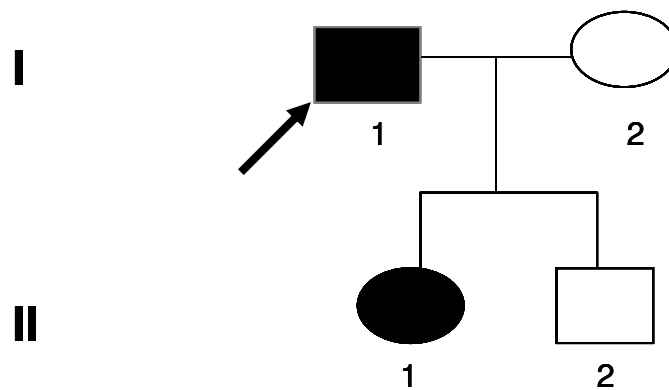


Figura 13. Herodograma do paciente 9. A seta indica o paciente o caso índice, os quadros com preenchimento negro são os pacientes com a mutação intrônica identificada (IVS3 +1 C>T).

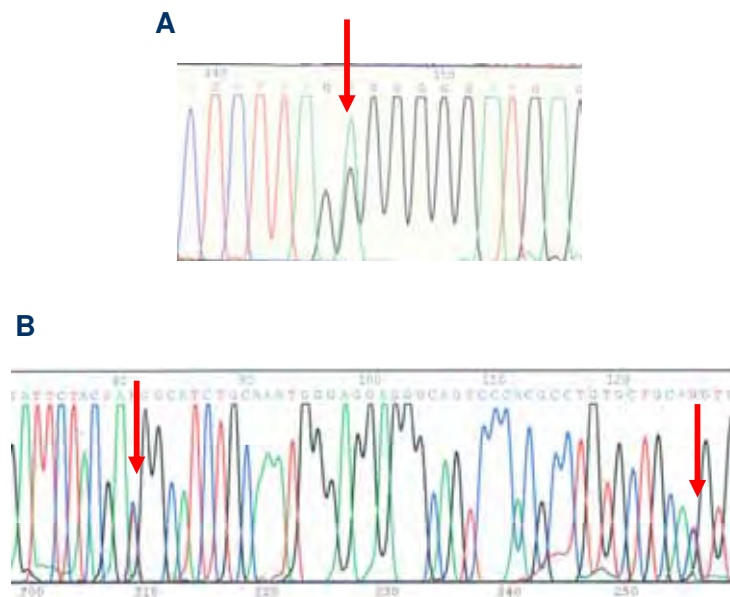


Figura 14. Sequenciamento do gene *MEN1* do paciente 9. **A:** A seta indica a transição C→T na posição -6 bp do intron 3 (IVS3 +1 C>T); sequência antisense. **B:** a primeira seta assinala a troca do nucleotídeo C pelo T em heterozigose, e a segunda indica a troca do nucleotídeo T pelo C em heterozigose.

4.3.2. Familiares dos pacientes sem mutação no *MEN1*.

Não foram encontradas mutações nos pacientes 4, 5, 6 e 8 (tabela 6). No paciente nº4 e nº8, foi encontrado o polimorfismo H433H (figura 15) Na família do primeiro (figura 16), o rastreamento clínico só pode ser realizado nas pessoas III-3 e III-4. Ambas apresentaram GH basal maior que 0,4 ng/mL; uma o GH pos GTT foi < 1ng/mL, e a outra, este exame está em andamento. Nesta mesma paciente, foi realizada uma RNM de hipófise que evidenciou uma lesão sugestiva de um microadenoma. Os demais exames bioquímicos e hormonais estavam normais. A paciente III-1 acompanhava em outro serviço devido prolactinoma, mas não foi possível avaliar se havia sido realizado rastreamento clínico para MEN1. Já na família da paciente 8 (figura 17), os indivíduos II-1 e II-2 foram submetidos ao rastreamento clínico, e em ambos os exames tanto bioquímicos como hormonais estavam normais.

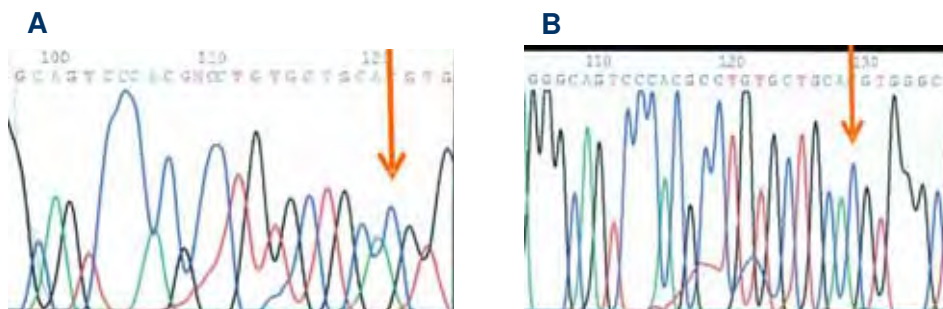


Figura 15. Resultado do sequenciamento do exon 9 do gene *MEN1* dos pacientes 4 e 8, **A** e **B** respectivamente: a seta assinala a troca do nucleotídeo T pelo C em homozigose no códon 433.

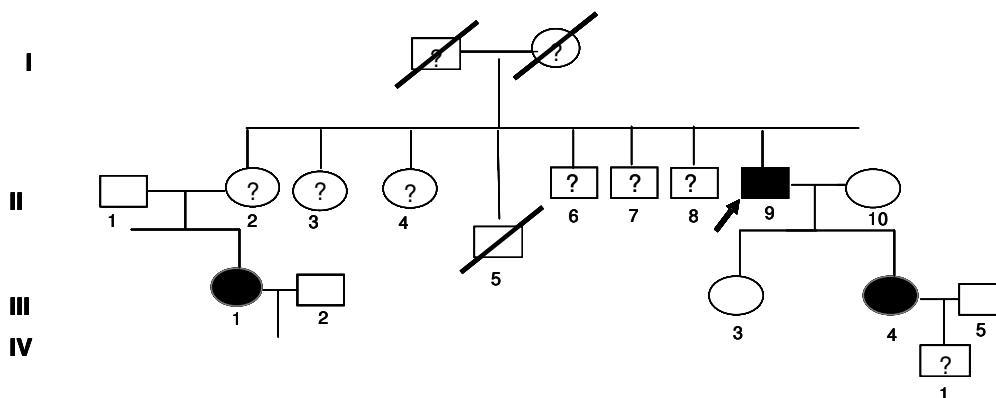


Figura 16. Heredograma do paciente 4. A seta aponta o caso índice, os campos preenchidos em negrito correspondem aos pacientes com os tumores relacionados à *MEN1*. Os campos preenchidos por ponto de interrogação são os pacientes em que o rastreamento clínico não pode ser realizado.

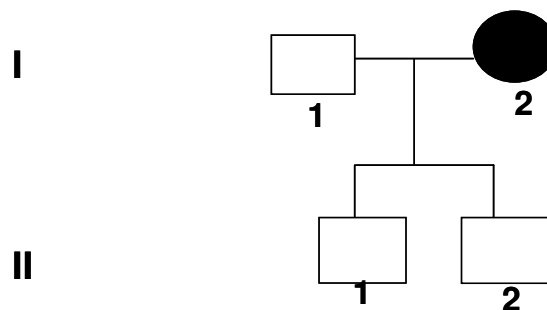


Figura 17. Heredograma da paciente 8. O campo preenchido em negro representa a paciente índice.

Na paciente n°5 foi encontrado um polimorfismo; uma transição G→A no códon 541 (A541T) (figura 18). O rastreamento clínico familiar (figura 19) foi realizado apenas nos pacientes II-1 e II-3; a II-2 era recém-nascida. Em um deles, o GH basal estava aumentado, mas a dosagem do mesmo após GTT estava normal (nadir <1), os demais exames bioquímicos e hormonais estavam normais.

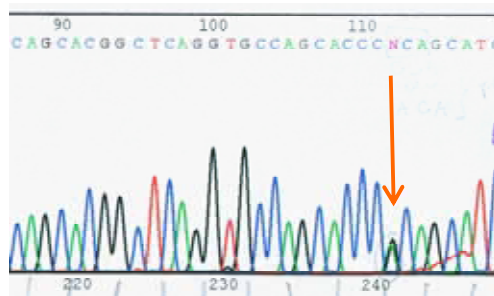


Figura 18: Resultado do sequenciamento da fita sense do exon 10 do gene *MEN1* do paciente 5. A seta assinala a troca do nucleotídeo G pelo A em heterozigose o que ocasiona a substituição do aminoácido alanina por treonina.

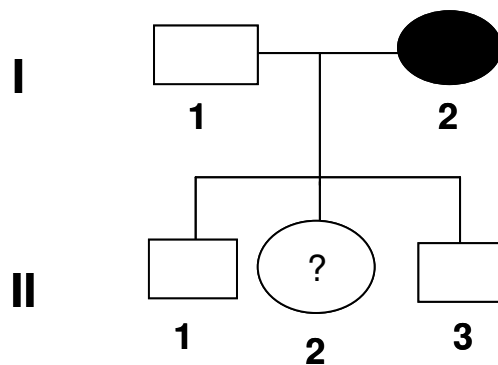


Figura 19. Heredograma da paciente 5. O campo preenchido em negro indica a paciente índice, o preenchido pelo ponto de interrogação aponta a paciente em que o estudo clínico ainda não foi realizado.

Na paciente nº6 e nº7, foram encontrados os polimorfismos N418N e H433H (figuras 20 e 21). A família da paciente 6 (figura 22) teve o rastreamento clínico realizado nos indivíduos II-2, II-3, II-4, II-5, II-6, II-7 e II-8. As pacientes II-7 e II-8 apresentaram GH aumentado, cujos resultados do GH após GTT na última está normal e na primeira está em andamento. Nos demais, não foram encontradas

alterações. A paciente 7 não tinha filhos, e durante o seguimento passou a acompanhar em outro serviço de endocrinologia.

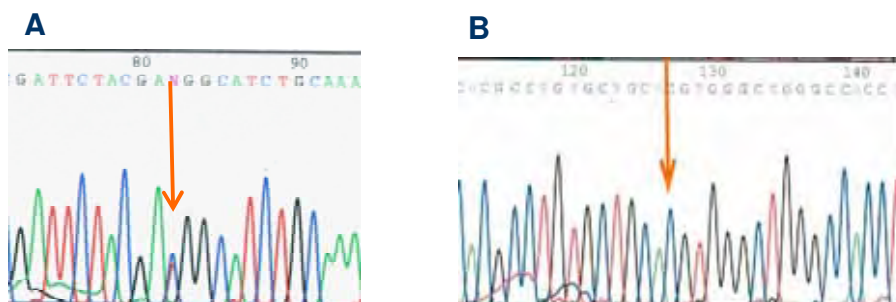


Figura 20: Resultado do sequenciamento da fita sense do exon 9 do gene *MEN1* da paciente nº6. **A:** a seta assinala a troca do nucleotídeo C pelo T em heterozigose. **B:** a seta assinala a troca do nucleotídeo T pelo C em homozigose.

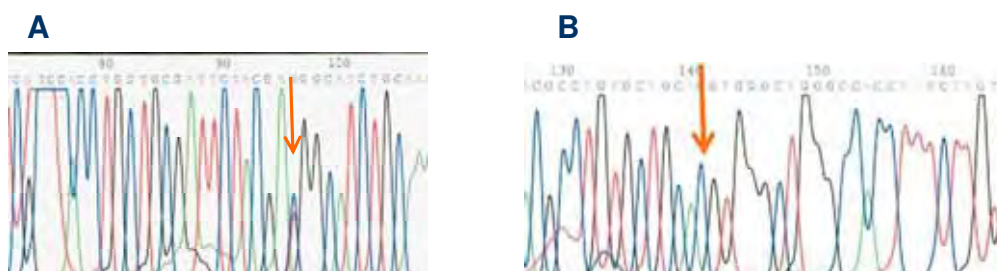


Figura 21. Resultado do sequenciamento da fita sense do exon 9 do gene *MEN1* da paciente 7. **A:** seta assinala a troca do nucleotídeo C pelo T em heterozigose. **B:** a seta assinala a troca do nucleotídeo T pelo C em homozigose.

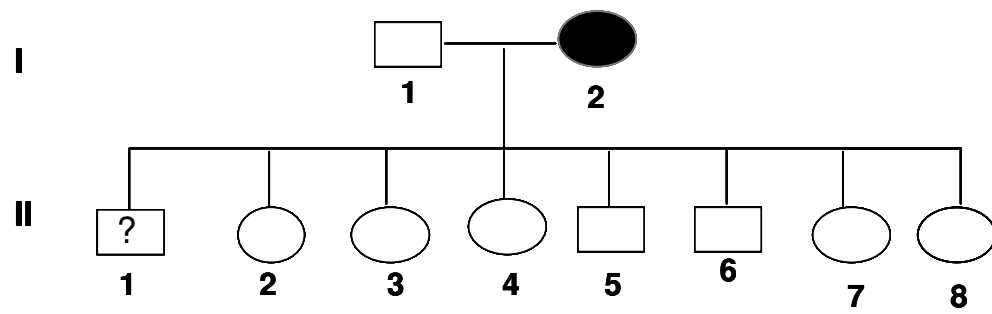


Figura 22. Heredograma da paciente 6. O campo preenchido em negro aponta a paciente índice, e os campos com ponto de interrogação correspondem aos pacientes que não aceitaram participar do estudo.

Tabela 8. Resultados dos exames bioquímicos e hormonais dos filhos dos pacientes índices, cujo estudo genético não evidenciou mutação.

Paciente	Filhos Sexo/idade (anos)	Cálcio sérico MG/dL	Cálcio Urina mg/24h	PTH pg/mL	PRL ng/mL	GH ng/mL	Insulina μ U/mL	Glicemia mg/dL	GH pos GTT(nadir)	Imagem (RNM- hipofise)
Nº4	F/26	9,7	156,42	41,3	5,24	5,49	<0,2	110	0,12	
	F/34	9,5	66	45,53	18,6	11,5	2,34	73	*	Mic
Nº5	M/16	9,8	35,1	50,8	15,8	0,62	7,59	84	<1	
	M/21	10,2	125,1	23,7	23,7	0,05	8,35	84		
Nº6	M/40	9,6	194,36	27,1	4,45	0,09	2,5	78		
	M/37	9,7	214,4	31,8	6,76	0,25	<2	79		
Nº8	F/33	9,2	*	36,2	8,75	3,37	4,7	80	0,08	
	F/30	9,6	287	21,1	5,32	0,4	3,01	77		
Nº8	F/22	9,7	217,6	35,3	6,55	8,15	5,87	77	0,53	
	F/38	9,2	87,5	32,2	13,2	0,3	4,63	88	*	
Nº8	F/27	9,8	96	25,8	8,28	2,76	4,66	76	*	
	M/27	9,7	*	28	7	*	13,9	88		
	M/34	8,9	*	37,2	6,84	0,13	7,92	92		

PRL: Prolactina. PTH: Paratormônio. GH: Hormônio de Crescimento. GTT: Teste de Tolerância a Glicose. Mic: microadenoma.* Resultados em andamento.

5. Discussão

A MEN1 é uma doença rara, a maioria dos casos é herdada por um padrão de herança autossômica dominante, e apenas 8 a 14% dos pacientes não têm a forma familiar da doença (78).

O rastreamento genético em familiares dos casos índices com MEN1 tem sido fortemente recomendado, pois como citado anteriormente, o reconhecimento precoce de uma alteração genética auxiliará na prevenção e tratamento de determinadas morbidades (79). Além disso, um programa de rastreamento pode ser suspenso em não portadores de mutações e intensificado em pessoas que têm uma mutação identificada (78).

Contudo, o estudo genético e ou a investigação da MEN1 em pacientes com apenas um dos tumores associados a esta neoplasia não tem sido muito explorado na literatura. Com exceção da síndrome de Zollinger Ellison, em que aproximadamente 25% dos pacientes têm MEN1, e dos pacientes com HPP menores de 30 anos e portadores de adenomas múltiplos de paratireóide (situações em que a pesquisa de mutação no MEN1 tem sido recomendada), pouco se tem abordado sobre quando investigar MEN1 em pacientes com quadro isolado de HPP, AH ou um outro tumor enteropancreático.

No que se refere aos pacientes com diagnóstico inicial de AH, alguns estudos passados indicaram uma incidência da MEN1 menor que 5% (80-82). Em 1990, Andersen e col. pesquisaram por

história familiar e alterações hormonais consistentes com MEN1 em 79 pacientes com vários tipos de AHs, e nenhum dos pacientes tinha a síndrome (83). Em 1997, Corbetta e col. investigaram a prevalência de MEN1 em pacientes com AH de diversos tipos; eles encontraram uma prevalência de 4,8% (84), muito similar à incidência previamente registrada.

No presente estudo, dos 90 pacientes que tinham AH e foram inclusos no estudo, 10 preenchiam critérios clínicos para MEN1, totalizando uma frequência de 11%, maior que a citada na literatura, que é de 4,8% (9,10). Mesmo se fossem excluídos dois de três pacientes que pertencem à mesma família, teríamos uma frequência alta, de 9%.

Como o HPP está presente em pelo menos 90% dos pacientes com MEN1 (85-87), só foram inclusos os casos que tiveram esta avaliação laboratorial. A investigação para tumor enteropancreático só foi realizada nos pacientes sintomáticos. Ou seja, pode ser ainda que alguns desses pacientes não inclusos como portadores da neoplasia tivessem um perfil do cálcio normal, mas tivessem algum tumor enteropancreático assintomático, o que daria uma associação ainda maior da MEN1 com AH. Além disso, cinco pacientes foram excluídos do estudo porque apresentavam um perfil do cálcio alterado e a investigação para HPP não havia sido concluída.

Em trabalhos anteriores, os adenomas secretores de GH e PRL foram responsáveis pela maioria dos AHs relacionados a MEN1 (88-90), enquanto os outros adenomas foram considerados incomuns (17-19). Nesta casuística, a frequência da MEN1 em pacientes com AH secretores de PRL foi de 3%, muito similar à descrita na literatura (84,88). Por outro lado, nos AH secretores de GH e nos CNFs a frequência foi de 29% e 15%, respectivamente, muito maior que a descrita anteriormente que foi de 2,8 e 1,5% respectivamente (83-84). Além disso, na análise de regressão logística, apesar de não significativo, houve um acréscimo de chance de 1,29 vezes na probabilidade de MEN1 para a sequência de secreção tumoral PRL, GH, ACTH e CNF, sugerindo que a presença do último seja um fator preditivo mais relevante que os secretores de GH e PRL para a presença de MEN1. Por outro lado, como os adenomas CNFs podem ser, em sua maioria assintomáticos, talvez não tenham sido diagnosticados em muitos pacientes citados em trabalhos passados, o que justificaria a sua baixa prevalência anteriormente descrita.

Quanto aos tumores enteropancreáticos, eles têm uma prevalência de 30 a 40% na MEN1 (4), sendo mais frequente o gastrinoma e depois o insulinooma (20). Na casuística do estudo, a frequência foi de 40%, sendo o insulinooma o tumor enteropancreático mais frequente.

Verificou-se também que a proporção de MIC e MAC na MEN1 foi de 50%, mas dentre os 90 pacientes iniciais a proporção de MAC era maior (67%). Geralmente os MICs são responsáveis pela maioria dos AHs relacionados à MEN1 (4), mas há casuísticas em que a proporção de MAC é maior, como a de Corbetta e col (10), em que a relação MIC/MAC foi de 1/3. Provavelmente, nestas últimas casuísticas só foi pesquisado AH apenas para os pacientes sintomáticos, enquanto nas demais, os pacientes já tinham o diagnóstico de MEN1 e por isso rastreava-se mais tumor de hipófise, independente dos sintomas.

Alguns estudos que analisaram o comportamento dos AHs de pacientes com MEN1 evidenciaram que eles são maiores, mais agressivos e menos responsivos ao tratamento que os AHs não associados a esta neoplasia (91-92). Neste estudo, não houve progressão de MIC para MAC em qualquer dos pacientes acometidos. Entretanto, nos pacientes com MAC, os tumores mediam em média nos seus maiores eixos 3 a 4 cm. Os acromegálicos mesmo em vigência de cirurgia e tratamento medicamentoso (sandostatin-LAR e cabergolina), 50% deles ainda não obtiveram critérios de cura da doença. A paciente 6, a única com o MAC-CNF, teve recidiva do tumor após a cirurgia.

Na análise de regressão logística múltipla, o resultado foi significativo para a variável MIC/MAC, indicando uma razão de chance 4,5 vezes menor em pacientes com MAC em relação ao MIC,

para a predição da MEN1, sugerindo que a tumorigênese dos AHs relacionados a MEN1 induza mais a MIC do que a MAC. Porém, outros estudos serão necessários para analisar esta hipótese. Mesmo porque, até este momento não há descrito na literatura fatores preditivos relacionados à MEN1, nem que pacientes com MIC ou MAC tenham uma chance maior de apresentar esta neoplasia múltipla.

Dentre os nove pacientes iniciais que foram submetidos ao estudo genético foram encontradas mutações germinativas em apenas 43% deles. Na primeira família, foi descrita uma mutação intrônica (IVS4 + 1 G>A), sendo a mesma já descrita anteriormente numa família, cujo caso índice teve um AH-CNF e um insulinoma (93). A maioria dos transcritos primários de mRNA apresenta dois tipos de sequências: os exons, porção codificadora do transcrito primário que estão presentes no RNA maduro; e os introns, sequências que não estão presentes no RNA maduro e, portanto, não codificam nenhum aminoácido da proteína a ser sintetizada. No entanto, durante o processamento do mRNA, o mesmo só se torna funcional após sofrer várias alterações bioquímicas, dentre elas há um processo altamente complexo e estruturado conhecido como *splicing* (94). Este processo envolve a retirada dos introns da molécula do mRNA e a união dos exons. Para que o *splicing* ocorra corretamente existem sequências consensos sempre presentes na transição exon-intron. Essas

sequências têm a finalidade de sinalizar o local onde deverá ser efetuado o *splicing* (chamado de sítio de *splice*) ou auxiliar na sua localização, e têm características importantes: os primeiros e os últimos dois nucleotídeos da extremidade 5' e 3' dos introns são GT (GU) e AG, respectivamente; e há uma adenina aproximadamente 18-20 nucleotídeos *upstream* da extremidade 3' do intron (conhecido como sítio de ramificação). Além dessas sequências consenso, há uma frequência maior de algumas bases que estão próximas do sítio de *splicing*, tanto no exon como no intron, e há, também, uma tendência da região próxima à extremidade 3' do intron ser rica em pirimidinas (U e C). O mecanismo do *splicing* segue então a seguinte ordem: clivagem na junção de cadeia 5'; ataque nucleolítico à adenosina do sítio de ramificação pelo nucleotídeo G da extremidade 5', a fim de formar uma estrutura em forma de laço; clivagem na junção de cadeia 3', ocasionando com isto a liberação do íntron sob a forma de um laço; ligação dos éxons do RNA (figura 23). Portanto, mutações nessas sequências consensos podem produzir uma forma aberrante de *splicing*, podendo resultar na exclusão de exons do RNA maduro, ou na retenção de sequências inteiras de introns (95). Como ocorreu nesta mutação citada, em que os autores que já a descreveram identificaram por meio da análise do c-DNA de paciente com a mutação uma banda aberrante com 129 pares de base (bp) a menos que a banda de 321 bp que é igual em todas as espécies (figura 24). Por isso, durante o

sequenciamento de um determinado gene é fundamental que os sítios de *splice* do mesmo sejam estudados.

O achado da transversão em heterozigose C→A no códon 72 do exon 2 (que ocasiona a troca do aminoácido prolina por histidina) em um dos tios paternos do caso índice da primeira família foi um achado “por acaso”. Este e os demais tios do caso índice tiveram rastreamento negativo para mutação intrônica (IVS4 + 1 G>A), mas positivo para esta transversão. Pela possibilidade de ser uma outra mutação, estes tios também foram rastreados para MEN1 por meio de RNM de hipófise e dos demais exames citados no item 3.6. Com exceção de uma das tias de 35 anos que teve um resultado de cálcio e PTH discretamente elevados, mas que depois normalizaram, os exames nos demais tios estavam todos normais. Posteriormente, foi realizada a pesquisa desta alteração genética em 100 alelos de um grupo de voluntários sadios, cujo resultado também foi negativo. Apesar disto, como os indivíduos com esta alteração não apresentaram critérios clínicos para MEN1, acreditamos tratar-se de um polimorfismo. Mesmo porque, o termo polimorfismo, dentro de uma definição menos rigorosa, além de incluir qualquer variante de sequência presente em uma frequência >1% na população, inclui também qualquer variante de sequência não patogênica, independente da frequência (96). Não há

relatos desta alteração genética na literatura, sendo assim, um estudo funcional futuro será necessário para confirmar esta hipótese.

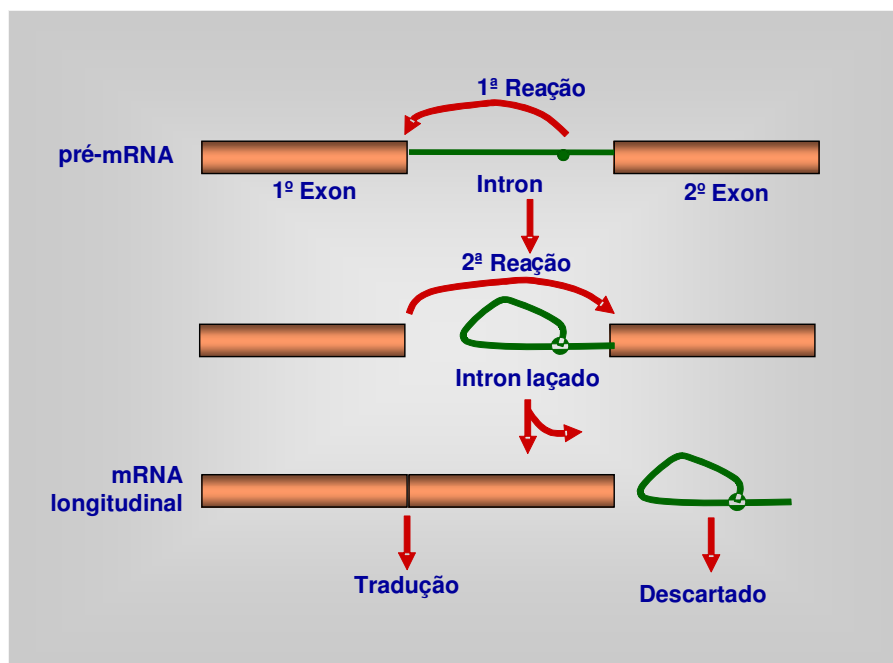


Figura 23. Esquema do mecanismo do *splicing* que segue a seguinte ordem: clivagem na junção de cadeia 5'; ataque nucleofílico à adenosina do sítio de ramificação pelo nucleotídeo G da extremidade 5', a fim de formar uma estrutura em forma de laço; clivagem na junção de cadeia 3', com a liberação do RNA do íntron sob a forma de um laço e o encadeamento dos éxons de RNA. Adaptado de primatology.net, 2007.

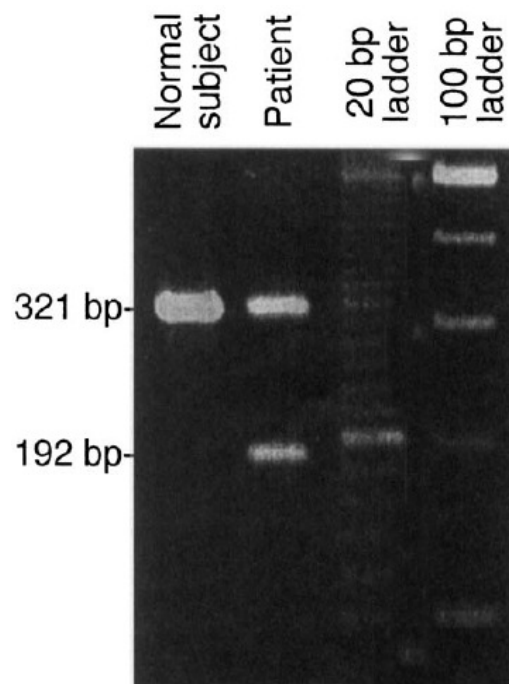


Figura 24. c-DNA do gene *MEN1* de uma paciente com uma mutação IVS4 + 1 G>A obtido pelo RT-PCR com primers do exon 3 a 6 do gene. A figura da corrida eletroforética mostra uma banda aberrante com 192 pares de base (bp) e a banda normal de 321bp. Figura extraída do artigo de Hai N, 2000.

Quanto à mutação intrônica (IVS3 +1 C>T) evidenciada no paciente 9, a mesma também já foi descrita por Roijers e col. (97). Os autores avaliaram o efeito desta mutação intrônica no RNA, e evidenciaram no RNAm mutante uma deleção do exon 3, causando um *frameshift* no códon 149 e um *stop codon* prematuro.

Em cinco casos índices, o estudo genético foi negativo para mutação no *MEN1*, e com exceção do indivíduo 4 que se trata de

uma doença familiar, os demais casos parecem ser esporádicos. A diferença na taxa de detecção entre os casos familiares e esporádicos de MEN1 já foi analisada em estudos anteriores; nos primeiros esta taxa foi de 80 a 90%, em contraste com os últimos em que a taxa foi de 30 a 52% (98-99). Sendo assim, os nossos achados de não detecção de mutações no *MEN1* na maioria dos casos esporádicos são consistentes com os dados da literatura (100) que mostra uma baixa taxa de mutação.

Nestes pacientes em que há critérios clínicos para MEN1, mas o rastreamento genético é negativo, vários fatores podem estar envolvidos, como por exemplo, a presença de fenocópia. Por definição, a fenocópia dá-se quando um indivíduo tem um fenótipo idêntico ao de outro cujo fenótipo foi determinado pelo genótipo (101). Ou seja, a fenocópia mimetiza o fenótipo produzido por um gene. A frequência da fenocópia da MEN1 em pacientes com diagnóstico desta neoplasia apenas por exames laboratoriais ainda é incerto; um estudo evidenciou uma frequência de 10% (102). Quando se avaliam as características clínicas dos casos esporádicos de MEN1 e sem a mutação, observa-se na maioria das casuísticas que a presença do tumor enteropancreático foi significativamente menor neste grupo de pacientes quando comparado aos casos com a mutação (93). A alta frequência de tumores hipofisários secretores de GH também é uma

das características reportadas nestes casos esporádicos de MEN1 sem mutação. Junto a isto, O HPP é uma doença frequente na quarta a sexta década de vida. Po isso, alguns autores têm sugerido (93) que um individuo com mais de 50 anos, com apenas acromegalia e HPP, sem outro tumor neuroendocrino e com história familiar negativa, é mais provável que ele seja uma fenocópia da MEN1, causada por um dos mecanismos a seguir: um duplo evento somático, mas independente; uma outra neoplasia familiar de baixa penetrância; ou ainda uma mutação somática no *MEN1*, *GNAS*, ou um outro gene. Eles ainda concluem que a chance de um familiar de estes pacientes apresentarem MEN1 é baixa, principalmente se a pesquisa de mutação no *MEN1* for negativa. Mas estudos prospectivos de seguimento destes pacientes são necessários para confirmar esta hipótese. Por estes critérios, os individuos do nosso trabalho têm pouca probabilidade de serem fenocópias, contudo é um diagnóstico diferencial a ser pensado.

Uma outra possibilidade para estes pacientes com ausência de mutação no *MEN1*, é que alterações em outros genes estejam gerando este fenótipo. Recentemente Pellegata e col. (103) reportaram mutações germinativas no gene *CDK1NB* (p27) predispondo ao desenvolvimento de tumores endócrinos múltiplos em ratos e em humanos. Dois pacientes com diagnóstico clínico de MEN1 e com mutação não detectável no gene *MEN1* apresentaram mutação neste

gene (104-105). Mutações germinativas no gene *AIP* (*aryl hydrocarbon receptor-interacting protein*) têm sido descritas como responsáveis pela ocorrência de uma condição clínica denominada FIPA (*familial isolated pituitary adenomas*), e ocasionalmente também em pacientes com tumores hipofisários presumivelmente esporádicos (106-113). No entanto, Igreja e col. (114) avaliaram a presença de alterações germinativas nos genes *AIP* e *CDK1NB* em 18 casos esporádicos e três familiares de MEN1 (todos com estudo genético negativo para mutações no *MEN1*), e não foram encontradas mutações em nenhum destes genes. Os autores concluíram então que mutações germinativas nestes genes são incomuns como causa da MEN1.

Outra possibilidade, em particular no paciente 4, cujos dados clínicos além de preencher critérios para MEN1, preenchem também para o Complexo de Carney, seria a presença de mutação no gene *PRKAR1A* (*protein kinase A regulatory subunit type 1A*). Infelizmente o estudo deste gene neste paciente ainda não pode ser concluído.

Por outro lado, o nosso achado de não mutação do *MEN1* em 56% dos pacientes que tiveram o rastreamento genético realizado pode estar associado com a presença de mutações intrônicas não detectadas pelos primers utilizados, alterações na região promotora

ou em regiões não traduzidas do gene, que não foram testadas pelo presente estudo.

Mas uma outra observação importante, é que nestes cinco pacientes em que o rastreamento genético foi negativo para mutações, observou-se em todos eles a presença de polimorfismos. Em 80% deles foi evidenciado o polimorfismo H433H, em 40% o N418N, e em apenas uma das pacientes foi encontrada o polimorfismo A541T. Todas estas variações polimórficas já foram descritas previamente (5, 16).

Os polimorfismos representam variações na sequência de nucleotídeos de um gene, que estão presentes na população geral e que não conferem efeitos deletérios aos indivíduos que os apresentem (115). Entretanto, alguns estudos epidemiológicos moleculares e o próprio Projeto Genoma Humano têm mostrado que algumas variações polimórficas com ou sem substituição de aminoácidos não são totalmente inócuas (116). Dentre vários exemplos da associação de polimorfismos com neoplasias, tem-se o estudo genético molecular no gene *RET* em que trabalhos de Gimm e cols. (117) e de Ruiz e cols. (118) demonstraram uma super-representação da variante polimórfica S836S (exon 14) neste gene em associação com o carcinoma medular da tireoide esporádico.

Deve-se também atentar para algumas trocas de nucleotídeos que, por não ocasionar a troca de aminoácido, são interpretados apenas como mutações silenciosas. Em algumas situações, estas alterações podem ser patogênicas, como no gene da calpaína 3, responsável pela distrofia muscular dos membros, em que a substituição de um códon de glicina (GGC) por outro códon de glicina (GGT) resultou na ativação de um sítio de *splice* que não existia, e como consequência ocasionou a deleção de um de seus exons codificadores (119).

O mecanismo exato que explique como os polimorfismos desempenham seus efeitos sobre o desenvolvimento ou evolução de determinadas doenças, ainda não está totalmente esclarecido. Contudo, dentre os mecanismos propostos, os polimorfismos podem influenciar a estabilidade do RNAm; a troca de base na molécula do DNA pode gerar um “splincing” alternativo, como exemplificado anteriormente; o nucleotídeo modificado pode estar em desequilíbrio de ligação com uma variante funcional ainda não conhecida (116).

Até este momento, não há dados na literatura que indiquem polimorfismos como responsáveis pelo fenótipo da MEN1, e também não há descritas nesta neoplasia mutações silenciosas que foram patogênicas.

A MEN1 é uma doença hereditária cuja sintomatologia pode se iniciar apenas por um dos tumores associados. O seu rastreamento em pacientes com apenas o AH diagnosticado pode beneficiar a maioria dos indivíduos desta casuística, em especial os que tiveram o diagnóstico precoce do HPP. E por tratar-se de uma doença autossômica dominante, os familiares puderam ser examinados mais cedo quanto à presença desta neoplasia, e com isto o tratamento das possíveis morbidades futuras não será tão tardio, em especial aos familiares dos pacientes 1 e 9.

6. Conclusões

O trabalho contribui para mostrar que a frequência da MEN1 em pacientes com AH é alta (11%); pelo menos duas vezes maior que a referida na literatura. Valendo a pena mais uma vez ressaltar que o HPP em mais de 80% dos casos é assintomático, e dos sete casos com HPP aqui descritos todos só tiveram o diagnóstico por meio do rastreamento clínico, e 100% deles já apresentavam critérios para o tratamento cirúrgico. A investigação do HPP é fácil e não onerosa quando comparada às complicações da doença (nefrocalcinose, nefrolitíase, osteoporose, depressão, dentre outros).

Nos resultados da análise de regressão logística múltipla, a única variável significativa foi a relação MIC/MAC, na qual o MAC apresentou uma razão de chance 4,5 vezes menor para a predição de MEN1. Este dado aponta o MIC como uma variável capaz de prever esta neoplasia. Contudo, não podemos afirmar que apenas os pacientes com MIC devam ser rastreados para MEN1. Este é o primeiro trabalho a avaliar isto; portanto, estudos futuros com casuísticas maiores serão necessários para confrontar ou concordar com este resultado.

No estudo genético dos pacientes acometidos, foram encontradas duas mutações intrônicas e três polimorfismos já descritos na literatura, e um provável polimorfismo inédito. O achado destas mutações permitiu o aconselhamento e o rastreamento genético destas

famílias. Os indivíduos com resultado positivo se beneficiaram com o diagnóstico precoce da doença, e os indivíduos com resultado negativo tiveram alta ambulatorial. Isso minimizou os custos da investigação clínica para os tumores relacionados à MEN1, uma vez que apenas os pacientes acometidos realizaram exames laboratoriais e de imagem. Obviamente este rastreamento continuará nas próximas gerações.

Com exceção do paciente 4, nos demais casos índices com estudo genético negativo para mutação, o rastreamento clínico familiar também foi negativo. Isso sugere que este grupo de pessoas tem baixíssima probabilidade de ter MEN1 familiar. Ou seja, num paciente com diagnóstico clínico de MEN1, cuja pesquisa de mutação seja negativa e o interrogatório dos antecedentes familiares não acuse casos semelhantes, é possível tratar-se apenas de um caso esporádico, e estes familiares não precisariam de rastreamento clínico. Contudo, estudos prospectivos de seguimento destes indivíduos serão necessários para confirmar esta hipótese.

Em suma, concluímos que todo paciente com AH deva ter anualmente a dosagem sérica do cálcio e PTH. Uma vez confirmado o HPP, estes indivíduos devem ser submetidos ao aconselhamento e estudo genético. Se a pesquisa de mutação no gene *MEN1* for positiva, os demais familiares também deverão realizar o rastreamento genético.

6. *Referências Bibliográficas**

* Adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

1. Wermer P. Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands. *Am J Med.* 1954;16(3):363-71.
2. Dreijerink KMA, Lips CJM. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Ned Tijdschr Oncol.* 2004;1(5):171-7.
3. Schussheim DH, Skarulis MC, Agarwal SK, Simonds WF, BurnsAL, Spiegel AM, *et al.* Multiple endocrine neoplasia type 1: new clinical and basic findings. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12(4):173-8.
4. Hoff AO, Cote GJ, Gagel RF. Multiple endocrine neoplasias. *Ann Rev Physiol.* 2000;62:377-411.
5. Lemos MC, Thakker RV. Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat.* 2008;29(1):22-32.
6. Marx SJ, Agarwal Sk, Kester MB, Heppner C, Kim YS, Skarulis MC, *et al.* Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical and genetic features of the hereditary endocrine neoplasias. *Recent Prog Horm Res.* 1999;54:397- 438.
7. Asgharian B, Chen Y-J, Patronas NJ, Pegjini PL, Reynolds JC, Vortmeyer A, *et al.* Meningiomas may be a component tumor of multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Cancer Res.* 2004;10(3):869-80.

8. Piecha G, Chudek J, Wiecek A. Multiple Endocrine Neoplasia type 1. *Eur J Intern Med.* 2008;19(2):99-103.
9. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(12):5658-71.
10. Carling T. Multiple endocrine neoplasia syndrome: genetic basis for clinical management. *Curr Opin Oncol.* 2005;17(1):7-12.
11. Hubbard JG, Sebag F, Maweja S, Henry JF. Subtotal parathyroidectomy as an adequate treatment for primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 1. *Arch Surg.* 2006;141(3):235-9.
12. Hoff AO, Hauache OM. Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1: diagnóstico clínico, laboratorial e molecular e tratamento das doenças associadas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49 (5): 735-46.
13. Piecha G, Chudek J, Więcek A. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Eur J Intern Med.* 2008;19(2):99-103.
14. Gagel RF, Marx SJ. Multiple Endocrine Neoplasia. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, editors. *Williams textbook of endocrinology.* Philadelphia: Saunders; 2008.p.1705-46.

15. Marx S, Spiegel AM, Skarulis MC, Doppman JL, Collins FS, Liotta LA. Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical and genetic topics. *Ann Intern Med.* 1998;129(6):484-94.
16. Skogseid B, Rastad J, Oberg K. Multiple endocrine neoplasia type 1. Clinical features and screening. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1994;23(1):1-18.
17. Carty SE, Helm AK, Amico JA, Clarke MR, Foley TP, Watson CG, et al. The variable penetrance and spectrum of manifestations of multiple endocrine neoplasia type 1. *Surgery.* 1998;124(6):1106-13.
18. Trouillas J, Labat-Moleur F, Sturm N, Kujas M, Heymann MF, Figarella-Branger D, et al. Pituitary tumors and hyperplasia in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome (MEN1): a case-control study in a series of 77 patients versus 2509 non-MEN1 patients. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(4):534-43.
19. Vergès B, Boureille F, Goudet P, Murat A, Beckers A, Sassolas G, et al. Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(2):457-65.
20. Bordi C, Corletto VD, Azzoni C, Pizzi S, Ferraro G, Gibril F, et al. The antral mucosa as a new site for endocrine tumors in multiple

-
- endocrine neoplasia type 1 and Zollinger-Ellison syndromes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(5):2236-42.
21. Burgess JR, Harle RA, Tucker P, Parameswaran V, Davies P, Greenaway TM, *et al.* Adrenal lesions in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1. *Arch Surg.* 1996;131(7):699-702.
22. Beckers A, Abs R, Willems PJ, van der Auwera B, Kovacs K, Reznik M, *et al.* Aldosterone-secreting adrenal adenoma as part of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): loss of heterozygosity for polymorphic chromosome 11 deoxyribonucleic acid markers, including the MEN1 locus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75(2):564-70.
23. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000;29(3):541-67.
24. Asgharian B, Turner ML, Gibril F, Entsuaah LK, Serrano J, Jensen RT. Cutaneous tumors in patients with multiple endocrine neoplasm type 1 (MEN1) and gastrinomas: prospective study of frequency and development of criteria with high sensitivity and specificity for MEN1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5328-36.
25. Nunes VS, Chang CV, Mazeto GM, Marques ME, Castro AV, Nogueira CR. Possible association between Carney complex and

-
- multiple endocrine neoplasia type 1 phenotypes. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(8):1356-61.
26. McCallum RW, Parameswaran V, Burgess JR. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1) is associated with an increased prevalence of diabetes mellitus and impaired fasting glucose. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;65(2):163-8.
27. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971; 68(4):820-3.
28. Larsson C, Skogseid B, Oberg K, Nakamura Y, Nordenskjold M. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature.* 1988;332(6159):85-7.
29. Lemmens I, Van de Ven WJ, Kas K, Zhang CX, Giraud S, Wautot V, et al. Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. *Hum Mol Genet.* 1997;6(7):1177-83.
30. Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR, et al. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science.* 1997;276(5311):404-7.
31. Khodaei-O'Brien S, Zablewska B, Fromaget M, Bylund L, Weber G, Gaudray P. Heterogeneity at the 5'-end of MEN1 transcripts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(2):508-14.

32. Chandrasekharappa SC, Teh BT. Functional studies of the MEN1 gene. *J Intern Med.* 2003;253(6):606-15.
33. Huang SC, Zhuang Z, Weil RJ, Pack S, Wang C, Krutzsch HC, et al. Nuclear/cytoplasmic localization of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin. *Lab Invest.* 1999;79(3):301-10.
34. Toledo RA. Identificação de mutações e rastreamento gênico familiar em famílias brasileiras com neoplasia endócrina múltipla tipo 1 [dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.
35. Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(5):367-75.
36. Balogh K, Rácz K, Patócs A, Hunyady L. Menin and its interacting proteins: elucidation of menin function. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(9):357-64.
37. Yaguchi H, Ohkura N, Tsukada T, Yamaguchi K. Menin, the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, exhibits GTP-hydrolyzing activity in the presence of the tumor metastasis suppressor nm23. *J Biol Chem.* 2002;277(41):38197-204.
38. Ratineau C, Bernard C, Poncet G, Blanc M, Josso C, Fontanière S, et al. Reduction of menin expression enhances cell proliferation and

- is tumorigenic in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004;279(23):24477-84.
39. Yang Y, Hua X. In search of tumor suppressing functions of menin. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;265-266:34-41.
40. Schnepf RW, Hou Z, Wang H, Petersen C, Silva A, Masai H, *et al.* Functional interaction between tumor suppressor menin and activator of S-phase kinase. *Cancer Res.* 2004;64(18):6791-6.
41. Guru SC, Goldsmith PK, Burns AL, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS, *et al.* Menin, the product of the MEN1 gene, is a nuclear protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(4):1630-4.
42. Suphapeetiporn K, Grealley JM, Walpita D, Ashley T, Bale AE. MEN1 tumor-suppressor protein localizes to telomeres during meiosis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002;35(1):81-5.
43. Lin SY, Elledge SJ. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell.* 2003;113(7):881-9.
44. Lopez-Egido J, Cunningham J, Berg M, Oberg K, Bongcam-Rudloff E, Gobl A. Menin's interaction with glial fibrillary acidic protein and vimentin suggests a role for the intermediate filament network in regulating menin activity. *Exp Cell Res.* 2002;278(2):175-83.
45. Scappaticci S, Maraschio P, del Ciotto N, Fossati GS, Zonta A, Fraccaro M. Chromosome abnormalities in lymphocytes and

-
- fibroblasts of subjects with multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer Genet Cytogenet.* 1991;52(1):85-92.
46. Namihira H, Sato M, Murao K, Cao WM, Matsubara S, Imachi H, *et al.* The multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin, inhibits the human prolactin promoter activity. *J Mol Endocrinol.* 2002;29(3):297-304.
47. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9(2):240-6.
48. Matsuo SE, Martins L, Leoni SG, Hajjar D, Ricarte-Filho JC, Ebina KN, *et al.* Marcadores biológicos de tumores tireoidianos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004;48(1):114-25.
49. Kimura ET, Matsuo SE, Ricarte-Filho JC. TGF β , Activina e Sinalização SMAD em Câncer de Tiróide. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007;51(5):683-9.
50. Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I, *et al.* Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol.* 2004;24(13):5639-49.
51. Ayton PM, Cleary ML. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene*;2001;20(40):5695-707.

52. Collins EC, Rabbitts TH. The promiscuous MLL gene links chromosomal translocations to cellular differentiation and tumour tropism. *Trends Mol Med.* 2002;8(9):436-42.
53. Huret JL, Dessen P, Bernheim A. An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL partners. *Leukemia.* 2001;15(6):987-9.
54. Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y, *et al.* Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(3):749-54.
55. Yokoyama A, Somerville TC, Smith KS, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Cleary ML. The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell.* 2005;123(2):207-18.
56. La P, Schnepf RW, Petersen C, Silva A, Hua X. Tumor suppressor menin regulates expression of insulin-like growth factor binding protein 2. *Endocrinology.* 2004;145(7):3443-50.
57. Heppner C, Bilimoria KY, Agarwal SK, Kester M, Whitty LJ, Guru SC, *et al.* The tumor suppressor protein menin interacts with NF-kappaB proteins and inhibits NF-kappaB-mediated transactivation. *Oncogene.* 2001;20(36):4917-25.

58. Hughes CM, Rozenblatt-Rosen O, Milne TA, Copeland TD, Levine SS, Lee JC. Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the *hoxc8* locus. *Mol Cell*. 2004;13(4):587-97.
59. Kim H, Lee JE, Cho EJ, Liu JO, Youn HD. Menin, a tumor suppressor, represses JunD-mediated transcriptional activity by association with an mSin3A-histone deacetylase complex. *Cancer Res*. 2003;63(19):6135-9.
60. Heppner C, Bilimoria KY, Agarwal SK, Kester M, Whitty LJ, Guru SC, *et al*. The tumor suppressor protein menin interacts with NF-kappaB proteins and inhibits NF-kappaB-mediated transactivation. *Oncogene*. 2001;20(36):4917-25.
61. Scappaticci S, Maraschio P, del Ciotto N, Fossati GS, Zonta A, Fraccaro M. Chromosome abnormalities in lymphocytes and fibroblasts of subjects with multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer Genet Cytogenet*. 1991;52(1):85-92.
62. Jin S, Mao H, Schnepf RW, Sykes SM, Silva AC, D'Andrea AD, *et al*. Menin associates with FANCD2, a protein involved in repair of DNA damage. *Cancer Res*. 2003;63(14):4204-10.
63. Sukhodolets KE, Hickman AB, Agarwal SK, Sukhodolets MV, Obungu VH, Novotny EA, *et al*. The 32-kilodalton subunit of

- replication protein A interacts with menin, the product of the MEN1 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biol.* 2003;23(2):493-509.
64. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, *et al.* The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell.* 2000;6(6):1389-99.
65. Bhuiyan MM, Sato M, Murao K, Imachi H, Namihira H, Takahara J. Expression of menin in parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(7):2615-9.
66. Farrell WE, Clayton RN. Molecular pathogenesis of pituitary tumors. *Front Neuroendocrinol.* 2000;21(3):174-98.
67. Satta MA, Korbonits M, Jacobs RA, Bolden-Dwinfour DA, Kaltsas GA, Vangeli V, *et al.* Expression of menin gene mRNA in pituitary tumours. *Eur J Endocrinol.* 1999;140(4):358-61.
68. Wautot V, Vercherat C, Lespinasse L, Chambe B, Lenoir GM, Zhang CX, *et al.* Germeline mutation profile of MEN 1 in Multiple Endocrine Neoplasia type 1: search for correlation between phenotype and the functional domains of the MEN 1 protein. *Hum Mutat.* 2002;20(1):35-47.

69. Agarwal SK, Guru SC, Heppner C, Erdos MR, Collins RM, Park SY, *et al.* Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and repress JunD-activated transcription. *Cell*. 1999;96(1):143-52.
70. Ohkura N, Kishi M, Tsukada T, Yamaguchi K. Menin, a gene product responsible for multiple endocrine neoplasia type 1, interacts with the putative tumor metastasis suppressor nm23. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282(5):1206-10.
71. Sukhodolets KE, Hickman AB, Agarwal SK, Sukhodolets MV, Obungu VH, Novotny EA, *et al.* The 32-kilodalton subunit of replication protein A interacts with menin, the product of the MEN1 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biol*. 2003;23(2):493-509.
72. Kim H, Lee JE, Cho EJ, Liu JO, Youn HD. Menin, a tumor suppressor, represses JunD-mediated transcriptional activity by association with an mSin3A-histone deacetylase complex. *Cancer Res*. 2003;63(19):6135-9.
73. Hughes CM, Rozenblatt-Rosen O, Milne TA, Copeland TD, Levine SS, Lee JC, *et al.* Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the *hoxc8* locus. *Mol Cell*. 2004;13(4):587-97.

74. Dreijerink KM, Mulder KW, Winkler GS, Höppener JW, Lips CJ, Timmers HT. Menin links estrogen receptor activation to histone H3K4 trimethylation. *Cancer Res.* 2006;66(9):4929-35.
75. Yaguchi H, Ohkura N, Takahashi M, Nagamura Y, Kitabayashi I, Tsukada T. Menin missense mutants associated with multiple endocrine neoplasia type 1 are rapidly degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol.* 2004;24(15):6569-80.
76. Weitzmann MN, Woodford KJ, Usdin K. DNA secondary structures and the evolution of hypervariable tandem arrays. *J Biol Chem.* 1997;272(14):9517-23.
77. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression.* New York: John Wiley; 1989.
78. Hoff AO, Hauache OM. Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1. In: Saad MIA, Maciel RMB, Mendonça BB, editores. *Endocrinologia.* São Paulo: Atheneu; 2007. p.1087-96.
79. Samaan NA, Ouais S, Ordone NG, Choks UA, Sellin RV, Hickey RC. Multiple endocrine syndrome type 1: clinical, laboratory, and management in five families. *Cancer.* 1989; 64:741-52.
80. Lawrence JH, Tobias CA, Linfoot, JA, Born JL., Lyman JT, Chong CY, *et al.* Successful treatment of acromegaly: metabolic and clinical studies in 145 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1970;31(2):180-98.

81. Nabarro JDN. Review acromegaly. *Clinical Endocrinology*. 1987;26(2):481-512.
82. Scheithauer BW, Laws ER Jr, Horvath E, Randall RV, Carney JA. Pituitary adenomas of the multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome. *Semin Diagn Pathol*. 1987;4(3):205-11.
83. Andersen HO, Jorgensen PE, Bardram L, Hilsted L. Screening for multiple endocrine neoplasia type 1 in patients with recognized pituitary adenoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1990;33(6):771-5.
84. Corbetta S, Pizzocaro A, Peracchi M, Beck-Peccoz P, Faglia G, Spada A. Multiple endocrine neoplasia type 1 in patients with recognized pituitary tumours of different types. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997;47(5):507-12.
85. Pannett AA, Kennedy AM, Turner JJ, Forbes SA, Cavaco BM, Bassett JH. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) germline mutations in familial isolated primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;58(5):639-46.
86. Miedlich S, Lohmann T, Schneyer U, Lamesch P, Paschke R. Familial isolated primary hyperparathyroidism--a multiple endocrine neoplasia type 1 variant? *Eur J Endocrinol*. 2001;145(2):155-60.

87. Benson L, Ljunghall S, Akerström G, Oberg K. Hyperparathyroidism presenting as the first lesion in multiple endocrine neoplasia type 1. *Am J Med.* 1987;82(4):731-7.
88. Oberg K, Skogseid B, Eriksson B. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1). *Acta Oncol.* 1989; 28(3):383-7.
89. Brandi ML, Marx SJ, Aurbach GD, Fitzpatrick D. Familial multiple endocrine neoplasia type 1: a new look at pathophysiology. *Endocr Rev.* 1987;8(4):391-405.
90. McCutcheon IE. Management of individual tumor syndromes – pituitary neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1994;23(1):37-51.
91. Vergès B, Boureille F, Goudet P, Murat A, Beckers A, Sassola G, *et al.* Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(2):453-6.
92. Trouillas J, Labat-Moleur F, Sturm N, Kujas M, Heymann MF, Figarella-Branger D, *et al.* Pituitary tumors and hyperplasia in Multiple Endocrine Neoplasia type 1 syndrome (MEN1): a case-control study in a series of 77 patients versus 2509 non-MEN1 patients. *Am J Surg Pathol.* 2008; 32(4):534-43.

93. Hai N, Aoki N, Shimatsu A, Mori T, Kosugi S. Clinical features of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) phenocopy without germline MEN1 gene mutations: analysis of 20 Japanese sporadic cases with MEN1. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;52(4):509-18.
94. Kozak M. Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome*. 1996;7(8):563-74.
95. Strachan T, Read AP. *Genética molecular humana*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.
96. Richard I, Beckmann JS. How neutral are synonymous codon mutations? *Nat Genet*. 1995;10(3):259.
97. Roijers JF, de Wit MJ, van der Luijt RB, Ploos van Amstel HK, Höppener JW, Lips CJ. Criteria for mutation analysis in MEN 1-suspected patients: MEN 1 case-finding. *Eur J Clin Invest*. 2000;30(6):487-92.
98. Ellard S, Hattersley AT, Brewer CM, Vaidya B. Detection of an *MEN1* gene mutation depends on clinical features and supports current referral criteria for diagnostic molecular genetic testing. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;62(2):169-75.
99. Klein RD, Salih S, Bessoni J, Bale AE. Clinical testing for multiple endocrine neoplasia type 1 in a DNA diagnostic laboratory. *Genet Med*. 2005;7(2):131-0.

100. Balogh K, Hunyady L, Patocs A, Gergics P, Valkusz Z, Toth M, *et al.* MEN1 gene mutations in Hungarian patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;67(5):727-34.
101. Whittemore AS, Halpern J. Problems in the definition, interpretation, and evaluation of genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 2001;68(2):457-65.
102. Burgess JR, Nord B, David R, Greenaway TM, Parameswaran V, Larsson C, *et al.* Phenotype and phenocopy: the relationship between genotype and clinical phenotype in a single large family with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;53(2):205-11.
103. Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Höfler H, *et al.* Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(42):15558-63.
104. Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, van der Luijt RB, Aalfs CM, Sane T, *et al.* Germline CDKN1B/p27Kip1 mutation in multiple endocrine neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):3321-5.
105. Fritz A, Walch A, Piotrowska K, Rosemann M, Schäffer E, Weber K. Recessive transmission of a multiple endocrine neoplasia syndrome in the rat. *Cancer Res*. 2002;62(11):3048-51.

106. Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, *et al.* The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(6):2390-401.
107. Toledo RA, Lourenço DM Jr, Liberman B, Cunha-Neto MB, Cavalcanti MG, Moyses CB, *et al.* Germline mutation in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene in familial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(5):1934-7.
108. Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, *et al.* Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science.* 2006;312(5777):1228-30.
109. Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, Tuppurainen K, Mäkinen MJ, Vierimaa O, *et al.* Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(10):4101-5.
110. Daly AF, Vanbellinhen JF, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, Naves LA, Guitelman, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(5):1891-6.

111. Georgitsi M, De Menis E, Cannavò S, Mäkinen MJ, Tuppurainen K, Pauletto P, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene mutation analysis in children and adolescents with sporadic pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69(4):621-7.
112. Raitila A, Georgitsi M, Karhu, A, Tuppurainen K, Mäkinen MJ, Birkenkamp-Demtröder K, *et al.* No evidence of somatic aryl hydrocarbon receptor interacting protein mutations in sporadic endocrine neoplasia. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(3):901-6.
113. 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. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008;116(10):625-8.
114. Igreja S, Chahal HS, Akker SA, Gueorguiev M, Popovic V, Damjanovic S, *et al.* 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 (Oxf)*. 2009;70(2):259-64.
115. Magalhães PKR, Castro M, Elias LLK, Maciel LMZ. Carcinoma medular de tireóide: da definição às bases moleculares. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003;47(5):515-28.

116. Rocha AP, Magalhães PK, Maia AL, Maciel LM. Genetic polymorphisms: implications in the pathogenesis of medullary thyroid carcinoma. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007;51(5):723-30.
117. Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PL, Hoang-Vu C, Raue F, *et al.* Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. *Oncogene.* 1999;18(6):1369-73.
118. Ruiz A, Antiñolo G, Fernández RM, Eng C, Marcos I, Borrego S. Germline sequence variant S836S in the RET proto-oncogene is associated with low level predisposition to sporadic medullary thyroid carcinoma in the Spanish population. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001;55(3):399-402.
119. Richard I, Beckmann JS. How neutral are synonymous codon mutations? *Nat Genet.* 1995;10(3):259.

7. Anexos



Anexo 1:

Possible Association between Carney Complex and Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Phenotypes

clinical case report

VANIA S. NUNES
 CLÁUDIA V. CHANG
 GLÁUCIA M. F. S. MAZEO
 MARIÂNGELA E. A. MARQUES
 ANA VALÉRIA B. CASTRO
 CÉLIA R. NOGUEIRA

Department of Clinical Medicine,
 Discipline of Endocrinology (VSN,
 CVC, GMFSM, AVBC, CRN);
 Department of Pathology
 (MEAM); Faculdade de
 Medicina de Botucatu,
 Universidade Estadual Paulista
 (Unesp), Botucatu, SP, Brazil.

ABSTRACT

Carney Complex (CNC) and Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1) are forms of multiple endocrine neoplasia of dominant autosomal inheritance. Diagnosis of CNC occurs when two major criteria (lentiginoses, primary pigmented nodular adrenocortical disease, cardiac and cutaneous myxomas, acromegaly, testicular neoplasias, thyroid cancer) are observed and/or a major criterion associated with a supplementary criterion (affected relative, *PRKAR1A* gene mutation) occurs. On the other hand, diagnosis for MEN1 occurs through detection of two or more tumors located at the pituitary gland, parathyroid and/or pancreatic cells. The present case describes a 55 year-old male patient, diagnosed with acromegaly, primary hyperparathyroidism and papillary thyroid cancer, exhibiting components that meet the diagnostic criteria of both conditions described. Despite the occurrence of only one sporadic association or the acromegaly *per se* being responsible for the papillary cancer, new molecular mechanisms may not be ruled out. (Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52/8:1356-1361)

Keywords: Carney complex; Multiple endocrine neoplasia type 1; Acromegaly; primary hyperparathyroidism; Papillary thyroid cancer

RESUMO

Possível Associação entre os Fenótipos do Complexo de Carney e Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1.

Complexo de Carney (CNC) e neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (MEN1) são formas de neoplasias endócrinas múltiplas de herança autossômica dominante. O diagnóstico do CNC ocorre quando dois critérios maiores (lentiginose, doença nodular pigmentosa primária das adrenais, mixomas cardíacos e cutâneos, acromegalia, neoplasia testicular, carcinoma de tireóide) são observados e/ou um critério maior associado a um critério suplementar (familiar afetado, mutação do gene *PRKAR1A*) ocorre. Por outro lado, o diagnóstico da MEN1 dá-se pela detecção de dois ou mais tumores localizados na glândula hipofisária, paratireóide e/ou células pancreáticas. O presente caso descreve um homem de 55 anos, com diagnóstico de acromegalia, hiperparatireoidismo primário e carcinoma papilífero de tireóide, exibindo critérios diagnósticos para as duas condições descritas. Embora possa ter ocorrido apenas uma associação esporádica, ou a acromegalia *per se* tenha predisposto ao carcinoma papilífero, novos mecanismos moleculares podem estar envolvidos. (Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52/8:1356-1361)

Descritores: Complexo de Carney; Neoplasia endócrina múltipla tipo 1; Acromegalia; Hiperparatireoidismo primário; Carcinoma papilífero de tireóide.

INTRODUCTION

CNC is an autosomal dominant multiple endocrine neoplasia syndrome (OMIM 160980) (1, 2). It is associated with skin and mucosal pigmen-

tation, cardiac and mucocutaneous myxomas, breast myxoma, primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD), prolactin and growth-hormone-producing adenoma, thyroid adenoma or carcinoma, psammomatous melanotic schwannoma, blue nevus, breast ductal adenoma, and osteochondromyxoma. Mutations of the protein kinase A regulatory subunit type 1A (*PRKAR1A*) gene have been implicated in the etiology of CNC. This gene encodes the type 1 α regulatory subunit of protein kinase A (PKA), which is an important effector molecule in many endocrine signaling pathways (1).

MEN1 (OMIM 131100) is characterized by the occurrence of tumors in the parathyroid gland, in pancreatic islet cells and in the anterior pituitary (3). Besides the aforementioned major components, adrenocortical and carcinoid tumors, subcutaneous lipomas, facial angiofibromas and collagenomas have been associated with the disease (3, 4). MEN1 is a rare disease, with an estimated prevalence of 0.01 to 2.5 for 1000, representing 2-4% of all primary hyperparathyroidism cases (5). Most cases of MEN1 are inherited in an autosomal dominant pattern, but 8 to 14% of the affected patients might not have the familial form of the disease. Pituitary adenoma is an initial sign in 25% of the sporadic cases and in less than 10% in the inherited form of the disease. Inactivating mutations of the *MEN1* gene are associated with the development of endocrine tumors (6). To the best of our knowledge, the association between CNC and MEN1 has not yet been described in the literature. The present study aimed to describe a clinical case with the two phenotypes being associated.

SUBJECTS AND METHODS

Clinical case

A 55-year-old male patient with acromegaly diagnosed 6 years earlier was admitted to the hospital in 2005 for a follow-up. He was submitted to tumor resection through transphenoidal surgery in 1998 and his case evolved to hypopituitarism (adrenal insufficiency, hypothyroidism and hypogonadism). He was using levothyroxine, corticosteroid and an anti-hypertensive drug. During the physical exams, patient presented clinical signs of acromegaly, multinodular goiter as well as skin papillomas and a thigh tumor suggestive of lipoma. Lentiginoses or any other signs of gastrointestinal tumor were not observed. In relation to family history, one of his nieces had a prolactinoma, but other endocrine neoplasias were not investigated.

The exams showed lack of suppression of the growth hormone (GH) after oral GTT (nadir 9.92ng/mL; increase in serum IGF-1 levels (622 ng/mL; reference range (rr): 78-258); hypercalcemia (total calcium 11.9mg/dL; rr: 8-10), hypercalciuria and elevated PTH intact (76.4 pg/mL; rr: 13-65), renal function, free T4 and prolactin at normal levels. Magnetic nuclear resonance (MR) showed macroadenoma (2cm) with supra- and parasellar extension (Figure 1). The skull x-ray showed a characteristic "salt-and-pepper pattern". Ultrasonography of the cervical region (USG) revealed three thyroid nodules (0.6-0.8 cm), one of them having microcalcifications. Fine needle aspiration puncture suggested thyroid carcinoma. As serum calcium PTH intact levels continued to be higher, the patient was submitted to a total thyroidectomy and to a total parathyroidectomy with parathyroid auto-implantation at the same time. The anatomopathological study confirmed the papillary carcinoma (Figure 2) (encapsulated, not multicentric, measuring 1x0.7cm, with pathological staging T1NxMx) and the analysis of three parathyroid glands did not show alterations; the autoimplanted gland was not studied. Subsequently, the patient underwent a new surgery for resection of pituitary tumor and he received an ablative dose of iodine-131 after administration of recombinant TSH, for complementation of the thyroid papillary carcinoma treatment. Testicular ultrasonography was normal and the echocardiogram did not show myxomas. Abdominal computed tomography revealed giant hepatic hemangioma, confirmed through scintillography with marked red blood cells. The patient had adrenal insufficiency confirmed by insulin tolerance test, so that the hypertension has been attributed to acromegaly. Thigh ultrasonography also suggested the lipoma. At present, patient shows normal calcium profile, in using octreotide and hormonal replacement for acromegaly and hypopituitarism control.

After obtaining the informed consent of the patient and the agreement of the Hospital Ethics Committee, mutational analysis of *MEN1* gene was performed. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocyte (7), and twelve pairs of primers were used for polymerase chain reaction (PCR) amplifications of the nine coding exons of the *MEN1* gene and their corresponding 16 intron/exon boundaries. The PCR products were analyzed using a Genetic Analyzer 3100 Sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). However, no mutation of *MEN1* was detected in this patient.

MEN Type 1 and Carney Complex
Nunes et al.



Figure 1. Coronal T1-weighted image demonstrates a large sellar mass with suprasellar extension.



Figure 2. Papillary thyroid carcinoma with intranuclear inclusions. H&E, x100.

In the examined family members of the patient (only his two daughters), both hypercalcemia and acromegaly signals were not seen and plasma levels of PTH intact, calcium, insulin, glucose, prolactin, GH and IGF1 were within the normal ranges. However, one of his daughters has alterations in hypophysis MR suggestive of a microadenoma, probably a clinically non-functioning adenoma.

DISCUSSION

The present study describes the case of a patient affected by acromegaly that presented neoplastic components found in two types of multiple endocrine neoplasia, CNC and MEN1. These diseases, in spite of some shared clinical manifestations, including acromegaly and autosomal dominant inherited pattern, belong to different groups of endocrine neoplasias, with distinct molecular patterns whose association has not yet been described in the literature.

In relation to the first disease, diagnosis was established through the finding of two major criteria for CNC, specifically, acromegaly and differentiated thyroid cancer (Table 1), whereas the diagnosis of MEN 1 was established due to the presence of the GH-producing adenoma and primary hyperparathyroidism (3,4).

Table 1. Diagnostic criteria for CNC* (1).

Major criteria

1. Spotty skin pigmentation with a typical distribution (palmar, conjunctiva and inner or outer canthi, vaginal and penile mucosa);
2. Myxoma (cutaneous and mucosal);
3. Cardiac myxoma;
4. Breast myxomatosis or fat-suppressed magnetic resonance imaging findings suggestive of this diagnosis;
5. PPNAD[†] or paradoxical positive response of urinary glucocorticoid to dexamethasone administration during Liddle's test;
6. Acromegaly due to GH-producing adenoma[†];
7. LC/CSCF or characteristic calcification on testicular ultrasonography;
8. Thyroid adenoma[†] or multiple, hypoechoic nodules on thyroid ultrasonography in young patient;
9. Pammomatous melanotic schwannoma[†];
10. Blue nevus, epitheloid nevus (multiple)[†];
11. Breast ductal adenoma (multiple)[†];
12. Osteochondromyxoma[†].

Supplemental criteria

1. Affected first-degree relative;
2. Inactivating mutation of the *PRKAR1A* gene.

*To make a diagnosis of CNC, a patient must either 1) exhibit two of the manifestations of the diseases listed or 2) exhibit one of these manifestations and meet one of the supplemental criteria (an affected first-degree relative or an inactivating mutation of the *PRKAR1A* gene) with histological confirmation.

MEN Type 1 and Carney Complex
Nunes et al.

In the reported case sporadic association of genetic alterations found in MEN1 and CNC might have occurred. On the other hand, acromegaly *per se* could have facilitated the development of thyroid cancer, since there is a high incidence of thyroid cancer in patients that present excess of GH and IGF-1 (18). However, it is impossible to rule out that new molecular mechanisms, located in different chromosomal regions, distinct from the ones described until now, may have been the cause of different neoplasias described in the patient. The molecular biology approaches are expected to reveal mechanisms of endocrine tumorigenesis in order to develop better diagnostic, prognostic and therapeutic tools.

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;85:4041-46.
- Almeida MQ, Vilaras MCBF, Mendonça BB. Complexo de Carney: relato de um caso e revisão da literatura. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004;48:544-54.
- Brandi ML, Gagel RF, Angelini A, Blezákian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:688-71.
- Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000;29:541-67.
- HoffAO, Hauschka CM. Neoplasia endócrina múltipla tipo 1: diagnóstico clínico, laboratorial e molecular e tratamento das doenças associadas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49:735-45.
- Bassett JH, Forbes SA, Pannett AA, Lloyd SE, Christie PT, Wooding C, et al. Characterization of mutations in patients with Multiple Endocrine Neoplasia type 1. *Am J Hum Genet.* 1998;62:232-44.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Kirschner LS, Stratakis CA. Genetic analysis of Carney complex: current understanding and future questions. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity.* 2002;9:244-9.
- Stratakis CA, Kirschner LS, Tsyman SE, Tomlinson IP, Marsh DJ, Torpy DJ, et al. Carney Complex, Peutz-Jegher syndrome, Cowden disease, and Bannayan-Zonana syndrome share cutaneous and endocrine manifestations, but not genetic loci. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:2972-6.
- Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the pleiotropic pituitary. *J Clin Invest.* 2003;112:1603-18.
- Bronstein MD, Melmed S. Tumorigenesis hipofisária. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001;45:15-25.
- Pannett AAJ, Thakker RV. Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson "two-hit" hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:4371-4.
- Barzley J, Heatley GJ, Cushing GW. Benign and malignant tumors in patients with acromegaly. *Arch Intern Med.* 1991;51:1629-32.
- Ezzat S, Melmed S. Clinical review 18: are patients with acromegaly at increased risk for neoplasia? *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;72:245-9.
- Popovic V, Damjanovic S, Micio D, Nascovic M, Djurovic M, Petakovic M, et al. Increased incidence of neoplasia in patients with pituitary adenomas. The Pituitary Study Group. *Clin Endocrinol.* 1998;49:441-5.
- Higuchi Y, Saeki N, Iuchi T, Uchino Y, Tatsuono I, Uchida D, et al. Incidence of malignant tumors in patients with acromegaly. *Endocr J.* 2000;47:587-90.
- Jenkins PJ, Besser M. Clinical Perspective: acromegaly and cancer: a problem. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;85:2935-41.
- Daughaday WH. The possible autocrine/paracrine and endocrine roles of insulin-like growth factors of human tumors. *Endocrinology.* 1990;127:1-4.
- Tita P, Ambrosio MR, Scollo C, Carta A, Gangemi P, Bondanelli M, et al. High prevalence of differentiated thyroid carcinomas in acromegaly. *Clin Endocrinol.* 2008;63:161-7.
- Hammann BL, Baumann H, Janssen CE, Görge R, Schmid KW, Mann K. Impact of diseases in patients with acromegaly: basal evaluation and follow-up. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2004;112:225-30.
- Schussheim DH, Skarulis MC, Agarwal SK, Simonds WF, Burns AL, Spiegel AM, et al. Multiple endocrine neoplasia type 1: new clinical and basic findings. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12:173-8.
- Griffin KJ, Kirschner LS, Matykhina L, Stergiopoulos SG, Robinson-White A, Lanher SM, et al. A transgenic mouse bearing an antisense construct of regulatory subunit type 1A of protein Kinase A develops endocrine and other tumours: comparison with Carney complex and other PRKAR1A induced lesions. *J Med Genet.* 2004;41:923-31.
- Stratakis CA, Courcoulas NA, Abati A, Filis A, Doppman JL, Carney JA, et al. Thyroid gland abnormalities in patients with the syndrome of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity, and schwannomas (Carney complex). *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:2037-43.
- Stergiopoulos SG, Abu-Asab MS, Teckos M, Stratakis CA. Pituitary pathology in Carney complex patients. *Pituitary.* 2004; 7:73-82.
- Blai F, Walker J, Ottow SJ, Marchuk DA. Familial segregation of hemangiomas and vascular malformations as an autosomal dominant trait. *Arch Dermatol.* 1988;134:716-22.
- Yamakita N, Ikeda T, Shimizu Y, Hirata T, Murai T, Kawamura S, et al. Undefined complications of parathyroid adenoma, parathyroid hyperplasia (Primary Hyperparathyroidism), thyroid follicular adenoma, thyroid papillary carcinoma, temporal astrocytoma, cerebellar meningioma, and hemangioma of external auditory meatus and oral papilloma. *Intern Med.* 2000;39:614-9.
- Cavazo BM, Domingues R, Bacelar MC, Cardoso H, Barros L, Gomes L, et al. Mutation analysis of Portuguese families with multiple endocrine neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002;56: 485-73.
- Ellard S, Hattersley AT, Brewer CM, Vaidya B. Detection of an MEN1 gene mutation depends on clinical features and supports current referral criteria for diagnostic molecular genetic testing. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005;62, 109-75.

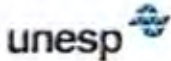

Copyright © 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

29. Klein RD, Seth S, Bessoni J, Bale AE. Clinical testing for multiple endocrine neoplasia type 1 in a DNA diagnostic laboratory. *Genet Med*. 2005;7:131-6.
30. Horvath A, Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of acromegaly: MEN1, Carney Complex, McCune-Albright syndrome, familial acromegaly and genetic defects in sporadic tumors. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006;9:1-11.
31. Vierina O, Georgitai M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, et al. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science*. 2006;312:1228-30.


Correspondence to:

Vania dos Santos Nunes
Distrito de Rubião Junior, s/nº, Departamento de Clínica
Médica da Faculdade de Medicina,
18618-970 Botucatu SP
Email: nunesvania2003@yahoo.com.br

Anexo 2:

 **Universidade Estadual Paulista**
Faculdade de Medicina de Botucatu 

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenação: tsarden@fmb.unesp.br

 Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 17 de novembro de 2008

Of. 503/08-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Célia Regina Nogueira
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Cara Drª Célia Regina,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que nesta data (17/11/2008) foi autorizada a mudança no título do Projeto de Pesquisa, cujo protocolo nº 2267-2006, aprovado em 04/12/2006 na seguinte conformidade:

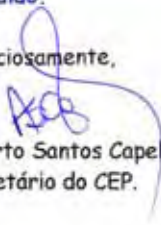
Título anterior: Avaliação clínica e análise genética de famílias portadoras de Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (MEN1) - Autoria Vânia dos Santos Nunes - Orientação da Profª Drª Célia Regina Nogueira (**Mestrado**);

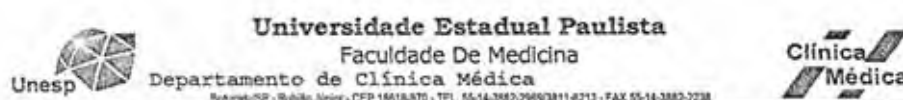
Passou a constar à partir de 17/11/2008.

Título atual: Frequência da neoplasia endócrina múltipla tipo 1 em um grupo de pacientes com adenoma hipofisário: aspectos clínicos e estudo genético familiar - Autoria Vânia dos Santos Nunes - Orientação da Profª Drª Célia Regina Nogueira (**Doutorado**)

Deverá apresentar ao CEP Relatório Final de Atividades, tão logo o estudo seja concluído.

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

Anexo 3:**Universidade Estadual Paulista**

Faculdade De Medicina

Departamento de Clínica Médica

Botucatu/SP - R. João Junco - CEP 13618-970 - TEL. 55-14-3882-2969/3811-4213 - FAX 55-14-3882-2238

**Clínica
Médica****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO***Avaliação clínica e análise genética de famílias portadoras de Neoplasia Endócrina
Múltipla tipo 1 (MEN 1)*

Eu, _____, declaro-me informado(a) a respeito do trabalho acima, do qual, ao assinar esse termo, passarei a fazer parte, declarando-me ciente e tendo sido me explicado que:

1. O estudo referente à doença encontrada na minha família se iniciará com a coleta do meu sangue para pesquisa de mutações. Fui esclarecido(a) sobre o significado do termo mutação, que se trata de uma alteração no meu gen (material transmitido de pai/mãe para filho) que posso transmitir para meus filhos ou que meus pais e irmãos possam transmitir aos seus filhos.
2. Os exames de sangue, urina e de imagens (ultra-som, raios-X, tomografia e ressonância) que eu tenha feito ou vá fazer servirão também para avaliar se eu já tenho ou não essa doença.
3. Fui informado(a) que o objetivo do trabalho é encontrar precocemente pessoas na minha família que tenham a doença, mas que ainda não sentem nada.
4. Não sou obrigado(a) a continuar participando do projeto e posso, a qualquer momento sair do mesmo, sem que isso leve que eu deixe de ser tratado como os demais pacientes assistidos na instituição.
5. Os resultados obtidos poderão ser usados a meu favor, já que saberei como a doença que eu tenho é transmitida.
6. O sigilo médico será garantido.
7. Serei informado(a) dos resultados e se necessário, as informações também serão dadas para os demais membros da minha família.
8. O meu sangue para pesquisa de mutações ficará armazenado no laboratório experimental de Clínica Médica, mas só será usado para outro estudo mediante a minha aprovação.
9. Qualquer dúvida adicional que vier ter durante o acompanhamento será devidamente esclarecida pelo médico responsável.
10. Este documento será elaborado em duas vias, sendo um entregue ao sujeito da pesquisa e outro será mantido em arquivo pelo pesquisador.

Estando ciente e de acordo, assino a presente nas duas vias e de igual teor, juntamente com o médico responsável.

*Paciente*_____
Pesquisador

Vania dos Santos Nunes
HC UNESP- Departamento de Clínica Médica
(14) 3811 62 13 e 9621 34 52
nunesvania2003@yahoo.com.br

Profª Dra Célia Regina Nogueira
HC UNESP- Departamento de Clínica Médica
(14) 3811 62 13
nogueira@fmb.unesp.br