



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

DANIEL PASCOALINO PINHEIRO

PERFIL CLÍNICO E MOLECULAR DE PACIENTES PORTADORES DE
NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 1

FORTALEZA

2012

DANIEL PASCOALINO PINHEIRO

**PERFIL CLÍNICO E MOLECULAR DE PACIENTES PORTADORES DE
NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 1**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

P718p

Pinheiro, Daniel Pascoalino.

Perfil clínico e molecular de pacientes portadores de neoplasia endócrina múltipla tipo 1/
Daniel Pascoalino Pinheiro. – 2012.

91 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes.

1. Neoplasia Endócrina Múltipla. 2. Mutação. 3. Neoplasias. I. Título.

CDD 616.4

DANIEL PASCOALINO PINHEIRO

**PERFIL CLÍNICO E MOLECULAR DE PACIENTES PORTADORES DE
NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 1**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 06/09/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Catarina Brasil d'Alva
Faculdade de Medicina Christus

Dedico à minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Eu Agradeço:

À Deus, pela minha existência e por me proporcionar todas as oportunidades, sempre me guiando pelo caminho certo.

Aos meus pais, Marilson e Fátima, pelo carinho, dedicação e amor, que sempre me apoiaram e aconselharam em todos os momentos de dúvidas. Aos meus irmãos, Rafael e Jéssica, pelo companheirismo, amizade e amor, que sempre estão ao meu lado.

À meu orientador, Prof. Manoel Odorico de Moraes Filho, que me recebeu no LOE, acreditando no meu potencial mesmo sem me conhecer. Obrigado pelo apoio, sabedoria e pela oportunidade de fazer parte de uma grande equipe de pesquisadores.

As professoras Cláudia do Ó Pessoa e Letícia Costa-Lotufo, pelo apoio, ensinamentos e conversas. Obrigado por todas as parcerias que realizamos juntos!

À Ana Rosa Pinto Quidute, pelo apoio, ajuda e discussões científicas ao longo de todo o desenvolvimento desse trabalho. Obrigado pelo convite e por me apresentar a uma área tão empolgante de estudo. Sem você esse trabalho não teria sido realizado!

Ao Professor Alexandre Havt Bindá, pela ajuda e apoio no desenvolvimento desse trabalho. Obrigado pela elucidação das dúvidas que surgiam!

À Aline Martins, grande amiga, pela motivação e apoio inicial nessa caminhada. Obrigado pelo convite que fez mudar parte de minha trajetória!

À Marcília Pinheiro, grande amiga, pelo apoio e ajuda imensurável no desenvolvimento desse trabalho. Obrigado pelas conversas, conselhos e companheirismo.

À Ana Jérsia Araújo e José Delano Marinho, pelo apoio, conversas e discussões científicas. Obrigado pela grande ajuda na minha qualificação! Pela paciência em me escutar por mais de três horas!

À todos da UNIFAC, em especial a Profa. Maria Elisabete Amaral de Moraes, responsável pela unidade. Meu obrigado a todos pelo apoio! À Catarina Brasil d'Alva, pela ajuda e apoio. Obrigado pela elucidação de dúvidas na análise das sequências geradas.

A todos do LDI: Mara, Alba, Paloma, Pedro, pelas várias conversas enquanto estive lá colocando minhas placas para sequenciar. Alba, obrigado por dividir o sequenciador!

A meus amigos: Gabriela Vieira, Paula Abreu, Patrícia Marçal, Aline Sbardelotto, Bruno Marques, Assuero Silva, Sabrina Maranhão, Dani Foschetti e Synara pelos ótimos momentos que compartilhamos tanto dentro quanto fora dos laboratórios.

A todos do LOE: Evelyne, Arinice, Danilo, Marcos Angelim, Dayse, Sérgio Barros, Paula Jimenez, Igor Bomfim, Felipe, Bruno Coêlho, Diego Veras, Washington, Elthon, Cecília e todos os demais que minha memória não permite lembrar, pelas conversas e ajuda. Aos alunos de iniciação científica Lidiane, Lia, Rafael, Ellivelton e Wallady pela ajuda na realização dos experimentos.

À Erivanda França e à Tânia, pela ajuda nas coletas de sangue dos pacientes do estudo. A ajuda de vocês foi imprescindível para o desenvolvimento desse trabalho. À Silvana França e D. Rogéria, pelo apoio técnico. Aos funcionários da secretaria do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Àurea Rhanes e Márcia, pelo apoio técnico.

À Flávia Martins Aguiar, pela ajuda em resolver todos os pequenos problemas burocráticos, além de seu apoio e amizade. À Fábiana Bezerra Lima pela ajuda no longo processo burocrático e necessário para execução desse trabalho. À Adelânia Roque Marinho, Sheyla Prado dos Santos e Maria Teresa Rocha, por ajudarem em importantes momentos dessa jornada.

A todos os profissionais, amigos e colegas, que de alguma forma contribuíram neste trabalho e que, por culpa da minha péssima memória, não foram citados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pelo apoio financeiro.

Enfim, à todos, meu muito obrigado!

“A ciência nunca resolve um problema

sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

RESUMO

A NEM1 é uma síndrome rara com padrão de transmissão autossômico dominante, causada por uma mutação que inativa o gene *MEN1* (gene supressor tumoral). Define-se sua presença pela ocorrência associada de dois dos três principais tumores endócrinos relacionados à NEM-1: hiperparatireoidismo primário (HPT), adenomas hipofisários (AH) e tumores gastroenteropancreáticos (TEPs) secretores ou não. O gene *MEN1*, envolvido nessa síndrome, consiste de 10 exons (exon 1 e 832 bases do exon 10 não são traduzidos), codificando uma proteína que contém 610 aminoácidos, denominada *MENIN*. Mais de 459 diferentes mutações germinativas já foram identificadas em famílias com NEM1. Um total de 8 famílias e 2 casos esporádicos foram estudados, perfazendo um total de 33 pacientes com NEM1. Foram coletados 4mL de sangue periférico para extração de DNA e RNA utilizando os kits QIAamp DNA Blood Mini e QIAamp RNA Blood Mini, respectivamente, ambos da QIAGEN®. Os nove exons da região codificadora do gene *MEN1* foram amplificados por PCR e submetidos, após purificação, à reação de sequenciamento. Em seguida as amostras foram analisadas através de eletroforese capilar. As sequências geradas foram analisadas utilizando o software CondonCode Aligner, afim de traçar um perfil mutacional. As amostras de RNA foram convertidas em cDNA e analisadas em PCR tempo real. A idade média dos pacientes estudados foi de $40,7 \pm 12,7$ anos, onde a prevalência dos tumores associados a NEM1 foi: HPT, 87,8% (29/33); adenoma hipofisário, 81,8% (27/33); TEPs, 54,5% (18/33); outros tumores associados a NEM1, 63,6% (21/33). Como primeira manifestação nesses pacientes, os adenomas hipofisários prevaleceram, ocorrendo em 57,5% (19/33). Após sequenciamento automático de toda a região codificadora do gene *MEN1*, foram encontradas mutações germinativas em sete famílias portadoras de NEM1 estudadas e em um dos casos esporádicos. Três diferentes mutações foram identificadas, estando presentes nos exons 3 e 6: duas do tipo *missense* (mutações pontuais), c.597 C>T (H199H) e c.830 C>G (P277R); e uma do tipo *splice-site* (mutações nas regiões de junção exon-intron), c.654 +1 G>T (IVS3+1G→T). Não foi possível estabelecer uma associação entre genótipo-fenótipo nesses pacientes portadores de NEM1. Foram observadas diferenças no perfil de expressão. O gene *MEN1*, nos pacientes com NEM1 estudados, estava regulado negativamente, quando comparado ao grupo controle.

Palavras-chave: Neoplasia Endócrina Múltipla. Mutação. Neoplasias.

ABSTRACT

MEN-1 is a rare autosomal dominantly inherited syndrome caused by a mutation that inactivates the *MEN1* gene (tumor suppressor gene). The clinical manifestation of MEN-1 is defined by the associated occurrence of at least two of the three main endocrine tumors related to MEN1: primary hyperparathyroidism (PHP), pituitary adenoma (PA) and gastroenteropancreatic tumors (GEPs). The MEN1 gene, involved in the syndrome, consists of 10 exons (exon 1 and 832 bases of exon 10 are not translated) encoding a protein that contains 610 amino acids called MENIN. Over 459 different germline mutations have been identified in families with MEN1. A total of eight families and two sporadic cases were studied, resulting in 33 patients with MEN1, with 31 familiar MEN1 and two sporadic MEN1. Four milliliters of peripheral blood were collected for DNA and RNA extraction using the QIAamp DNA Blood Mini and QIAamp RNA Blood Mini Kits from QIAGEN®. Each of the nine coding exons of the *MEN1* gene was amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR). The PCR products were purified and standard protocols were used for cycle sequencing. Sequences were determined after capillary electrophoresis and analyzed using the software CondonCode Aligner®, in order to draw a mutational profile. RNA samples were converted into cDNA and analyzed in real time PCR. The average age of patients was 40.7 ± 12.7 years, and the prevalence of tumors associated with MEN1 was: PHP, 87.8% (29/33), pituitary adenoma, 81.8% (27/33); GEPs, 54.5% (18 / 33), other tumors associated with MEN1, 63.6% (21/33). As the first manifestation in these patients, the pituitary adenomas prevailed, occurring in 57.5% (19/33). After automated sequencing of the entire coding region of the MEN1 gene, germline mutations were found in seven MEN1 families and in one of the sporadic cases. Three different mutations were identified: two missense mutations, c.597 C>T (H199H) e c.830 C>G (P277R); and one splice-site mutation, c.654 +1 G>T (IVS3+1G→T). We could not find any association between genotype-phenotype in these MEN1 patients. Differences in the gene expression profile were observed. The MEN1 gene in the studied patients was down regulated, when compared to healthy individuals.

Keywords: Multiple Endocrine Neoplasia. Mutation. Neoplasms.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Localização do gene MEN1 no cromossomo 11 (11q13).....30
- Figura 2:** Representação esquemática da organização genômica do gene *MEN1*, a proteína por ele codificada (MENIN) e as regiões de interação com outras proteínas. **A.** Gene *MEN1*. A região codificadora de 1.83Kb está representada em cinza. As numerações indicam mutações frequentes (Tabela 1) e as letras indicam polimorfismos (Tabela 2). A escala mostra a frequência dessas mutações. **B.** Proteína MENIN representada com os três NLSs (NSL1, NSLa, NSL2) e cinco sítios putativos de GTPase (G1 a G5). **C.** Regiões de ligação da MENIN com diferentes proteínas (caixa aberta). Fonte: Lemos & Thakker, 2008..... 31
- Figura 3:** Funções da proteína MENIN através de suas interações com outras proteínas e moléculas. Modificado de Thakker, 2010..... 35
- Figura 4:** Resposta ao tratamento farmacológico associado ao tamanho do tumor..... 52
- Figura 5:** Valores de Ki67 associados à ausência ou presença de metástases..... 52
- Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 2 do gene *MEN1*. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação. Br: controle negativo..... 54
- Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando a repetição de alguns produtos amplificados do exon 2 do gene *MEN1*. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 15: produto de amplificação. Br: controle negativo 54
- Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 3 do gene *MEN1*. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação. Br: controle negativo..... 55
- Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 4 do gene *MEN1*. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus

DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação. Br: controle negativo..... 55

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 5.6 do gene *MEN1*. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação. Br: controle negativo..... 56

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 7 do gene *MEN1*. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação. Br: controle negativo..... 56

Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 8 do gene *MEN1*. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação. Br: controle negativo..... 57

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 9 do gene *MEN1*. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação. Br: controle negativo..... 57

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 10 do gene *MEN1*. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação. Br: controle negativo..... 58

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados dos exons 2 e 5.6 do gene *MEN1*. Amostras de voluntários controle do estudo. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 20: produto de amplificação grupo controle. Br: controle negativo..... 58

Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados dos exons 3, 8, 9 e 10 do gene *MEN1*. Amostras de voluntários controle

do estudo. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 32: produto de amplificação grupo controle. Br: controle negativo..... 59

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados dos exons 3, 4, 7, 8, 9 e 10 do gene *MEN1*. Amostras voluntários controle do estudo. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 28: produto de amplificação grupo controle. Br: controle negativo..... 59

Figura 18: Sequenciamento automático do gene *MEN1*. A: Mutação *missense* c.597 C>T (H199H), localizada no exon 3. B: Sequência normal do voluntário controle..... 61

Figura 19: Sequenciamento automático do gene *MEN1*. A: Mutação *splice-site* c.654+1 G>T (IVS3+1G→T), localizada no intron 3. B: Sequência normal do voluntário controle..... 61

Figura 20: Sequenciamento automático do gene *MEN1*. Mutação *missense* c.830 C>G (P277R), localizada no exon 6. B: Sequência normal do voluntário controle..... 61

Figura 21: Representação esquemática da região codificadora do gene *MEN1*(exons 2 a 10) indicando as 11 mutações germinativas identificadas nesse estudo..... 62

Figura 22: Perfil de expressão do gene *MEN1*. A: Curvas de amplificação voluntários sadios e pacientes portadores de NEM1. Genes *MEN1* e *GAPDH*. B: Curva de dissociação. Genes *MEN1* e *GAPDH*..... 66

Figura 23: Níveis de expressão do gene *MEN1* em pacientes portadores de NEM1 e em voluntários sadios ($p = 0,0003$)..... 66

Figura 24: Evolução no número de pacientes (familiares e esporádicos) com NEM1 acompanhados no SED-HUWC, considerando como marcos temporais os anos de 2008, 2010 e 2012..... 68

Figura 25: Incremento no diagnóstico dos principais tumores relacionados a síndrome NEM1 nos pacientes acompanhados no SED-HUWC, considerando como marcos temporais os anos de 2008, 2010 e 2012..... 68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais Neoplasias Endócrinas Múltiplas.....	20
Quadro 2: Critérios para indicação cirúrgica em casos de HPT/NEM1.....	24
Quadro 3: <i>Primers</i> utilizados no estudo, constando: o exon em questão, as sequências <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primers</i> e o tamanho esperado do amplicon.....	42
Quadro 4: Oligonucleotídeos utilizados no estudo de expressão do gene <i>MEN1</i> , constando: gene em questão, número de acesso no NCBI, sequência dos iniciadores e o tamanho esperado.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Manifestações clínicas da NEM1 com estimada penetrância média em adultos.....	28
Tabela 2: Protocolo de rastreamento bioquímico e radiológico em indivíduos com alto risco de desenvolvimento de NEM1 ou pacientes com NEM1.....	29
Tabela 3: Mutações germinativas mais frequentes no gene <i>MEN1</i> . Fonte: Lemos & Thakker, 2008.....	32
Tabela 4: Polimorfismos do gene <i>MEN1</i> . Fonte: Lemos & Thakker, 2008.....	33
Tabela 5: Prevalência dos principais tumores associados a NEM1 nos pacientes do presente estudo e na literatura.....	50
Tabela 6: Manifestação clínica inicial nos pacientes portadores de NEM1 do presente estudo.....	51
Tabela 7: Condições de amplificação através de PCR, após padronização, dos nove exons do gene <i>MEN1</i>	53
Tabela 8: Mutações identificadas nas oito famílias portadoras de NEM1 familiar e nos dois casos de NEM1 esporádicos.....	60
Tabela 9: Prevalências, por família, dos principais tumores NEM1; e mutações germinativas identificadas nas oito famílias e nos dois casos esporádicos estudados nesse projeto.....	63
Tabela 10: Ocorrência dos tumores NEM1 relacionados e sua respectiva agressividade (S/N) por família; relatado às mutações identificadas em cada família.....	63
Tabela 11: Presença/ausência de metástases em pacientes com TEPs/NEM1, associado a valores de Ki67 e às mutações identificadas por família.....	64
Tabela 12: Resposta ao tratamento farmacológico, associado ao tamanho do tumor e às mutações identificadas por família.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

AH: Adenomas hipofisários

Ca: Cálcio sérico

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EDTA: Ácido Etilenodiamino-Tetracético

FSH: Hormônio folículo estimulante

FIPA: Tumores hipofisários familiares isolados

GA: Gastrinoma

GAe: Gastrinoma esporádico

GH: Hormônio de crescimento

HIP: Tumores hipofisários

HPT: Hiperparatireoidismo

HPTe: Hiperparatireoidismo esporádico

LH: Hormônio Luteinizante

LOH: Perda de heterozigose, referente à inativação somática de gene supressor tumoral

NEM: Neoplasia Endócrina Múltipla

NEM1: Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1

NEM2: Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2

NLS: Sinais de localização nuclear

PCR: Polymerase Chain Reaction - Reação em cadeia da polimerase

PTH: Paratormônio

PRL: Prolactinoma

RM: Ressonância magnética

TNF: Tumor não-funcionante

TEPs: Tumores entero-pancreáticos

UV: Ultravioleta

VHL: Von Hippel-Lindau

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
1.1 Câncer	19
1.2 Neoplasias Endócrinas Múltiplas	19
1.3 Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM1)	20
1.4 Aspectos clínicos da NEM1	22
1.4.1 Hiperparatireoidismo	22
1.4.2 Tumores entero-pancreáticos	24
1.4.2.1 Tratamento farmacológico nos TEPs	26
1.4.3 Tumores hipofisários	26
1.4.4 Outros tumores	27
1.5 Seguimento Clínico na NEM1	28
1.6 Aspectos da genética molecular na NEM1	29
1.6.1 Mutações e polimorfismos no gene <i>MEN1</i>	30
1.6.2 A Proteína MENIN	33
1.6.3 Tumorigênese na NEM1	35
1.6.4 Análise mutacional do gene <i>MEN1</i> na prática clínica	36
1.6.5 Outros genes possivelmente envolvidos na NEM1	36
1.7 Justificativa	37
2 OBJETIVOS	38
2.1 Geral	38
2.2 Específicos	38
3 PACIENTES	39
3.1 Aspectos éticos	39
3.2 Pacientes portadores de NEM1	39
3.3 Voluntários Controle	39
4 MÉTODOS	40
4.1 Coleta das amostras	40
4.2 Procedimentos Laboratoriais / DNA	40
4.2.1 Extração de DNA	40

4.2.2	Amplificação do gene <i>MEN1</i>	41
4.2.3	Sequenciamento do gene <i>MEN1</i>	43
4.2.3.1	Purificação dos produtos da PCR	43
4.2.3.2	Reação de sequenciamento	43
4.2.3.3	Reação de precipitação	44
4.2.3.4	Sequenciamento automático	45
4.2.3.5	Análise do sequenciamento	45
4.2.4	Identificação das mutações	45
4.3	Análise <i>in silico</i> das mutações	46
4.4	Procedimentos laboratoriais / RNA	46
4.4.1	Extração de RNA	46
4.4.2	PCR em tempo real (RT-PCR)	47
4.5	Descrição do perfil clínico dos pacientes	49
4.6	Análises estatísticas	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Perfil Clínico dos pacientes com NEM1	50
5.2	Perfil molecular dos pacientes com NEM1	53
5.2.1	Extração de DNA e Amplificação do gene <i>MEN1</i>	53
5.2.2	Identificação de mutações no gene <i>MEN1</i>	60
5.2.2.1	Análise <i>in silico</i> das mutações <i>missense</i> identificadas no gene <i>MEN1</i>	62
5.2.3	Polimorfismos no gene <i>MEN1</i>	62
5.3	Correlação genótipo-fenótipo nos pacientes portadores de NEM1	62
5.3.1	Co-existência de tumores NEM1 relacionados a presença de mutações	62
5.3.2	Agressividade dos tumores NEM1 relacionados a presença de mutações	63
5.3.3	Maligância dos TEPs/NEM1 relacionados a presença de mutações	64
5.3.4	Resposta ao tratamento farmacológico em AH/NEM1 relacionados a presença de mutações	64
5.4	Análise de expressão do gene <i>MEN1</i>	65
6	DISCUSSÃO	67
6.1	Perfil Clínico do pacientes com NEM1	67
6.2	Perfil molecular dos pacientes portadores de NEM1	71
7	CONCLUSÕES	75

8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXO A	87
ANEXO B	91

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Câncer

Câncer (do grego karkinos – caranguejo) é um termo que descreve um conjunto de doenças, que apresentam em comum à proliferação desordenada e a incapacidade de diferenciação celular normal. A progressão tumoral é o processo pelo qual as células adquirem características de malignidade, como crescimento progressivo, invasão e formação de metástases (NOWELL, 1986).

Os tumores malignos são responsáveis por um número significativo e crescente de pacientes em todo o mundo, representando a segunda causa de morte na população mundial. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino (INCA, 2012).

1.2 Neoplasias Endócrinas Múltiplas

As Neoplasias Endócrinas Múltiplas (NEMs) são síndromes endócrinas complexas, com caráter autossômico dominante de alta penetrância. São doenças hereditárias caracterizadas pela presença de pelo menos dois tumores envolvendo glândulas endócrinas em um mesmo indivíduo (HOFF; COTE; GAGEL, 2000). As manifestações clínicas da doença estão relacionadas ao órgão afetado, sendo resultado, principalmente, do excesso de hormônios produzidos por estes tumores (BRANDI et al., 2001).

As principais NEMs incluem as Neoplasias Endócrinas Múltiplas Tipo 1 (NEM1) e Tipo 2 (NEM2), a Síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL), a Neurofibromatose Tipo 1 (NF1) e o Complexo de Carney (CNC) (Quadro 1). Essas síndromes são caracterizadas pela presença de mutações germinativas que causam inativação de genes supressores tumorais ou ativação de proto-oncogenes, envolvidos na regulação da proliferação celular (MARX, 2005).

Quadro 1: Principais Neoplasias Endócrinas Múltiplas.

Síndrome	Principais Manifestações Clínicas	Anormalidade Genética
NEM1	Hiperparatireoidismo primário Adenomas hipofisários Tumores enteropancreáticos Tumores do córtex adrenal Angiofibroma cutâneo Lipomas	Mutação inativadora do gene <i>MEN1</i> (11q13) que codifica a proteína MENIN
NEM2	Hiperparatireoidismo primário Carcinoma medular de tireóide Feocromocitoma	Mutação ativadora do proto-oncogene <i>RET</i> (10q11.2) que codifica o receptor RET
Síndrome de von Hippel-Lindau	Tumores de ilhotas pancreáticas Feocromocitoma Hemangioblastoma do SNC Angiomas da retina Hipernefomas Cistos viscerais Neurofibromas	Mutação inativadora do gene <i>VHL</i> (3p25) que codifica a proteína ELONGINA
Neurofibromatose tipo 1	Feocromocitoma Hiperparatireoidismo primário Carcinoma medular de tireóide Neurofibroma cutâneo Tumor carcinóide produtor de somatostatina	Mutação inativadora do gene <i>NF-1</i> (17q11.2) que codifica a proteína NEUROFIBROMINA
Complexo de Carney	Acromegalia Pigmentação cutânea puntiforme Mixoma cardíaco Mixoma cutâneo Tumor de células de Sertoli Schwannoma Doença adrenocortical pigmentar nodular primária	Mutação inativadora do gene <i>PRKARIA</i> (17q22-24) que codifica o domínio regulatório da proteína quinase A (PKA)

Fonte: Adaptado de Hoff e Hauache, 2005.

1.3 Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM1)

A Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (OMIM 131100) ou Síndrome de Wermer é uma síndrome hereditária, de ocorrência familiar ou eventualmente esporádica, caracterizada essencialmente por sua complexidade e variabilidade clínica (BRANDI et al., 2001; LOURENÇO Jr et al., 2006). Na sua forma familiar, é transmitida por um padrão de herança autossômico dominante com elevada penetrância (CARTY et al., 1998). Caracteriza-se pela ocorrência associada de tumores das glândulas paratiróides, ilhotas pancreáticas/duodeno e

hipófise (WERMER, 1954; THAKKER, 1995; TRUMP et al., 1996). No entanto, além dos tumores endócrinos, na NEM1 podem também ocorrer tumores não endócrinos, sendo que mais de 20 tipos diferentes de neoplasias (benignas e malignas, funcionantes e não-funcionantes) já foram associadas a essa doença (MARX, 2005).

A maioria dos tumores relacionados com NEM1 são benignos, mas alguns tumores enteropancreáticos, como os gastrinomas e tumores carcinóides, podem ser malignos, sendo estas as maiores causas de morte em pacientes com NEM1 (MARX et al., 1999). O diagnóstico precoce dos tumores gastroenteropancreáticos é de grande importância, uma vez que a ocorrência de metástases com efeito de massa e síndrome de secreção hormonal muda o prognóstico dos pacientes.

Com relação à evolução do quadro clínico dos pacientes com NEM1, usualmente, na segunda década de vida desses pacientes, há desenvolvimento de tumores benignos, enquanto que a partir da 4ª década de vida há um aumento significativo na ocorrência de tumores malignos, os quais levam a morte cerca de um terço destes pacientes (WILKINSON et al., 1993; GEERDINK; VAN DER LUIJT; LIPS, 2003).

Estima-se que a prevalência da NEM1, a mais estudada entre as Neoplasias Endócrinas Múltiplas, varia de 0,01 a 2,5 por 1.000 (MARX et al., 1999). As manifestações clínicas da doença relacionam-se ao órgão afetado, podendo incluir efeitos de massa devido ao crescimento tumoral, à hipersecreção hormonal e à malignidade tumoral (MARX et al., 1999; BRANDI et al., 2001).

O diagnóstico de NEM1 pode ser realizado pela: a) clínica, definindo-se sua presença quanto existe em um indivíduo pelo menos dois dos três principais tumores endócrinos relacionados à NEM1 (hiperparatireoidismo, tumor endócrino enteropancreático e tumor de hipófise) e/ou b) genética, através da identificação de mutação germinativa no gene *MEN1* (BRANDI et al., 1987; HOFF; COTE; GAGEL, 2000; MARX, 2005).

O diagnóstico de NEM1 familiar é realizado na presença de um indivíduo com diagnóstico de NEM1 com pelo menos um parente de primeiro grau apresentando no mínimo uma das características de NEM1, ou seja, a presença de tumor em pelo uma das três glândulas endócrinas-alvo mais frequentemente afetadas (SCHUSSHEIM et al., 2001; BRANDI et al., 2001).

A distinção entre tumores endócrinos esporádicos e associados a NEM1 é de fundamental importância para um bom manejo clínico e cirúrgico, além de um apropriado seguimento e aconselhamento genético de pacientes e seus familiares (BRANDI et al., 2001).

O tratamento da NEM1 é complexo e a cura é difícil. Os pacientes frequentemente são submetidos a várias intervenções médicas e cirúrgicas ao longo de suas vidas, uma vez que os tumores têm alto potencial recidivante e causam síndromes hormonais importantes (MARX et al., 1999). A decisão cirúrgica deve ser individualizada, levando-se em conta as suas possíveis sequelas decorrentes, incluindo hipoparatiroidismo, hipopituitarismo e insuficiência pancreática exócrina e endócrina (HOFF; HAUACHE, 2005).

Com o advento da análise genética na NEM1 em 1997, novas abordagens diagnósticas e terapêuticas tem sido discutidas, uma vez que o “screening” genético de famílias com NEM1, a partir de casos índice, permite a detecção da síndrome individualmente em um estágio pré-clínico. Modificando, dessa forma, a abordagem da síndrome de forma a reduzir a morbi-mortalidade a ela associada (HAI et al., 1999; LAIRMORE et al., 2004; LOURENÇO Jr. et al., 2007; TOLEDO et al., 2007).

1.4 Aspectos clínicos da NEM1

1.4.1 Hiperparatiroidismo

O hiperparatiroidismo primário (HPT), causado pela hipersecreção do PTH, é normalmente a primeira e mais frequente manifestação clínica na NEM1, estando presente em torno de 90-97% dos portadores desta síndrome (CALENDER et al., 1995; SCHUSSHEIM et al., 2001). Comumente, o diagnóstico de HPT na NEM1 ocorre entre os 12 e 28 anos de idade, com uma média de 19 anos (SKOGSEID; RASTAD; OBERG, 1994). Sua penetrância aumenta com a idade, se aproximando de 95% nos pacientes com 30 anos e de quase 100% aos 40 anos (MELLETTTE, 1994; BURGESS et al., 1999).

A avaliação bioquímica prospectiva de famílias com NEM1 demonstrou que o HPT começa a se manifestar já na segunda década de vida. Portanto, espera-se que aos 40 anos de idade a maioria dos indivíduos já terá apresentado alguma forma de hiperparatiroidismo (SKOGSEID et al., 1991).

A manifestação clínica mais comum é a identificação de hipercalcemia assintomática associada à elevação moderada do PTH (HPT assintomático). Entretanto, quando esta não é identificada precocemente, as manifestações do hiperparatireoidismo tardio, como nefrolitíase, osteoporose, fraturas ósseas e sintomas decorrentes de hipercalcemia grave, podem ocorrer (MALLETTE, 1994; HOFF; HAUACHE, 2005).

As características do HPT/NEM1 diferem daquelas clássicas do hiperparatireoidismo primário esporádico (HPTe) em alguns aspectos. O HPT/NEM1 usualmente apresenta: a) hiperplasia de paratireóides, e mais raramente adenomas; b) comprometimento de múltiplas glândulas paratireoideanas; c) ambos os sexos são afetados na mesma proporção (1:1), diferente do HPTe que é três vezes mais frequente em mulheres; d) manifestação clínica mais precoce (20-30 anos no HPT/NEM1 contra 50-60 anos, no HPTe); e) taxas mais elevadas de recorrência após paratireoidectomia (> 50% contra 2%) (BILEZIKIAN et al., 2002; LOURENÇO Jr. et al., 2006).

A lesão histológica das paratireóides mais frequentemente observada na NEM1 é a hiperplasia difusa ou nodular, com transformações adenomatosas possíveis de serem encontradas mais tardiamente (GAGEL, 1998).

O diagnóstico de HPT é feito por meio de níveis elevados de cálcio total e iônico, associados à hipercalcúria e níveis altos de PTH, enquanto os níveis de fosfato sérico estão baixos ou permanecem no limite inferior (BONE, 1990).

O tratamento do HPT/NEM1 é geralmente cirúrgico, entretanto ainda não existe um consenso claro sobre o melhor momento para a cirurgia (GAGEL, 1998). As indicações cirúrgicas incluem cálcio sérico maior que 12mg/dL, urolitíase e doença óssea decorrente do hiperparatireoidismo. Não é claro, entretanto, quando intervir naqueles pacientes com hiperparatireoidismo com níveis de cálcio inferiores a 12mg/dL (HOFF; HAUACHE, 2005). Os critérios utilizados para o manejo clínico-cirúrgico dos casos de HPT/NEM1 são, nesse sentido, os mesmo estabelecidos pelo consenso sobre HPTe (Quadro 02; BILEZIKIAN et al., 2002).

O procedimento cirúrgico para tratamento do HPT/NEM1 se faz via: a) paratireoidectomia subtotal (três glândulas e meia) ou b) paratireoidectomia total seguida de

enxerto heterotópico de tecido paratiroidiano no antebraço não-dominante (para eventual fácil remoção em casos com recorrência) (BRANDI et al., 2001; CARLING; UDELSMAN, 2005).

A timectomia é geralmente recomendada na primeira abordagem cirúrgica do HPT, porém não existe consenso entre os diferentes grupos, o principal argumento a favor do procedimento seria a prevenção do carcinóide tímico e por ser local frequente de paratireoide ectópica e/ou supranumerária, o que resultaria em insucesso cirúrgico ou recidiva do HPT (MARINI et al., 2009; TONELLI et al., 2009).

Apesar de o HPT estar presente na quase totalidade dos casos de NEM1, em aproximadamente 80% das vezes são os tumores hipofisários, das ilhotas pancreáticas ou tumores carcinóides que motivarão a consulta médica inicial. Assim, como conduta prática, é importante procurar um possível HPT em pacientes com diagnóstico de tumor hipofisário ou de ilhotas pancreáticas, dosando-se inicialmente a calcemia (CORBETTA et al., 1997; BRANDI et al., 2001; PIECHA; CHUDEK; WIECEK, 2008). Em pacientes portadores de tumores hipofisários supostamente esporádicos, o *screening* para a presença de hiperparatireoidismo através da dosagem de cálcio e PTH pode resultar em novos diagnósticos de NEM1.

Quadro 2: Critérios para indicação cirúrgica em casos de HPT/NEM1

Critérios para Indicação de Cirurgia em Casos de Hiperparatireoidismo Primário (HPT) Associado à NEM1
<ul style="list-style-type: none"> • Nefrolitíase; • Osteíte fibrosa cística; • HPT assintomático, associado a uma ou mais das seguintes situações: <ul style="list-style-type: none"> – Cálcio sérico > 1 mg/dL acima do limite superior de normalidade; – Clearance de creatinina <60 mL/min/1,73 m²; – T-escore < -2,5 na coluna lombar, quadril e/ou antebraço; – Pacientes cujo acompanhamento médico não seja possível ou desejado; • Síndrome de Zollinger-Ellison sem controle medicamentoso adequado.

1.4.2 Tumores entero-pancreáticos

Os tumores endócrinos entero-pancreáticos (TEPs) ocorrem em aproximadamente 35% dos pacientes com NEM1, sendo essa prevalência bastante variável, em diferentes

estudos clínicos, dependendo da população estudada (10-85%) (MARX, 2005; TONELLI et al., 2006; KOUVARAKI et al., 2006).

Geralmente surgem como a segunda manifestação mais frequente em pacientes portadores de NEM1, com o desenvolvimento de tumores multicêntricos e pluripotentes, pois podem secretar um ou mais tipos de hormônios diferentes (KOUVARAKI et al., 2006). A apresentação clínica é altamente variável, dependendo da extensão do tumor e da natureza e quantidade do hormônio secretado (HOFF; HAUACHE, 2005).

Diferentemente dos tumores paratireoidianos e hipofisários, os TEPs tem elevado potencial para malignização; de fato, 30% a 60% dos pacientes com essas lesões desenvolvem metástases hepáticas no decorrer da vida (MARINI et al., 2009; OBERG, 2010).

Os TEPs dividem-se em funcionantes que secretam diferentes tipos de hormônios incluindo gastrina, insulina, glucagon, polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), somatostatina e ACTH; e não-funcionantes definidos como tumores onde a secreção hormonal é clinicamente irrelevante (BRANDI et al., 2001; KOUVARAKI et al., 2006). As lesões são tipicamente pequenas (<0,5cm) e multicêntricas, podendo ocorrer em qualquer porção do pâncreas ou na submucosa duodenal (GIBRIL et al., 2001; TRIPONEZ et al., 2006; BOTSIOS et al., 2007).

A identificação bioquímica dos tumores entero-pancreáticos baseia-se na determinação da glicemia de jejum, gastrina, glucagon, insulina, pró-insulina e cromogranina A séricas (SKOGSEID, 1999; BRANDI et al., 2001). Exames de imagens também são realizados, tais como: tomografia computadorizada ou ressonância magnética, e eventualmente ecografia endoscópica para melhor definição das características destes tumores (SKOGSEID, 1999).

Entre os tumores funcionantes, o gastrinoma (GA) é o mais comum (40-75%), sendo o principal determinante de mortalidade dessa síndrome, com metástases estando presente ao diagnóstico em metade dos pacientes (GIBRIL et al., 2001; TONELLI et al., 2006; KOUVARAKI et al., 2006; FAGGIANO et al., 2008).

O GA/NEM1 é usualmente multifocal, contrastando com a manifestação unifocal usualmente observada em casos de gastrinoma esporádicos (GAe). São predominantemente duodenais e múltiplos, com alto potencial maligno e com taxas de cura menores que o GA esporádico (TEH et al., 1998; LOURENÇO Jr., 2008). Devido à grande dificuldade de

alcançar a cura total, as melhores formas de abordagem cirúrgica são bastante debatidas na literatura (BRANDI et al., 2001). A estratégia cirúrgica prioriza reduzir a ocorrência de metástases (AKERSTROM et al., 2005).

O insulinoma é o segundo tumor pancreático funcionante mais prevalente na NEM1. É um tumor originário das células beta das ilhotas pancreáticas, com incidência estimada de 4 casos por 1 milhão na população geral, com predominância igual em ambos os sexos (DELCORE; FRIESEN, 1994).

Os insulinomas associados à NEM1 diferem-se dos esporádicos por serem geralmente múltiplos; ocorrerem mais precocemente; terem um maior potencial de malignidade; e apresentarem maiores taxas de recorrência pós-cirúrgica. O tratamento do insulinoma é cirúrgico, basicamente objetivando preservar as funções endócrinas e exócrinas pancreáticas e o alívio de sintomas hipoglicêmicos (METZ et al., 1994; BRANDI et al., 2001).

1.4.2.1 Tratamento farmacológico nos TEPs

Quando a intervenção cirúrgica não é indicada ou quando não resulta em controle da hipersecreção hormonal, os pacientes com TEPs são tratados com terapia farmacológica. A terapia inclui: uso de análogos da somatostatina (octreotide, lanreotide), que inibem a secreção de vários hormônios; bloqueadores de bombas de próton, para pacientes com gastrinomas; e infusão contínua de glucagon, glicose ou diazóxido, para pacientes com insulinoma (HOFF; GAGEL, 1997; NORTON et al., 2004).

A quimioterapia sistêmica é utilizada em pacientes com doença metastática progressiva. Os agentes quimioterápicos utilizados incluem a estreptozocina, doxorrubicina, 5-fluorouracil, dacarbazina e ciclofosfamida (MILLER; ELLISON, 1998).

1.4.3 Tumores hipofisários

A incidência de tumores hipofisários em pacientes com NEM1 (AH/NEM1) é bastante variável, dependendo da população estudada, oscilando de 10% a 65% (BURGESS et al., 1996), podendo ser a primeira manifestação clínica da NEM1 em aproximadamente 20% dos casos. A idade de diagnóstico dos tumores AH/NEM1 (17 a 65 anos) é similar à encontrada nos casos de tumores hipofisários isolados (FIPA) e nos esporádicos (13 a 75 anos) (VERGES et al., 2002; DALY et al., 2006; TOLEDO et al., 2007).

Aproximadamente 80% dos HIP/NEM1 são macroadenomas (>10cm), em contraste com os casos de tumores hipofisários esporádicos (AHe) com frequência de 42% (VERGES et al., 2002). O envolvimento hipofisário nos AH/NEM1 é multicêntrico e pluri-hormonal e os sintomas variam de acordo com o tipo de hormônio secretado, sendo decorrentes do excesso hormonal e/ou devido a efeitos compressivos de massa tumoral (HOFF; HAUACHE, 2005).

O tumor mais frequente entre os AH/NEM1 é o prolactinoma (76%), causando galactorréia e amenorréia na mulher e hipogonadismo e disfunção erétil no homem. O tumor secretor de hormônio de crescimento (GH) é o segundo mais comum, causando manifestações clínicas de acromegalia. Os tumores menos frequentes são os não-funcionantes e o secretor de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que causa a doença de Cushing. Outros tumores hipofisários, como o FHSoma, THSoma e LHoma ocorrem raramente na NEM1 (MATSUZAKI; CANTO-COSTA; HAUACHE, 2004).

O tratamento dos adenomas hipofisários varia de acordo com o subtipo. Prolactinomas são tratados com agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, cabergolina), com uma taxa de resposta alta (70 – 90% dos pacientes), demonstrado pela regressão do tamanho tumoral e normalização da prolactina e regressão dos sintomas. Pacientes não-tolerantes ou resistentes aos agonistas dopaminérgicos são candidatos à cirurgia transesfenoidal, combinada ou não à radioterapia (LOSA et al., 2002; HOFF; HAUACHE, 2005). Para tumores produtores de GH, o tratamento primário é a cirurgia transesfenoidal, resultando em um índice de cura entre 50-70% dos casos. Entretanto, esse índice reduz drasticamente (10-30%) quando os tumores são grandes e invasivos (BECKERS et al., 2003). Análogos de somatostatina, antagonistas do receptor do GH ou radioterapia são utilizados no caso de doença residual após cirurgia ou em casos em que a cirurgia não é indicada (VAN DER LELY et al., 2001; CARON et al., 2002).

1.4.4 Outros tumores

Além das manifestações típicas descritas, os portadores de NEM1 possuem predisposição ao desenvolvimento de outras neoplasias, como tumores adrenais, tumores carcinóides, angiofibromas faciais, colagenomas, lipomas, feocromocitomas e meningiomas (DONG et al., 1997; MARX et al., 1999; ASGHARIAN et al., 2004).

Ao total, cerca de 20 tumores endócrinos e não endócrinos encontram-se no painel de possíveis tumores que podem estar associados a NEM1 (Tabela 1). Devido a ampla

variabilidade de tumores e manifestações clínicas, a NEM1 é hoje considerada uma doença complexa e multi-sistêmica (MARX, 2005).

Tabela 1: Manifestações clínicas da NEM1 com estimada penetrância média em adultos.

Manifestações Endócrinas	Manifestações Não-endócrinas
Adenoma de paratireóide (90%)	Lipoma (30%)
Tumores Enteropancreáticos (35%):	
<i>Gastrinoma*</i> (40%)	
<i>Insulinoma</i> (10%)	Angiofibroma facial (85%)
<i>Não-funcionantes*</i> , incluindo <i>PPoma</i> (20%)	Colagenoma (70%)
<i>Outros: Glucagonoma*</i> , <i>VIPoma*</i> , <i>Somatostinoma*</i> (2%)	
Adenomas Hipofisários (20-40%):	
<i>Prolactinoma</i> (70%)	
<i>Co-secretoras</i> (10%)	
<i>Somatotropina</i> (9%)	Leiomioma (10%)
<i>Não-funcionante</i> (20%)	
<i>ACTHoma</i> (4%)	
<i>THSoma</i> (raro)	
Tumores Carcinóides:	
<i>Tímico*</i> (2%)	Meningeoma (5%)
<i>Brônquico*</i> (2%)	Ependimoma (1%)
<i>Gástrico*</i> (10%)	
Cortéx Adrenal NF (25%)	
Feocromocitoma (<1%)	

¹ NF, não-funcionante; *potencialmente maligno; PP, polipeptídeo pancreático.

² Penetrância aos 40 anos de idade.

Fonte: Baseado em Brandi et al., 2001; Verges et al., 2002 e Marx, 2005.

1.5 Seguimento Clínico na NEM1

O seguimento clínico periódico para casos com NEM1, segundo o Consenso sobre NEMs, deve ser iniciado entre 5-20 anos de idade, sendo recomendado para todos os casos diagnosticados com NEM1 e também para seus familiares potencialmente sob-risco (BRANDI et al., 2001; THAKKER et al., 2012). Este seguimento envolve dosagens hormonais anuais e exames de imagem em intervalos de acordo com o tumor em questão, sendo um processo trabalhoso e que envolve altos custos (Tabela 2) (THAKKER et al., 2012). Por outro lado, o seguimento clínico é capaz de auxiliar no aumento da qualidade de vida dos pacientes e reduzir a morbi-mortalidade nestes pacientes (TEH et al., 1998).

Tabela 2: Protocolo de rastreamento bioquímico e radiológico em indivíduos com alto risco de desenvolvimento de NEM1 ou pacientes com NEM1.

Tumor	Início do Rastreamento (Idade em anos)	Testes Bioquímicos (Anuais)	Exames de Imagem (Intervalo de tempo)
Paratireóide	8	Cálcio, PTH	Nenhum
Tumores enteropancreáticos			
Gastrinoma	20	Gastrina (\pm pH gástrico)	Nenhum
Insulinoma	5	Glicemia em jejum, Insulina	Nenhum
Outros TEPs	< 10	Cromogranina A, Polipeptídeo pancreático, Glucagon, VIP	RM, TC ou EE (anual)
Adenomas Hipofisários	5	Prolactina, IGF-1	RM (a cada 3 anos)
Adrenais	< 10	Nenhum (exceção: sintomas e sinais de tumor funcionante e/ou tumor >1cm)	RM ou TC (anual com imagem de pâncreas)
Carcinóides Tímicos e Brônquicos	15	Nenhum	TC ou RM (a cada 1-2 anos)

RM: Resonância magnética; TC: tomografia computadorizada; EE: ultrassom endoscópico.

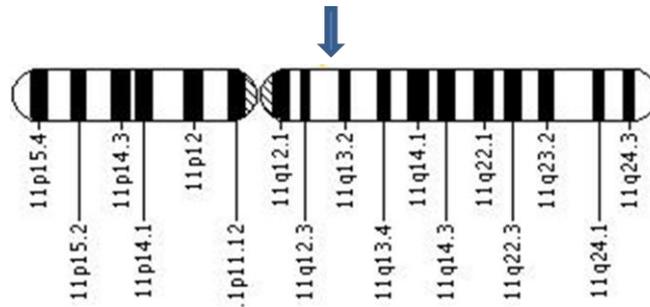
Fonte: Thakker et al., 2012.

1.6 Aspectos da genética molecular na NEM1

A NEM1 é uma síndrome hereditária, com transmissão autossômica dominante de alta penetrância (95% aos 40 anos), causada por uma mutação que inativa o gene *MEN1*, que é um gene supressor tumoral (VARMUS, 1984; BRANDI et al., 1987; THAKKER et al., 1993; BROWN; SOLOMON, 1997; MARX et al., 1998).

Em 1988, a localização do gene responsável pela NEM1 foi mapeada no braço longo do cromossomo 11, região 1, sub-região 3 (11q13) (Fig.1; LARSSON et al., 1988). Os mesmos autores também demonstraram a perda de heterozigosidade (LOH) deste locus, sugerindo então que NEM1 era decorrente de um gene supressor de tumores e não de um oncogene, o que é consistente com a hipótese de desenvolvimento tumoral elaborada por Knudson (KNUDSON, 1971). Em 1997, o gene *MEN1* foi clonado e sequenciado por dois consórcios independentes (CHANDRASEKHARAPPA et al., 1997; LEMMENS et al., 1997).

Figura 1: Localização do gene *MEN1* no cromossomo 11 (11q13).



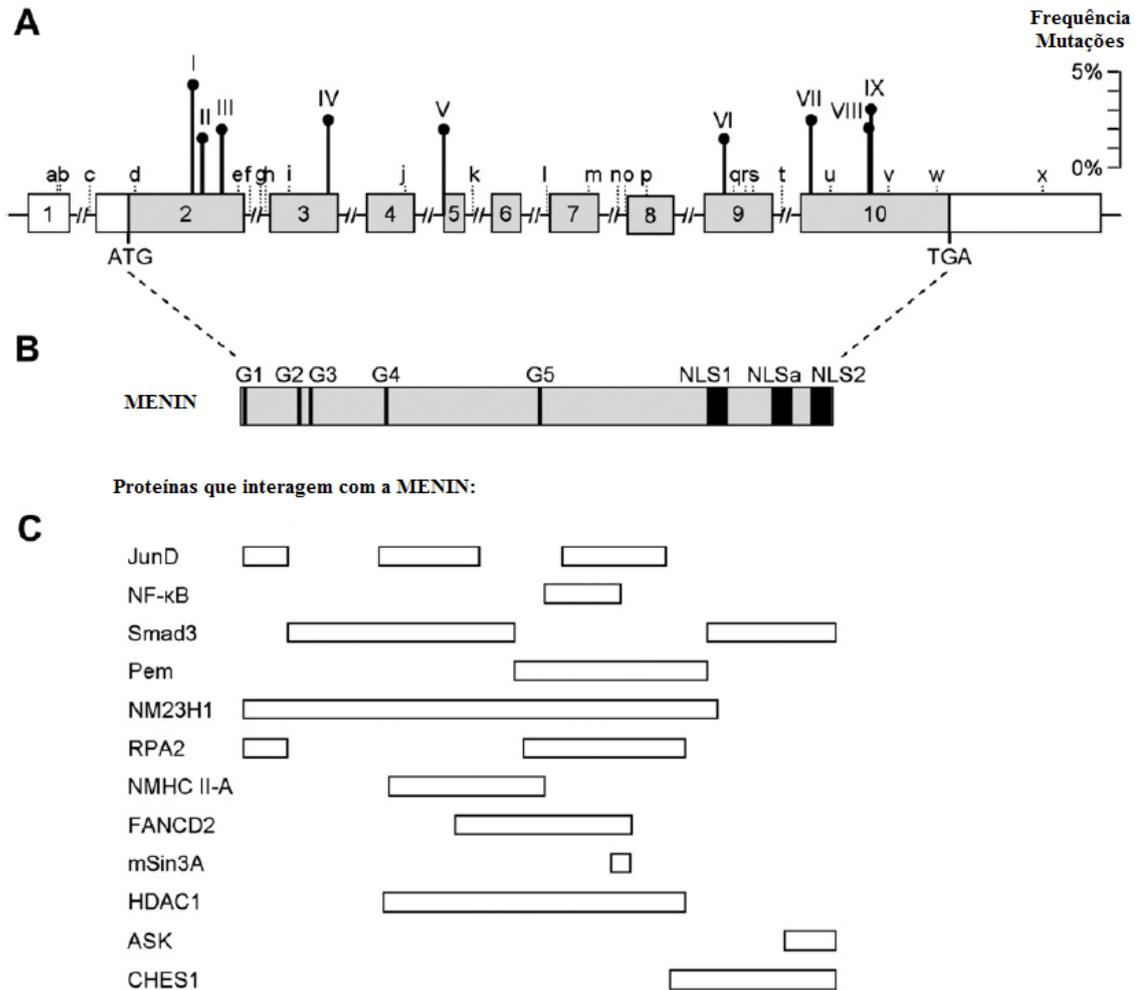
O gene *MEN1* possui 9,2 Kb e consiste de 10 exons (o exon 1 e 832 bases do exon 10 não são traduzidos), codificando uma proteína que contém 610 aminoácidos, denominada MENIN (CHANDRASEKHARAPPA et al., 1997; LEMMENS et al., 1997).

1.6.1 Mutações e polimorfismos no gene *MEN1*

Mais de 1.000 mutações germinativas (consistindo em 459 mutações diferentes) e em torno de 200 mutações somáticas (consistindo em 167 mutações diferentes) já foram identificadas em famílias com NEM1 (LEMOS; THAKKER, 2008). Essas mutações encontram-se distribuídas ao longo de todo o gene, tanto na região codificadora (1830bp) como em regiões intrônicas (Fig. 2).

As mutações, que incluem deleções, inserções, *missense* ou *nonsense*, são inativadoras, resultando em uma proteína truncada ou com comprometimento funcional (THAKKER, 2004). Aproximadamente 23% são mutações *nonsense*, em torno de 41% são deleções ou inserções *frameshift*, 6% deleções ou inserções *in-frame*, 9% mutações *splice-site*, 20% mutações *missense*, e 1% grandes deleções (LEMOS; THAKKER, 2008). Mutações *nonsense* são mutações pontuais que inserem um sinal precoce de parada da transcrição no códon mutado, enquanto que mutações *missense* são mutações pontuais que alteram somente um aminoácido. Mutações do tipo *frameshift* são mutações de mudança no quadro de leitura transcricional (deleções ou inserções), que alteram a sequência de aminoácidos sintetizados e também podem inserir um sinal precoce de parada da transcrição, enquanto que mutações *in-frame* são mutações que não alteram o quadro de leitura da proteína. Já as mutações do tipo *splice-site* são mutações nas regiões de junção exon-intron, podendo resultar em alterações na transcrição.

Figura 2: Representação esquemática da organização genômica do gene *MEN1*, a proteína por ele codificada (MENIN) e as regiões de interação com outras proteínas.



A. Gene *MEN1*. A região codificadora de 1.83Kb está representada em cinza. As numerações indicam mutações frequentes (Tabela 3) e as letras indicam polimorfismos (Tabela 4). A escala mostra a frequência dessas mutações. **B.** Proteína MENIN representada com os três NLSs (NSL1, NSLa, NSL2) e cinco sítios putativos de GTPase (G1 a G5). **C.** Regiões de ligação da MENIN com diferentes proteínas (caixa aberta).

Fonte: Lemos e Thakker, 2008.

As mutações descritas não envolvem áreas específicas (*hot spots*) do gene, tornando a avaliação mutacional de pacientes com NEM1 complexa, uma vez que envolve todo o gene. No entanto, tem sido observada, em famílias distintas, a ocorrência repetida de algumas mutações (Fig. 2 e Tabela 3). Essas mutações, localizadas em nove sítios diferentes do gene *MEN1*, são responsáveis por mais de 20% de todas as mutações germinativas. Dessas, cinco são mutações *frameshift* envolvendo os códons 83 e 84 (nt359del4), 120 (Lys[K]120del), 210 a 211 (nt738del4), e códons 514 a 516 (nt1657-7del or ins C); uma é do tipo *splice-site* no intron 4; e três são mutações *nonsense* (Arg98Stop, Arg415Stop e Arg460Stop) (TURNER et al., 2002; LEMOS; THAKKER, 2008).

Tabela 3: Mutações germinativas mais frequentes no gene *MEN1*.

Mutação ¹	Mudança na Sequência de DNA ²	Exon	Códon	Efeito Predito ³	Frequência (%)
I	c.249_252delGTCT	2	83-84	fs	4.5
II	c.292C>T	2	98	ns, Arg98Stop	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, Arg415Stop	1.5
VII	c.1378C>T	10	460	ns, Arg460Stop	2.6
VIII	c.1546delC	10	516	fs	1.8
IX	c.1546_1547insC	10	516	fs	2.7

¹ Números como descrito na Fig.2.

² Mutações numeradas em relação a sequência referência do cDNA do gene *MEN1* (NM_130799.1).

³ fs, frameshift; ns, nonsense mutation; sp, splice-site mutation; if, in-frame mutation.

Fonte: Lemos e Thakker, 2008.

Aproximadamente em 70-90% dos casos hereditários são encontradas mutações no gene *MEN1* (MARX, 2005). A ausência de mutações nos outros 10-30% decorre, provavelmente, da presença de mutações fora da região codificadora do gene; presença de grandes deleções, que impossibilitam a amplificação do alelo mutado; ou mesmo variação de sensibilidade dos métodos laboratoriais empregados para análise (CAVACO, 2002). É estimado que cerca de 10% das mutações germinativas no gene *MEN1* são mutações *de novo* e podem ser passadas para gerações futuras. (HOFF; HAUACHE, 2005).

Vários estudos de diversas famílias portadoras de NEM1 e de tumores esporádicos permitem afirmar que não existe correlação genótipo-fenótipo em NEM1 (AGARWAL et al., 1997; BASSETT et al., 1998; GIRAUD et al., 1998; TEH et al., 1998; SCHUSSHEIM et al., 2001; WAUTOT et al., 2002). Famílias com manifestações clínicas muito semelhantes não possuem a mesma mutação e, da mesma forma, famílias com a mesma mutação não demonstram manifestações clínicas específicas àquela mutação.

Existe descritos, um total de 24 diferentes polimorfismos no gene *MEN1*. Desses, 12 se localizam na região codificadora (10 sinônimos e 2 não sinônimos), 9 em regiões intrônicas e 3 em regiões não transcritas (Fig. 2 e Tabela 4) (LEMO; THAKKER, 2008). É importante reconhecer a ocorrência desses polimorfismos, uma vez que devem ser diferenciados das mutações ao se realizar uma análise para diagnóstico genético, além de também poderem, ocasionalmente, ajudar na análise de segregação em famílias nas quais uma mutação no gene *MEN1* não tenha sido identificada (THAKKER, 2010).

Tabela 4: Polimorfismos do gene *MEN1*.

Polimorfismo ¹	Mudança na Sequência de DNA ²	Exon	Mudança de Códon	Frequência Alélica ³
a	c.-533T>A	1	-	0.32
b	c.-533T>C	1	-	0.12
c	c.-39C>G	Intron 1	-	0.20
d	n/a	2	Leu10Leu	n/a
e	c.435C>T	2	Ser145Ser	0.01
f	c.445p183G>A	Intron 2	-	0.05
g	c.446-127A>T	Intron 2	-	n/a
h	c.446-58C>T	Intron 2	-	0.01
i	c.512G>A	3	Arg171Gln	0.01
j	c.768T>C	4	Leu256Leu	0.01
k	c.824p31T>C	Intron 5	-	n/a
l	c.913-3C>G	Intron 6	-	0.02
m	c.1026G>A	7	Ala342Ala	0.01
n	c.1050-92C>T	Intron 7	-	0.03
o	c.1050-3C>G	Intron 7	-	0.02
p	c.1101A>C	8	Val367Val	n/a
q	c.1254C>T	9	Asp418Asp	0.42
r	c.1296G>A	9	Leu432Leu	0.01
s	c.1299T>C	9	His433His	0.01
t	c.1350p103G>C	Intron 9	-	0.42
u	c.1434C>T	10	Gly478Gly	n/a
v	c.1621G>A	10	Ala541Thr	0.04
w	c.1764G>A	10	Lys588Lys	n/a
z	c.1833*305_1833*307delCTC	10	-	0.05

¹ Letras como descrito na Fig.2.

² Polimorfismos numerados em relação a sequência referência do cDNA do gene *MEN1* (NM_130799.1).

³ Frequência apresentada no artigo que primeiro descreveu o polimorfismo. n/a, informação não disponível.

Fonte: Lemos e Thakker, 2008.

1.6.2 A Proteína MENIN

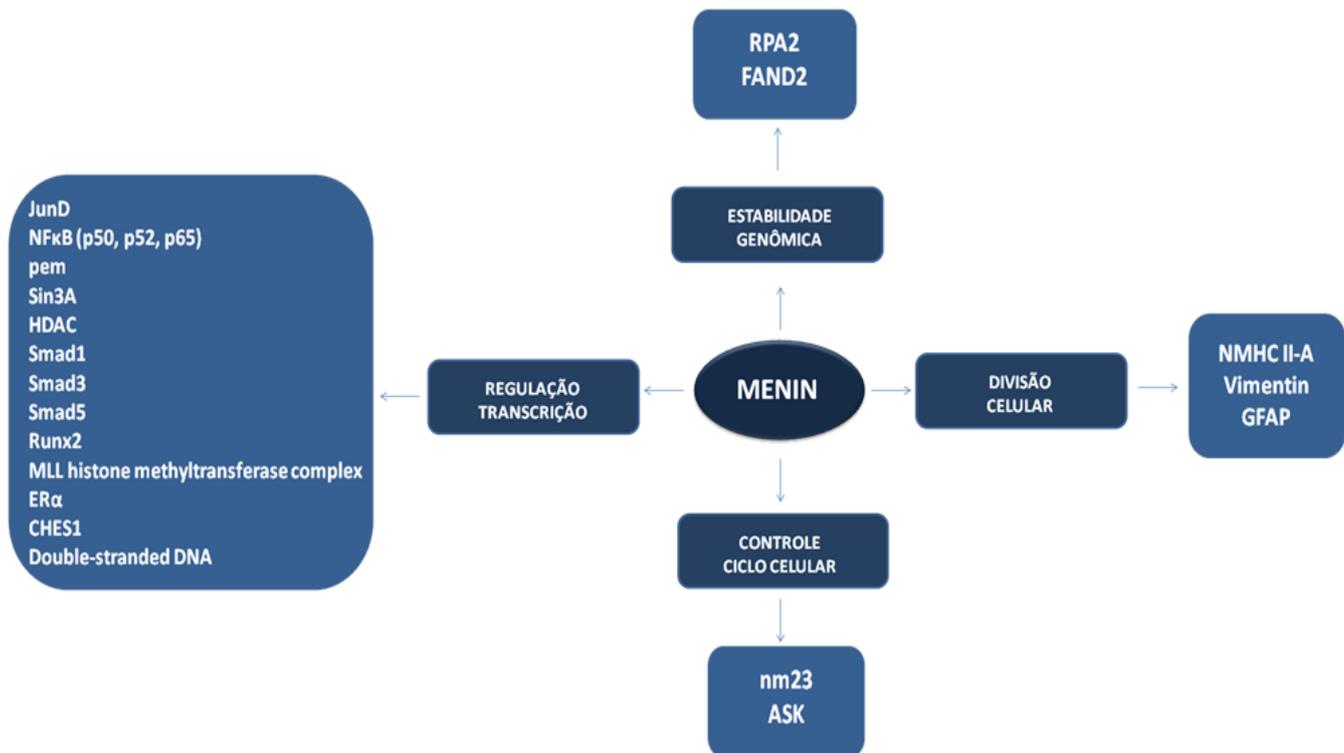
As mutações inativadoras no gene *MEN1* estão associadas ao desenvolvimento de tumores endócrinos pela inativação da proteína supressora tumoral MENIN, que está envolvida em processos celulares importantes, como: atuação no ciclo celular e controle de crescimento celular, regulação da transcrição gênica, reparo de DNA, estabilidade genômica, regulação da apoptose e proliferação de células endócrinas (AGARWAL et al., 2005; BALOGH et al., 2006; LEMOS; THAKKER, 2008).

Análises iniciais *in silico* da sequência de aminoácidos da proteína MENIN revelaram que ela não possui homologia com nenhuma outra proteína conhecida, sequência *motif* ou peptídeo sinal, dessa forma sua função putativa não pode ser deduzida. No entanto, estudos de localização subcelular mostraram que a MENIN é uma proteína predominantemente nuclear, apresentando pelo menos três sinais de localização nuclear (NLS) no seu segmento C-terminal (GURU et al., 1998; LA et al., 2006), e estudos de interação proteína-proteína revelaram interações da MENIN com várias proteínas envolvidas em diversos processos celulares essenciais (AGARWAL et al., 2005; LEMOS; THAKKER, 2008) (Fig.2 e Fig.3).

Dessa forma, na regulação da transcrição, a MENIN tem mostrado interagir diretamente com o fator de transcrição JunD, inibindo a ativação da transcrição gênica mediada por JunD (AGARWAL et al., 1999). Além disso, tem sido relatado a interação de MENIN com o supressor de metástase tumoral NM23H1/nucleosídeo difosfato quinase (OHKURA et al., 2001) e com membros da família SMAD (SMAD3 e SMAD 1/5) na inibição da via sinalizadora de TGF- β (KAJI et al., 2001).

Outros estudos demonstraram que a MENIN também interage com outras proteínas como NF- κ B, RPA2, FANCD2, GFAP, Vimentina e RUNX2, porém o papel fisiológico destas interações ainda não foi totalmente esclarecido e ainda não foi possível estabelecer a sinalização intracelular de MENIN em tecidos normais ou tumorais (HEPPNER et al., 2001; LOPEZ-EGIDO et al., 2002; JIN et al., 2003; AGARWAL et al., 2004; SOWA et al., 2004). As mutações em *MEN1* resultam principalmente em formas truncadas da proteína MENIN com ausência dos sítios NLS ou ligação alterada com JunD (PANNETT; TRAKKER, 1999).

Figura 3: Funções da proteína MENIN através de suas interações com outras proteínas e moléculas.



Fonte: Modificado de Thakker, 2010.

1.6.3 Tumorigênese na NEM1

O desenvolvimento clássico de tumores em pacientes com NEM1 ocorre por uma sequência de dois eventos mutacionais. O primeiro evento refere-se a mutação que é herdada (mutação germinativa no gene *MEN1*), que predispõe o genoma a um segundo evento mutacional em glândulas associadas a NEM1 (mutação somática), causando perda de heterozigidade (Loss of Heterozygosity - LOH) do locus 11q13. Esses eventos culminam com a inativação da MENIN, interferindo em suas vias moleculares de supressão tumoral, levando a tumorigênese na NEM1 (AGARWAL et al., 2005), modelo consistente com a hipótese “two-hit” elaborada por Knudson para genes supressores tumorais (PANNET; THAKKER, 2001).

Esse processo de tumorigênese a partir de dois eventos mutacionais explica porque um indivíduo que herda uma mutação germinativa possui uma maior predisposição aos tumores NEM1-relacionados. Esses indivíduos apresentam tumores em faixas etárias mais baixas que

os casos esporádicos de NEM1, nos quais os tumores se desenvolvem somente após ocorrerem duas mutações somáticas (AGARWAL et al., 1997; MARX, 2005).

1.6.4 Análise mutacional do gene *MEN1* na prática clínica

A análise mutacional do gene *MEN1* na prática clínica é útil por diversos fatores, como: a) confirmação do diagnóstico clínico; b) identificação de parentes que possuam mutações no gene *MEN1*, como forma de “screening” para detecção de tumores em estágio inicial e início de tratamento apropriado; c) identificação dos parentes que não carregam uma mutação germinativa, para serem tranquilizados em relação ao desenvolvimento de futuros tumores (THAKKER et al., 2012). Esse último aspecto também é relevante no que diz respeito à diminuição de custos, em serviços de saúde, uma vez que esses pacientes seriam submetidos, desnecessariamente, a investigações bioquímicas e radiológicas (Tabela 2) (NEWY; THAKKER, 2011).

1.6.5 Outros genes possivelmente envolvidos na NEM1

O gene *MEN1* é o principal gene associado à Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1, apesar disso, não são encontradas mutações em 10-30% dos casos hereditários, possivelmente por questões aqui explicadas anteriormente (CAVACO, 2002).

Mais recentemente, entretanto, tem-se sugerido que essa ausência de mutações no gene *MEN1* em alguns pacientes com NEM1, seria causada por uma heterogeneidade molecular dessa doença. Pellegata et al. (2006) relataram uma família com três gerações com NEM1 e que não apresentava mutação no gene *MEN1*, na qual foi identificada uma mutação germinativa no gene *p27(kip1)/CDKN1B*.

O gene *p27(kip1)/CDKN1B*, localizado no braço curto do cromossomo 12, região 1, sub-região 3 (12p13) contém 3 exons, codificando uma proteína inibidora de quinase dependente de ciclina, reguladora de processos envolvidos no ciclo celular.

Estudos funcionais mostraram que a expressão gênica de *p27(kip1)/CDKN1B* é regulada pela proteína MENIN (codificada pelo gene *MEN1*), por associação com RNA polimerases e metil-transferases (KARNIK et al., 2005; FONTANIERE et al., 2006). A ausência de MENIN leva a baixa expressão de *p27(kip1)/CDKN1B*, enquanto que a elevação nos níveis de *MEN1*, recompõe a expressão de *p27(kip1)/CDKN1B*. Dessa forma, algumas

manifestações clínicas de pacientes com NEM1 podem estar possivelmente reguladas pela interação entre as proteínas/genes *MENIN* e *p27*.

Um outro gene recentemente associado a susceptibilidade a tumores hipofisários familiares é o gene *AIP* (aryl hydrocarbon receptor interacting protein). Esse gene está localizado no braço longo do cromossomo 11, região 1, subregião 3.3 (11q13.3), contém 6 éxons, distanciando de 3Mb do gene *MEN1*.

Mutações germinativas nesse gene foram identificadas em famílias com tumores hipofisários secretores de hormônio de crescimento (GH) e/ou prolactina (PRL) (VIERIMAA et al., 2006). Foi relatada perda de heterozigose (LOH) nesses tumores, sugerindo um papel supressor tumoral do *AIP*. Casos clinicamente diagnosticados com NEM1, entretanto sem mutação no gene *MEN1*, também foram relatados apresentar mutação germinativa no gene *AIP* (GEORGITSI et al., 2007).

1.7 Justificativa

A NEM1 é uma doença complexa e heterogênea, com diversos questionamentos ainda não elucidados. O estudo em diferentes populações é importante para o conhecimento de características da doença naquela população, uma vez que a prevalência e o perfil mutacional diferem em diferentes populações estudadas.

Em nossa população, esse estudo é pioneiro, sendo o primeiro estudo realizado na região Nordeste do perfil molecular do gene *MEN1* em pacientes portadores de Neoplasia Endócrina Múltipla tipo I. Vale ressaltar que o número de pacientes acompanhados no Serviço de Endocrinologia do HUWC/UFC está entre os maiores relatados no Brasil, enfatizando a relevância do estudo nesse grupo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar o perfil clínico e molecular de pacientes portadores de Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1.

2.2 Específicos

- Acompanhar os pacientes com diagnóstico de NEM1 do SED–HUWC conforme protocolo de seguimento clínico proposto tendo como base as recomendações científicas atuais.
- Identificar as mutações germinativas (perfil molecular/gênico) no gene *MEN1* em pacientes portadores de NEM1, a partir de amostras de sangue periférico.
- Analisar as correlações entre o perfil gênico encontrado (mutações) e o perfil clínico observado dos pacientes, como tipo e frequência dos tumores, agressividade e malignidade dos tumores e resposta ao tratamento farmacológico instituído (quando aplicável).
- Analisar por PCR em tempo real o nível de expressão do gene *MEN1*, a partir de amostras de sangue periférico, nos pacientes estudados e em grupo controle, a fim de buscar relação com os diferentes padrões de mutações observados.

3 PACIENTES

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo, com protocolo COMEPE nº 192/11, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, dentro das normas expressas pela Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares (Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde). Os pacientes receberam informações sobre a importância da pesquisa e conforme aceitação assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) por escrito. O TCLE está descrito no Anexo A.

3.2 Pacientes portadores de NEM1

Os pacientes selecionados para o estudo encontram-se cadastrados em protocolo de acompanhamento clínico no Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (SED-HUWC).

Um total de 8 famílias e 2 casos esporádicos foram estudados, perfazendo um total de 33 pacientes com NEM1, sendo 31 NEM1 familiar e 2 NEM1 esporádico (27 mulheres, 6 homens, idade média $40,7 \pm 12,7$ anos e com idades variando entre 9-65 anos). Todos os pacientes foram clinicamente diagnosticados pelo grupo clínico do SED-HUWC, de acordo com critérios do Consenso para NEM1 (BRANDI et al., 2001).

3.3 Voluntários Controle

Foram incluídas amostras de DNA de 10 voluntários controle, de ambos os sexos, sem histórico de tumores neuroendócrinos na família e com idades variando de 19 a 45 anos (média de $29,44 \pm 10,0$).

Para os estudos de expressão do gene *MEN1* foram incluídas amostras de RNA de sangue periférico coletadas de 15 voluntários controle, de ambos os sexos, sem histórico de tumores neuroendócrinos na família.

4 MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Foram coletados 4 ml de sangue periférico, através de punção venosa periférica, para extração de DNA e RNA dos pacientes portadores de NEM1 e dos voluntários controle. As amostras foram coletas em tubos de coleta contendo EDTA 25 mM, pH 8.0; um anticoagulante quelante de íons cálcio.

4.2 Procedimentos Laboratoriais / DNA

4.2.1 Extração de DNA

O DNA das 43 amostras coletadas de sangue periférico foi isolado utilizando o sistema de extração de DNA QIAamp DNA Blood Mini Kit da QIAGEN®, conforme descrito a seguir:

1. Após coleta, as amostras foram homogeneizadas e transferidas para tubos falcon de 15 mL.
2. Foram centrifugadas a 3.500 rpm por 15 min. (temp. ambiente), afim de separar a camada intermediária de leucócitos (*buffy coat*).
3. O *buffy coat*, 200 µL (ou 400 µL) foi transferido para um tubo eppendorf de 1.5 mL.
4. Foi então adicionado 20 µL (ou 40 µL) da Qiagen Protease, homogeneizado e adicionado 20 µL de RNase A (20 mg/mL).
5. À cada amostra foi adicionado 200 µL (ou 400 µL) do tampão AL, homogeneizado por pulso em vortex (15s) e incubado a 56°C por 10min.
6. Após incubação, as amostras foram centrifugadas rapidamente (*spin*) e adicionadas de 200 µL (ou 400 µL, de acordo com o volume inicial) de etanol absoluto.
7. Foram homogeneizadas por “up and down” e transferidas para uma coluna QIAmp Mini Spin (em um tubo de coleta de 2 mL).
8. Foram centrifugadas a 14.500 rpm por 1 min. Após, o tubo de coleta com o filtrado foi descartado e a coluna colocada em um novo tubo de coleta de 2 mL.
9. Quando necessário, o passo anterior foi repetido até transferência completa de todo o volume (600 µL por transferência).

10. À coluna foi adicionado 500 µL do tampão AW1. Centrifugado a 14.500 rpm por 1 min.
11. Em seguida, o filtrado foi descartado e a coluna colocada em um novo tubo de coleta.
12. À coluna foi adicionado 500 µL do tampão AW2. Centrifugado a 14.500 rpm por 3 min.
13. Novamente, o filtrado foi descartado e a coluna colocada em um novo tubo de coleta.
14. O tubo com a coluna foi centrifugado a 14.500 rpm por 1 min., para garantir a completa remoção do tampão AW2.
15. O tubo de coleta foi então descartado e a coluna transferida para um tubo de 1.5 mL novo. Foi adicionado ao centro da mesma, 200 µL do tampão AE.
16. As amostras foram incubadas por 5min a temperatura ambiente e então centrifugadas a 12.000 rpm por 1 min.
17. A resuspensão foi repetida em um novo tubo de 1,5 mL sobre as mesmas condições anteriores.
18. As amostras foram congeladas a -20°C.

A integridade das moléculas de DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. A concentração das amostras de DNA foi obtida por espectrofotometria em equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.2.2 Amplificação do gene *MEN1*

Os nove exons da sequência codificante do gene *MEN1* (exons 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) foram amplificados através da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR. (MULLIS; FALOONA, 1987). Os *primers* utilizados na reação (HAI et al., 1999) estão listados abaixo (Quadro 3).

Quadro 3: *Primers* utilizados no estudo, constando: o exon em questão, as sequências *forward* e *reverse* dos *primers* e o tamanho esperado do amplicon.

Exon	Primer Forward	Primer Reverse	Tamanho do Amplicon (pb)
2	AAGCAGGGGAGCTGTGCGTGT	CACCTGCCGAACCTCACAAGG	685
3	TCACTACCTGGCCCCTTTCCC	TGGAGTCCCTTGGGTGGCTTG	346
4	CCCTGAAGCAGGCACAGGGTG	CTGCCCAGGGTCCCACAGCAA	256
5+6	CCACCTCTGCCCCGATAGGCTA	CTCATCTGCCCAGATGAGGGC	362
7	CATTTGTGCCAGCAGGGCAGC	TGGACGAGGGTGGTTGGAAAC	274
8	CTGGGGCTACCCCCGATGGTG	CCATGGCCCTGTGGAAGGGAG	268
9	CTGGCCTGTGCCCTCTGCTAA	AAAGTCTGACAAGCCCGTGGC	302
10	TTCGGTGCCGATGGGACTGAG	GGGCTCAGAGTTGGGGGACTA	666

Fonte: Hai et al., 1999.

As reações foram realizadas em um volume total de 50 μ L e otimizadas sob as seguintes condições: 0.2 mM de cada dNTP, 0.4 μ M cada oligonucleotídeo iniciador, 1.5 mM de cloreto de magnésio, 1.0 U da enzima *Taq* DNA Polimerase, tampão proprietário 1X da enzima (200 mM Tris-HCl – pH 8,4, 500 mM KCl), 200 ng de DNA e água ultrapura (livre de nucleases, q.s.p.).

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Mastercycler Eppgradient S (Eppendorf, USA) utilizando as seguintes condições iniciais de termociclagem: um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 5 min.; seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min., 60°C por 1min e 72°C por 1 min., seguido de uma extensão final de 72°C por 10 min. Tais condições foram padronizadas para cada par de *primers*, com alterações nas temperaturas de desnaturação e anelamento dos *primers*, número de ciclos de repetição e tampão utilizado (Tabela 7).

A verificação das bandas amplificadas foi realizada através de corridas eletroforéticas (cuba BioRad Sub-Cell GT) em géis de agarose 1%, corados com brometo de etídeo e visualizadas em transluminador. UV.

O registro dos géis foi feito através de fotodocumentação digital no ImageQuant 300 (GE, USA), que permite verificar a qualidade e intensidade das ampliações obtidas; além da confirmação do tamanho correspondente ao esperado.

4.2.3 Sequenciamento do gene *MEN1*

4.2.3.1 Purificação dos produtos da PCR

Após amplificação e confirmação da especificidade por eletroforese em gel de agarose, os produtos da PCR foram purificados com isopropanol/etanol, quantificados e submetidos à reação de sequenciamento. O protocolo de purificação utilizado foi:

1. Após PCR, foi adicionado a cada amostra 162 μL de Isopropanol 75% aos 45 μL de produto de PCR.
2. As amostras foram homogeneizadas por “up and down” e deixadas a temperatura ambiente por 20 min.
3. Foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 25 min. a 4°C.
4. Em seguida, o sobrenadante foi descartado invertendo o tubo. Ao precipitado foi adicionado 360 μL de Etanol 70% em cada amostra.
5. Os tubos foram homogeneizados por inversão dos mesmos e então centrifugados a 14.000 rpm por 10 min. a 4°C.
6. O sobrenadante foi então descartado invertendo o tubo. O precipitado foi deixado à temperatura ambiente para evaporação do álcool restante.
7. O precipitado de DNA foi então resuspendido em 30 μL de água ultrapura, homogeneizado por pulsos no vortex, seguido de *spin*.
8. As amostras foram quantificadas em NanoDrop e então congeladas a -20°C.

4.2.3.2 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento consistiu na utilização de um *primer* (*forward* ou *reverse*), um kit contendo dNTPs, terminais fluorescentes ddNTPs e tampão de sequenciamento, numa reação submetida a ciclos de termociclagem (desnaturação, anelamento e extensão). O kit utilizado foi o BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, CA). Os *primers* utilizados foram os mesmos utilizados na PCR.

As reações de sequenciamento foram realizadas para um volume final de 10 μL contendo: 0.5 μL do BigDye, 2.5 μL de tampão de sequenciamento 5X, 2 μL do primer forward ou reverse (2 μM), 1 μL do produto de PCR purificado, completando o volume final para 10 μL com água ultrapura (livre de nucleases).

As condições de termociclagem para a reação de sequenciamento foram: desnaturação inicial de 96°C por 1 min.; seguida de 40 ciclos de desnaturação a 96°C por 30s, anelamento do *primer* a 50 ou 60°C por 30s e extensão a 60°C por 4 min.

4.2.3.3 Reação de precipitação

Após a reação de sequenciamento os amplicons foram precipitados com isopropanol/etanol, para retirada dos terminais não incorporados, seguindo-se protocolo recomendado pelo fabricante (Applied Biosystems®), descrito a seguir:

1. A cada amostra foi adicionado 80 µL de Isopropanol 80% (preparado antes do uso).
2. A solução foi homogeneizada por “up and down” e deixada a temperatura ambiente por 15 min (protegido da luz).
3. A placa foi então centrifugada a 4.000 rpm por 45 min. a 4°C.
4. O sobrenadante foi a seguir descartado, invertendo a placa em papel absorvente. Um “spin” na centrifuga com a placa invertida foi aplicado para completa remoção do sobrenadante.
5. A cada amostra foi adicionado 100 µL de Etanol 70% (preparado antes do uso).
6. A placa foi então centrifugada a 4.000 rpm por 15 min. a 4°C.
7. O sobrenadante foi então descartado, invertendo a placa em papel absorvente. Um “spin” na centrifuga com a placa invertida foi aplicado para completa remoção do sobrenadante.
8. Os passos 5 a 7 foram repetidos.
9. O precipitado foi então secado em termociclador a 95°C por 30s.
10. A seguir, as amostras foram resuspendidas em 20 µL de Formamida HiDi e homogeneizada por “up and down”.
11. As amostras na placa foram então desnaturadas no termociclador a 95°C por 2 min. e colocadas no gelo por 2 min.
12. Ao final, as placas foram levadas para o sequenciador.

4.2.3.4 Sequenciamento automático

Após a purificação, como descrito no protocolo acima, as amostras foram resuspendidas em 20 µL de Formamida e desnaturadas por um processo que consistiu de 2 min a 95°C no termociclador, seguido de incubação em gelo por 2min., promovendo o choque térmico e a completa desnaturação.

Em seguida as amostras foram analisadas através de eletroforese capilar em sequenciador automático ABI-3100 Avant (Applied Biosystems, Foster City, USA), com 4 capilares.

4.2.3.5 Análise do sequenciamento

As análises dos eletroferogramas gerados após eletroforese capilar foram realizadas manualmente, com auxílio do software CondonCode Aligner® (CodonCode Corporation, USA), um programa de edição de sequências. Cada sequência foi conferida visualmente concatenando-a com a sequência do gene *MEN1* depositada no NCBI (GenBank NM_130799.2), a fim de se identificar as mutações. As amostras dos pacientes também foram comparadas com as amostras dos voluntários controle.

4.2.4 Identificação das mutações

A pesquisa por mutações foi feita, inicialmente, no caso-índice de cada família mais um membro familiar representativo. Foi considerado como caso-índice o primeiro paciente, dentro de cada família, a receber o diagnóstico clínico de NEM1 no SED-HUWC.

Após a identificação das mutações nos casos-índice (mais um familiar), os outros familiares também foram analisados quanto à presença dessas mutações. Os casos esporádicos foram analisados individualmente.

O software CondonCode Aligner® (CodonCode Corporation, USA) foi utilizado para auxiliar na identificação das mutações.

As mutações foram numeradas em relação à sequência referência de cDNA do gene *MEN1* (número de acesso no GenBank NM_130799.2), onde o nucleotídeo +1 corresponde ao A do códon de início da transcrição ATG.

4.3 Análise in silico das mutações

O software SIFT (SIFT, 2013) foi utilizado para análise preditiva *in silico* das mutações identificadas no estudo. O programa analisa a homologia de sequências e as propriedades físico-químicas dos aminoácidos para prever se determinada alteração pode ser tolerável ou não.

4.4 Procedimentos laboratoriais / RNA

4.4.1 Extração de RNA

O RNA das amostras de sangue periférico foi isolado utilizando o kit de extração de RNA QIAamp RNA Blood Mini da QIAGEN®, conforme descrito a seguir:

1. Após coleta, foram homogeneizados 1,5mL de sangue total com 7,5mL do *Buffer EL* em um tubo falcon de 15mL;
2. As amostras foram incubadas por 15min no gelo, sendo vortexadas nos tempos de 5min e 10min;
3. Em seguida, foram centrifugadas a 2250rpm/10min/4°C e o sobrenadante descartado;
4. Foram adicionados 3mL do *Buffer EL* e as células resuspendidas vortexando gentilmente;
5. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo por 5min e centrifugadas a 2250rpm/10min/4°C. O sobrenadante foi descartado;
6. Foram então adicionados 600µL do *Buffer RLT* com β-mercaptoetanol (10µL de β-mercaptoetanol 14,3M/1mL *Buffer RLT*) e as amostras vortexadas para homogeneização;
7. O lisado foi pipetado diretamente em uma coluna QIAshredder spin (em um tubo de coleta de 2mL) e centrifugado por 2min em velocidade máxima (20000rpm). A coluna foi então descartada e o precipitado salvo no tubo;
8. Em seguida, foram adicionados 600µL de etanol 70% ao precipitado e homogeneizado por “up and down”;

9. Esse homogeneizado foi pipetado em uma nova coluna QIAamp spin (em um tubo de coleta de 2mL) e centrifugado a 12000rpm/15s.;

*Volume máximo de carregamento é 700µL. Se exceder, carregar sucessivas vezes.

10. Após a centrifugação, o tubo de coleta foi descartado e a coluna colocada em novo tubo de 2 mL;

11. Foi então adicionado 300µL do *Buffer RWI* à coluna QIAamp spin e centrifugado a 12000rpm/15s.;

12. O precipitado foi descartado. Na coluna foi pipetado 80µL do mix de DNase I (10µL de DNase I stock solution em 70µL do *Buffer RDD*) e deixado a temperatura ambiente por 15 min;

13. Em seguida, foi adicionado 350µL do *Buffer RWI* à coluna QIAamp spin e centrifugado a 12000rpm/15s. O precipitado foi descartado;

14. Foi pipetado à coluna 500µL do *Buffer RPE* e então centrifugado a 12000rpm/15s. O tubo de coleta foi descartado;

15. A coluna foi colocada em novo tubo de 2 mL e centrifugada a 14500/1min para completa remoção do *Buffer RPE*;

16. Após a centrifugação, a coluna QIAamp spin foi transferida para tubo de 1,5mL, onde foi então pipetado 35µL de água RNase-free e centrifugado a 12000rpm/1min;

17. A ressuspensão foi repetida em novo tubo de 1,5 mL, pipetando 30µL de água RNase free.e centrifugando a 12000rpm/1min;

18. As amostras foram congeladas a -70°C.

Após a extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® pela absorbância a 260nm. O grau de pureza do RNA foi avaliado pela relação 260/280nm.

4.4.2 PCR em tempo real (RT-PCR)

Após extração e quantificação, o RNA extraído foi convertido em cDNA pela reação de transcriptase reversa. Para tal reação foi utilizada a enzima iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad®). O protocolo de síntese seguiu as recomendações do fabricante.

O cDNA foi, então, submetido a reação de PCR em tempo real (RT-PCR), afim de se avaliar diferenças de expressão no gene *MEN1*, nas diferentes amostras estudadas.

As reações foram realizadas no equipamento iQ5 (BioRad®), utilizando o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®), conforme recomendado pelo fabricante.

Os oligonucleotídeos (primers) utilizados na reação foram desenhados utilizando o programa OligoPerfect™ Designer (Invitrogen®) e encontram-se listados abaixo (Quadro 4). Como controle endógeno o gene GAPDH (NM_002046) foi utilizado.

Quadro 4: Oligonucleotídeos utilizados no estudo de expressão do gene *MEN1*, constando: gene em questão, sequência dos iniciadores e o tamanho esperado.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Tamanho Amplicon (pb)
MEN1	ACCCTCTACCACAAGGGCATT	ACAGTGGTAGCCAGCCAGGTA	90
GAPDH	CATCATCCCTGCCTCTACTGG	TTCTAGACGGCAGGTCAGGTC	136

As reações foram conduzidas utilizando as seguintes condições de termociclagem: 95°C por 10 min.; seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg.; 62°C por 1 min.; seguido da curva de dissociação de 67 ciclos de 62°C a 95°C por 10 seg.; variando a temperatura em 0,5°C por ciclo.

Os valores quantitativos foram obtidos pelos valores de C_T (“threshold cycle”), no qual o aumento do sinal associado à fase exponencial de amplificação do produto de PCR começa a ser detectado. O cálculo matemático utilizado para aferir a expressão dos genes analisados se baseou no método descrito por Pfaffl (2001), onde a taxa de expressão relativa é baseada na seguinte equação:

$$R = \frac{(\text{Eficiência}_{\text{alvo}})^{C_T (\text{amostra controle} - \text{amostra teste})}}{(\text{Eficiência}_{\text{endógeno}})^{C_T (\text{amostra controle} - \text{amostra teste})}}$$

$$\text{Eficiência} = -1 + (10^{-1/\text{slope}})$$

A especificidade da reação de RT-qPCR foi verificada através da curva de dissociação realizada ao final de cada amplificação.

Os resultados foram analisados utilizando o software REST (Relative Expression Software Tool) 2009 (Qiagen®).

4.5 Descrição do perfil clínico dos pacientes

Foi feita uma revisão e análise dos prontuários de todos os pacientes acompanhados no estudo, a fim de se traçar um perfil clínico do grupo estudado.

4.6 Análises estatísticas

As seguintes variantes foram analisadas: presença ou ausência de cada tipo de tumor, tamanho do tumor (macro/micro), presença de malignidade, resposta ao tratamento farmacológico (quando aplicável). O teste de Fisher foi aplicado quando adequado.

As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil Clínico dos pacientes com NEM1

Um total de 8 famílias e 2 casos esporádicos foram estudados, perfazendo um total de 33 pacientes com NEM1, sendo 31 NEM1 familiar e 2 NEM1 esporádico (27 mulheres, 6 homens). Foram considerados casos esporádicos aqueles pacientes sem história familiar relatada de tumores neuroendócrinos.

A idade média dos pacientes foi de $40,7 \pm 12,7$ anos, com idades variando entre 9-65 anos. Já a idade média de início dos sintomas foi de $22,2 \pm 9,2$ anos (8-48 anos) e a idade média ao diagnóstico foi de $27,6 \pm 11,7$ anos (8-54 anos). Dessa forma, o intervalo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico de NEM1 foi de $5,4 \pm 7,3$ anos (0-24 anos).

A prevalência dos tumores associados a NEM1 foi a seguinte: HPT, 87,8% (29/33); adenoma hipofisário, 81,8% (27/33); TEPs, 54,5% (18/33); outros tumores associados a NEM1, 63,6% (21/33) (Tabela 5).

Tabela 5: Prevalência dos principais tumores associados a NEM1 nos pacientes do presente estudo e na literatura.

Manifestação Clínica	Prevalência nesse estudo	Prevalência na literatura*
<i>Hiperparatireoidismo primário</i>	87,8%	90%
<i>Adenoma Hipofisário</i>	81,8%	20-40%
Prolactinoma	88,8%	70%
Co-secretor GH/prolactina	3,7%	10%
Não-funcionante	7,4%	20%
<i>Tumores entero-pancreáticos</i>	54,5%	35%
Gastrinoma	50%	40%
Insulinoma	11,2%	10%
TEP não-funcionante	38,8%	20%
<i>Outros tumores relacionados a NEM1</i>	63,6%	Variável

Fonte:* Baseado em Brandi et al., 2001; Verges et al., 2002 e Marx, 2005.

Com relação à primeira manifestação nesses pacientes, os adenomas hipofisários ocorreram em 57,5% (19/33), o HPT em 18,1% (6/33), os TEPs em 12,1% (4/33), outros tumores associados a NEM1 em 6,0% (2/33) e co-manifestação inicial de adenoma hipofisário e TEP em 6,0% (2/33) (Tabela 6).

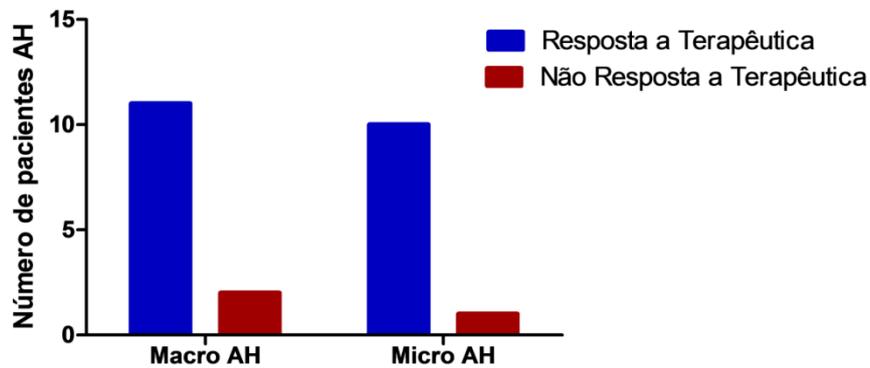
Tabela 6: Manifestação clínica inicial nos pacientes portadores de NEM1 do presente estudo.

Manifestação Clínica Inicial	Prevalência
Adenoma Hipofisário	57,5%
Hiperparatireoidismo	18,1%
Tumores entero-pancreáticos	12,1%
Adenoma Hipofisário e TEP	6,0%
Outros tumores relacionados a NEM1	6,0%

Dos pacientes com HPT, 86,2% (25/29) realizaram avaliação densitométrica, e todos apresentaram evidências de osteopenia ou osteoporose de coluna lombar ou colo femural. Uma paciente (4%) apresentou tumor ósseo. Foi realizada cirurgia em 68% (17/25) desses pacientes, com taxa de cura de 64,7% (11/17). Dos pacientes operados, apenas 23,5% (04/17) foram submetidos à timectomia profilática. Alguns dos pacientes foram submetidos a mais de uma cirurgia de paratireoidectomia (07/17), devido à recidiva após certo tempo.

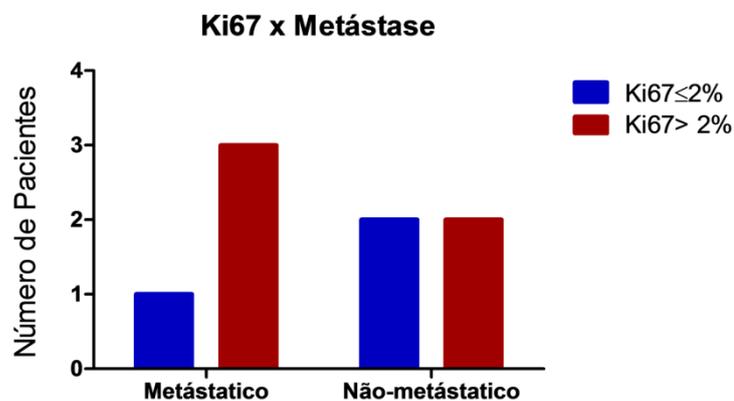
Entre os pacientes com adenoma hipofisário, o diagnóstico foi de AH co-secretor de hormônio do crescimento (GH) e prolactina em 3,7% (1/27); AH não-funcionante em 7,4% (2/27) e prolactinoma em 88,8% (24/27) dos pacientes. Com relação ao tamanho do tumor, 40,7% (11/27) se apresentaram como microadenomas (<10cm); 55,5% (15/27) como macroadenomas (>10cm) e uma paciente (3,7%) ainda não realizou o exame de imagem. Dos pacientes com macroadenoma, quatro (26,6%) foram operados, com necessidade de radioterapia adjuvante em dois deles. Todos os pacientes com prolactinoma e a paciente com AH co-secretor fizeram ou fazem uso de um agonista dopaminérgico (Cabergolina ou Bromocriptina). Dentre estes, apenas três pacientes não apresentaram resposta satisfatória ao tratamento (ou seja, controle bioquímico e/ou redução de volume tumoral). Uma distribuição entre a resposta ao tratamento farmacológico e o tamanho do tumor (macro ou microadenoma) foi examinada. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos ($p=1,00$), mostrando que o tamanho do tumor não é um fator que influencie a resposta ao tratamento (Fig. 4).

Figura 4: Resposta ao tratamento farmacológico associado ao tamanho do tumor.



Já entre os pacientes com tumores entero-pancreáticos (TEPs), 50% (9/18) apresentaram gastrinoma; 11,2% (2/18) insulinooma e 38,8% (7/18) TEPs não-funcionantes. Dentre esses pacientes, 11 tiveram indicação cirúrgica, com resultados de imuno-histoquímica (quando disponíveis) mostrando valores de Ki67 $\leq 2\%$ em 03/08 dos casos e $>2\%$ em 05/08 dos casos. Com relação à metástase, três pacientes, um com TEP não-funcionante e dois com gastrinomas, apresentaram metástase hepática, com diferentes graus de agressividade. Além desses pacientes com TEP, somente mais uma paciente com tumor de mediastino de linhagem neuroendócrina, apresentou metástase linfonodal. Uma distribuição entre os valores de Ki67 (disponíveis) e a presença de metástases foi examinada. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos ($p=1,00$), mostrando que, para o número de pacientes analisados, os valores de Ki67 não influenciaram na presença de metástases. A figura abaixo mostra os valores de Ki67 desses pacientes associados à ausência ou presença de metástases (Fig. 5).

Figura 5: Valores de Ki67 associados à ausência ou presença de metástases.



5.2 Perfil molecular dos pacientes com NEM1

5.2.1 Extração de DNA e Amplificação do gene *MEN1*

A concentração do DNA extraído, após quantificação, foi em média $142,68 \pm 67,17$ ng/ μ L; e as relações de 260/ 280 foram em média $1,87 \pm 0,04$ e 260/230 com média de $2,01 \pm 0,27$. A tabela com a concentração de todas as amostras, após quantificação, está descrita no Anexo B.

As condições de amplificação dos exons do gene *MEN1*, após padronizações, estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7: Condições de amplificação através de PCR, após padronização, dos nove exons do gene *MEN1*.

Exon	Temp. Anelam.(°C)	Condições Amplificação	Tampão PCR	Número Ciclos	Temp. Desnat.(°C)
2	66	1,5mM MgCl ₂ / 2,0 units Taq	F ¹	35	96
3	68	1,5mM MgCl ₂	S ²	32	94
4	70	1,5mM MgCl ₂	S ²	30	94
5.6	58	1,5mM MgCl ₂	S ²	35	96
7	70	2,0mM MgCl ₂	S ²	30	94
8	68	1,5mM MgCl ₂	S ²	32	94
9	68	1,5mM MgCl ₂	S ²	32	94
10	68	1,5mM MgCl ₂	D ³	32	94

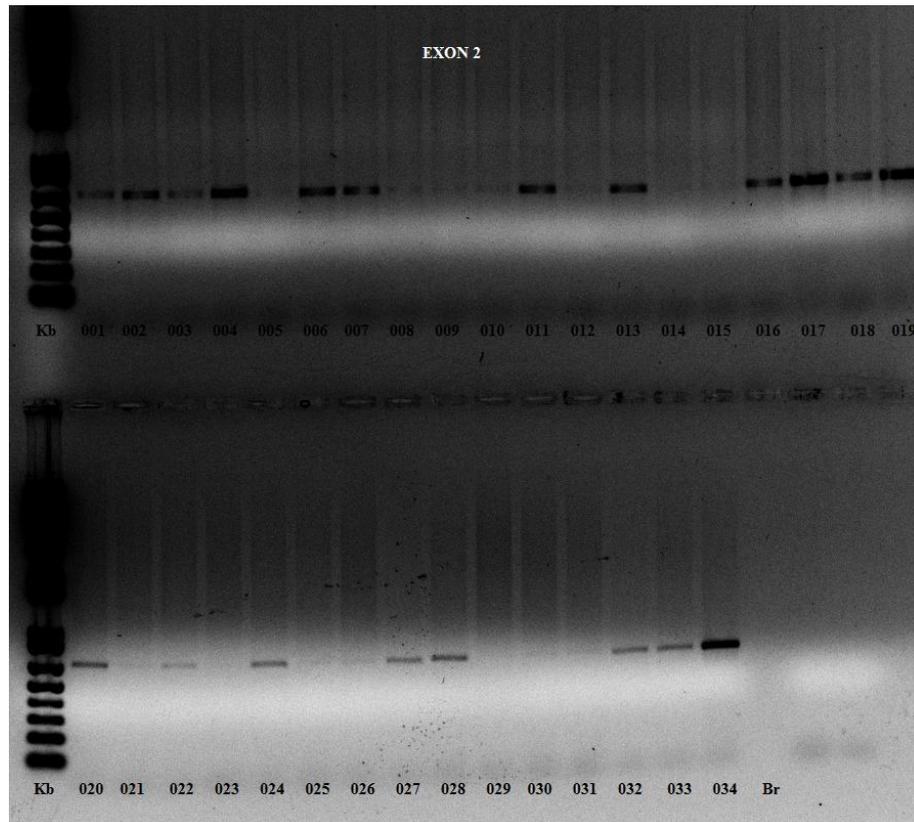
¹F: Tampão Standard (200mM Tris-HCl, pH 8,4; 500mM KCl) com 2,5% (v/v) Formamida.

²S: Tampão Standard (200mM Tris-HCl, pH 8,4; 500mM KCl).

³D: Tampão Standard (200mM Tris-HCl, pH 8,4; 500mM KCl) com 6% (v/v) DMSO.

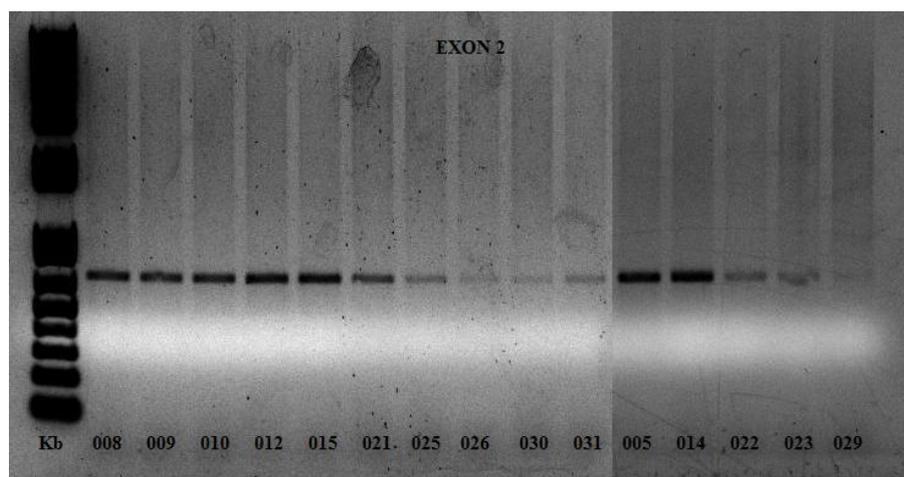
A verificação das amostras amplificadas foi realizada através de corridas eletroforéticas em géis de agarose 1%. Todos os exons tiveram amplificação específica, visualizada no gel como uma banda única, no tamanho esperado quando comparado ao padrão molecular de 1Kb (Figs. 6 a 17).

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 2 do gene *MEN1*.



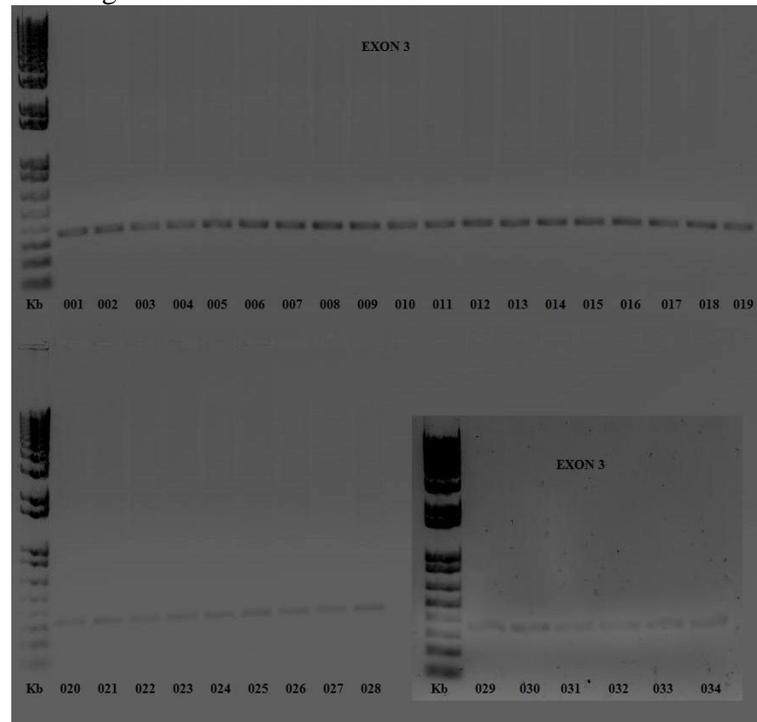
Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação.
Br: controle negativo.

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando a repetição de alguns produtos amplificados do exon 2 do gene *MEN1*.



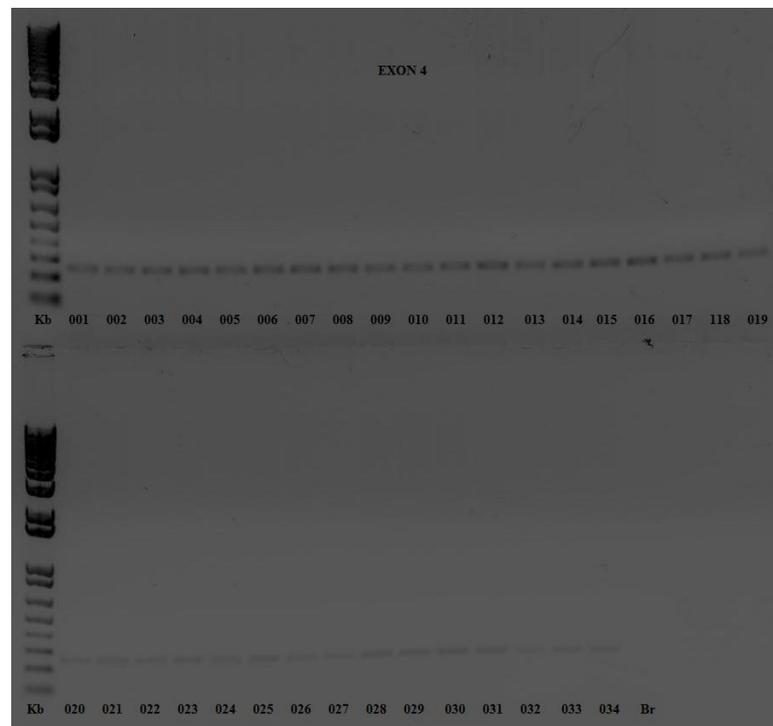
Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 15: produto de amplificação.
Br: controle negativo.

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 3 do gene *MEN1*.



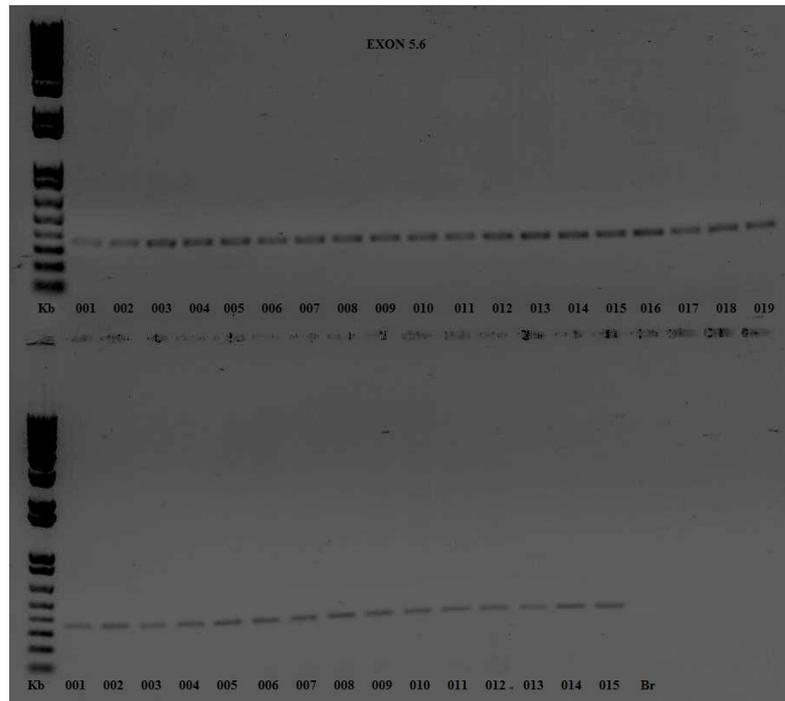
Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação.
Br: controle negativo.

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 4 do gene *MEN1*.



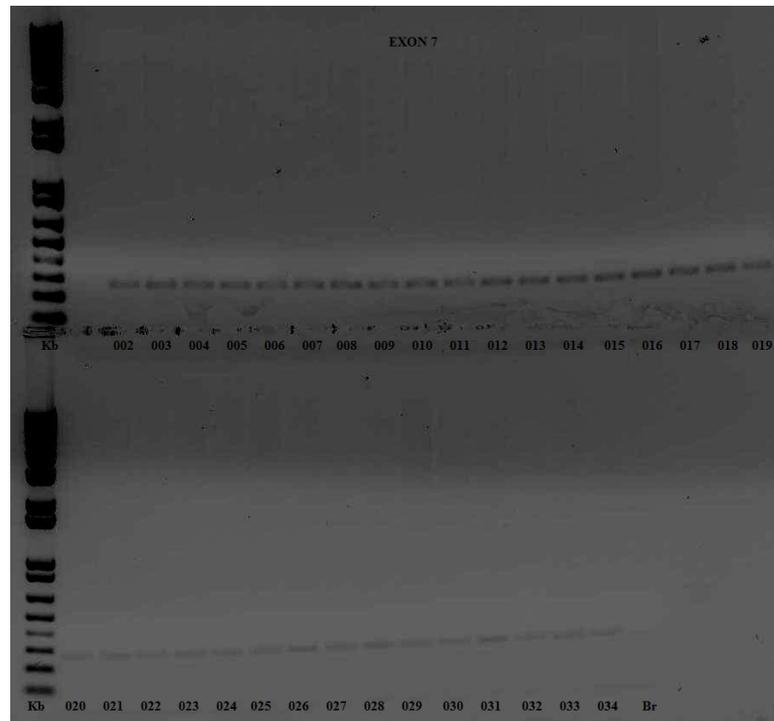
Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação.
Br: controle negativo.

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 5.6 do gene *MEN1*.



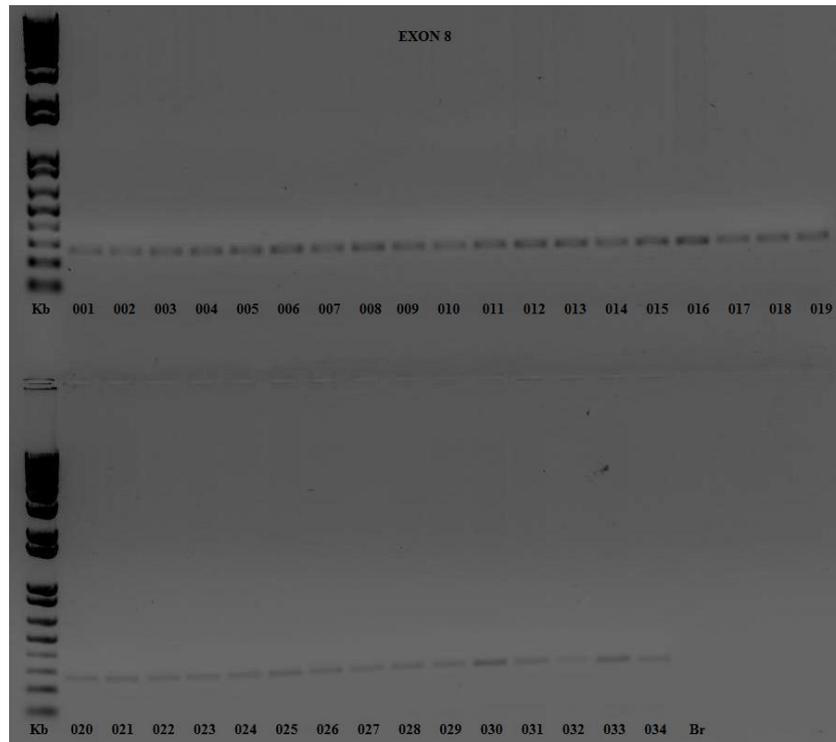
Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação.
Br: controle negativo.

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 7 do gene *MEN1*.



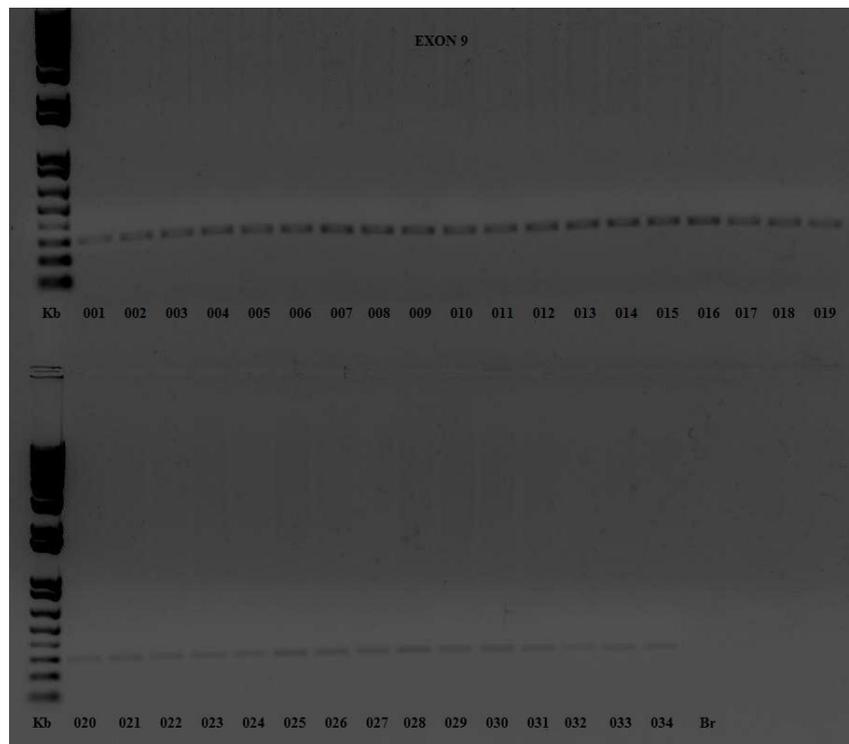
Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação.
Br: controle negativo.

Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 8 do gene *MEN1*.



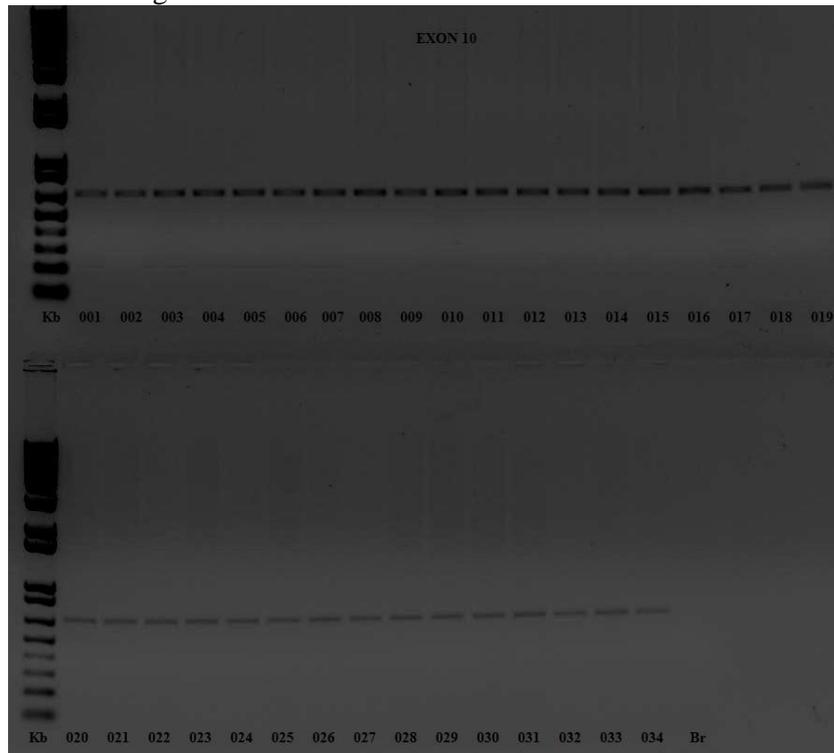
Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação.
Br: controle negativo.

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 9 do gene *MEN1*.



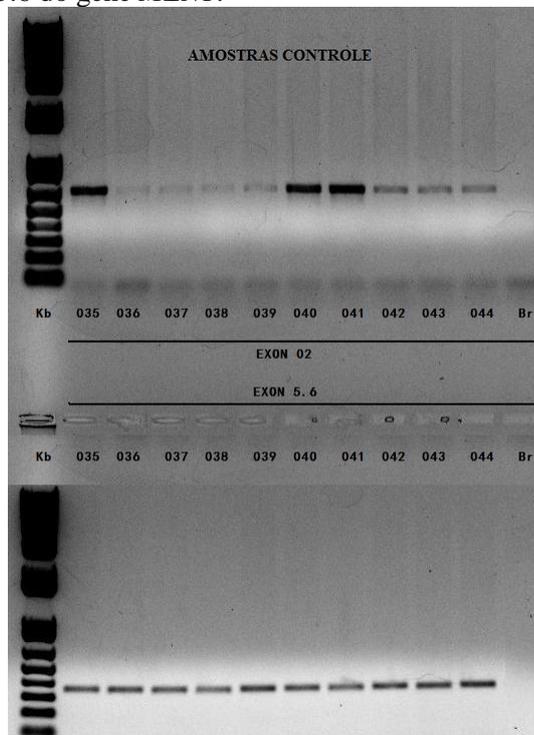
Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação.
Br: controle negativo.

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados do exon 10 do gene *MEN1*.



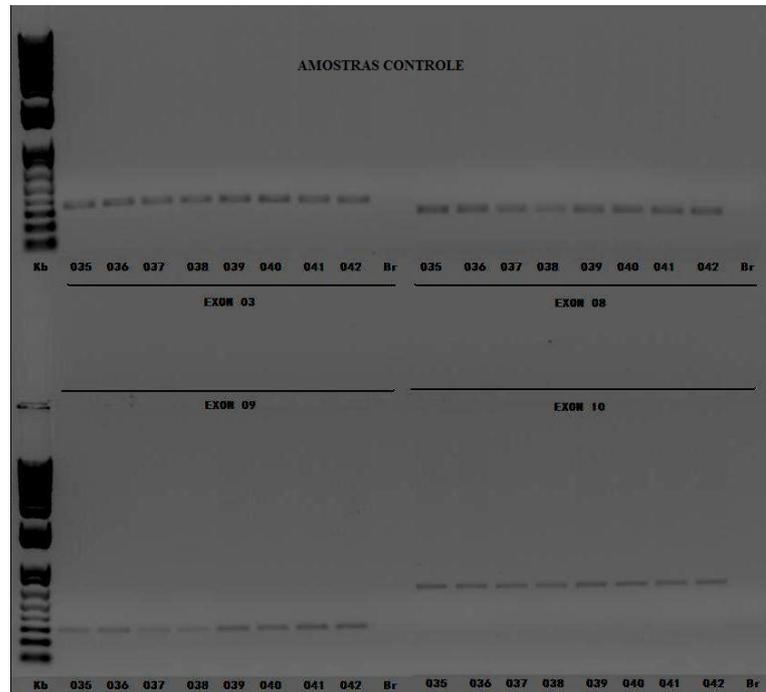
Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 a 34: produto de amplificação.
Br: controle negativo.

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados dos exons 2 e 5.6 do gene *MEN1*.



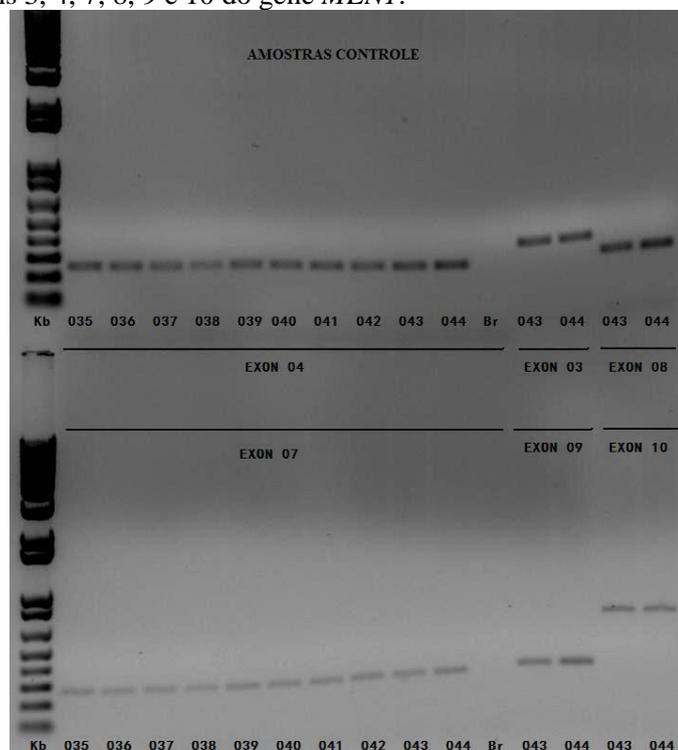
Amostras de voluntários controle do estudo. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).
Canaletas 1 a 20: produto de amplificação grupo controle. Br: controle negativo.

Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados dos exons 3, 8, 9 e 10 do gene *MEN1*.



Amostras de voluntários controle do estudo. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).
Canaletas 1 a 32: produto de amplificação grupo controle. Br: controle negativo.

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos amplificados dos exons 3, 4, 7, 8, 9 e 10 do gene *MEN1*.



Amostras de voluntários controle do estudo. Kb: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).
Canaletas 1 a 28: produto de amplificação grupo controle. Br: controle negativo.

A concentração dos produtos de PCR, após purificação com isopropanol/etanol, foi em média 28,4 ng/ μ L para todos os exons analisados.

5.2.2 Identificação de mutações no gene *MEN1*

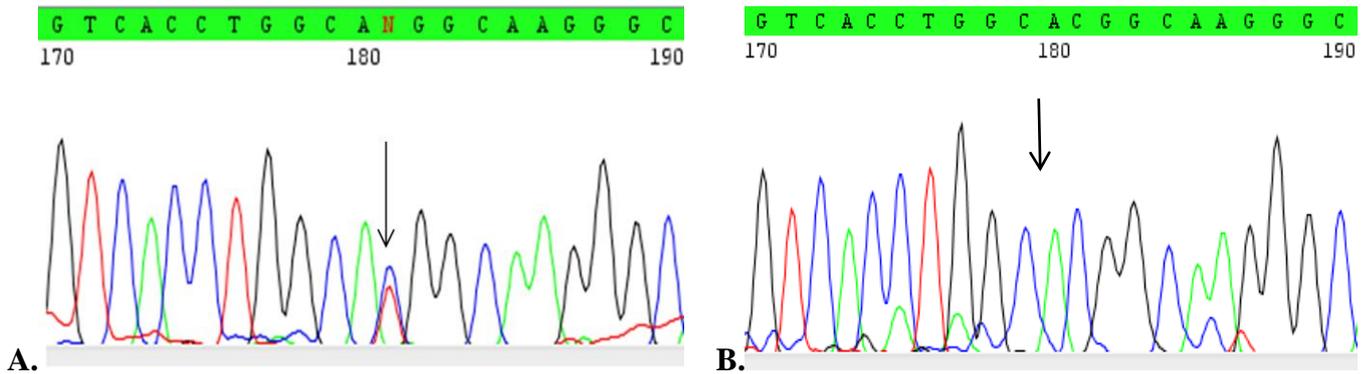
Após sequenciamento automático de toda a região codificadora do gene *MEN1*, foram encontradas mutações germinativas em sete famílias portadoras de NEM1 estudadas e em um dos casos esporádicos. Três diferentes mutações foram identificadas, estando presentes nos exons 3 e 6. Todas as amostras foram re-sequenciadas a fim de se confirmar as mutações encontradas.

Entre as mutações, duas foram do tipo *missense* (mutações pontuais): c.597 C>T (H199H), c.830 C>G (P277R) e uma do tipo *splice-site* (mutações nas regiões de junção exon-intron): c.654 +1 G>T (IVS3+1G \rightarrow T) (Tabela 8 e Figs 18 a 20).

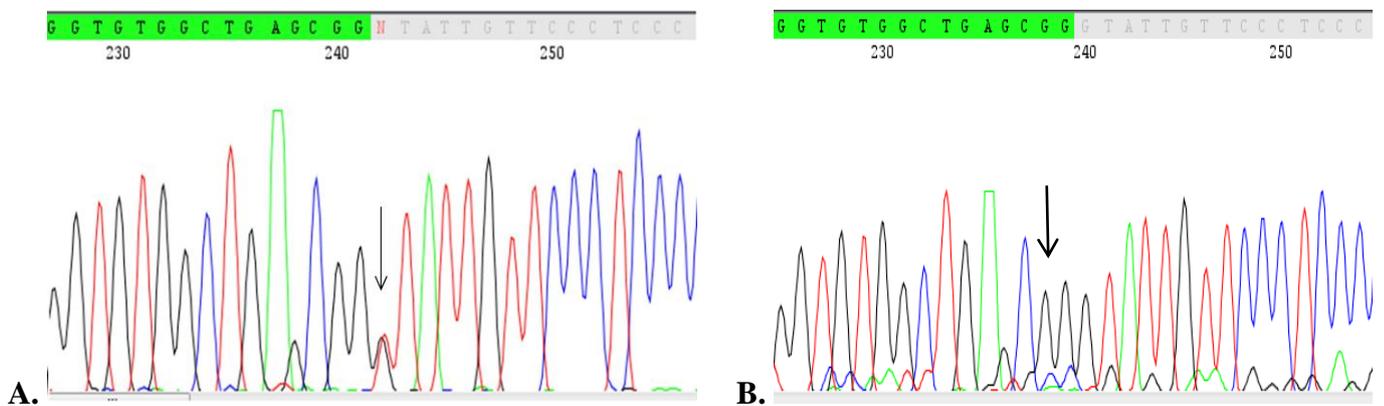
Tabela 8: Mutações identificadas nas oito famílias portadoras de NEM1 familiar e nos dois casos de NEM1 esporádicos.

Famílias / Esporádicos	Mutações Identificadas
F1	c.654 +1 G>T
F2	c.654 +1 G>T
F3	c.654 +1 G>T
F4	c.654 +1 G>T
F5	c.654 +1 G>T; c.597 C>T
F6	c.654 +1 G>T
F7	c.654 +1 G>T
F8	-----
E1	-----
E2	C.830 C>G

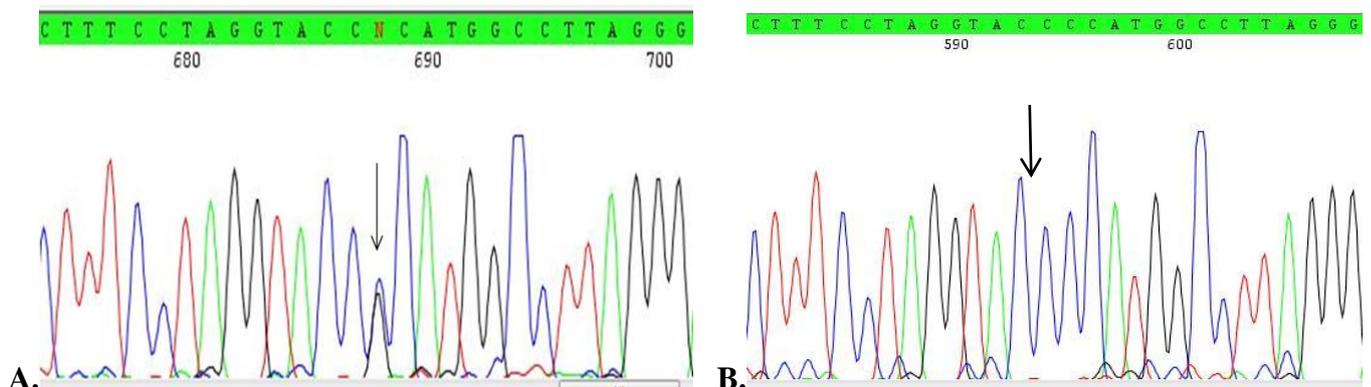
Quase todas as famílias, com exceção apenas da família F8, compartilham a mutação c.654 +1 G>T. Análises de possível parentesco entre essas famílias não foi realizado.

Figura 18: Sequenciamento automático do gene *MEN1*

A: Mutação *missense* c.597 C>T (H199H), localizada no exon 3. **B:** Sequência normal do voluntário controle.

Figura 19: Sequenciamento automático do gene *MEN1*.

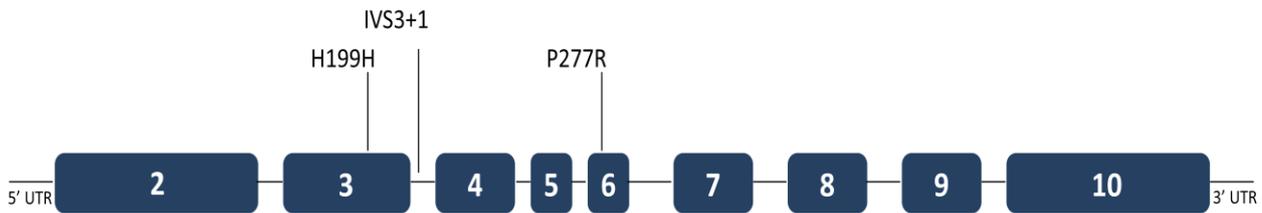
A: Mutação *splice-site* c.654+1 G>T (IVS3+1G→T), localizada no intron 3. **B:** Sequência normal do voluntário controle.

Figura 20: Sequenciamento automático do gene *MEN1*.

A: Mutação *missense* c.830 C>G (P277R), localizada no exon 6. **B:** Sequência normal do voluntário controle.

Com relação à localização dessas mutações, uma foi encontrada no exon 3, no códon 199; uma no intron 3 e outro no exon 6, no códon 277 (Fig.21).

Figura 21: Representação esquemática da região codificadora do gene *MEN1* (exons 2 a 10) indicando as três mutações germinativas identificadas nesse estudo.



De acordo com uma extensa lista de mutações descrita por Lemos e Thakker (2008), duas das mutações identificadas nesse estudo não haviam sido previamente descritas, c.597 C>T (H199H) e c.830 C>G (P277R).

5.2.2.1 Análise *in silico* das mutações *missense* identificadas no gene *MEN1*

Foi utilizado o software SFIT (SIFT, 2013) para prever se determinada alteração *missense* poderia ser tolerável ou não.

A mutação *missense* c.830 C>G foi considerada uma mudança de aminoácido não tolerável, afetando na função da proteína; enquanto que a mutação c.597 C>T foi considerada uma alteração tolerável.

5.2.3 Polimorfismos no gene *MEN1*

O polimorfismo c.1254 C>T (D418D) foi identificado em um dos casos esporádicos (E2) portador de NEM1 (LEMOS; THAKKER, 2008). Para as amostras controle analisadas, o polimorfismo D418D foi identificado em 50% (5/10) dos casos.

5.3 Correlação genótipo-fenótipo nos pacientes portadores de NEM1

5.3.1 Co-existência de tumores NEM1 relacionados a presença de mutações

A Tabela 9 mostra um resumo das prevalências dos principais tumores associados a NEM1 em cada uma das famílias e dos casos esporádicos do presente estudo. Além disso, mostra também as mutações identificadas por família ou caso esporádico.

Tabela 9: Prevalências, por família, dos principais tumores NEM1; e mutações germinativas identificadas nas oito famílias e nos dois casos esporádicos estudados.

Famílias / Esporádicos	Mutações Identificadas	Número de Famíliares	HPT	AH	TEPs
F1	c.654 +1 G>T	7	85,7%	57,1%	71,4%
F2	c.654 +1 G>T	3	100%	100%	66,6%
F3	c.654 +1 G>T	4	100%	33,4%	66,7%
F4	c.654 +1 G>T	4	50%	100%	0%
F5	c.654 +1 G>T; c.597 C>T	5	60%	100%	60%
F6	c.654 +1 G>T	4	100%	100%	50%
F7	c.654 +1 G>T	3	100%	100%	66,6%
F8	-----	2	100%	50%	0%
E1	-----	-	100%	100%	100%
E2	C.830 C>G	-	100%	100%	100%

5.3.2 Agressividade dos tumores NEM1 relacionados a presença de mutações

A agressividade em tumores relacionados à NEM1 foi determinada a partir de parâmetros clínicos; como resposta ao tratamento instituído, recidiva após cirurgias e presença de metástases. A Tabela 10 lista os tumores presentes em cada uma das famílias e casos esporádicos estudados, mostrando a ausência ou presença de comportamento agressivo naquela família, e as mutações identificadas.

Tabela 10: Ocorrência dos tumores NEM1 relacionados e sua respectiva agressividade (S/N) por família; relatado às mutações identificadas em cada família.

	ID	Nº Casos	Tumores	Agressiv.* (S/N)	Mutações no gene <i>MEN1</i>	Posição
NEM1 Familiar	F1	7	HPT - AH - TEP	N - N - S	c.654 +1 G>T	Intron 3
	F2	3	HPT - AH - TEP	N - N - N	c.654 +1 G>T	Intron 3
	F3	4	HPT - AH - TEP	N - N - S	c.654 +1 G>T	Intron 3
	F4	4	HPT - AH	N - N	c.654 +1 G>T	Intron 3
	F5	5	HPT - AH - TEP	N - S - S	c.654 +1 G>T; c.597 C>T	Intron 3 e Exon 3
	F6	4	HPT - AH - TEP	N - N - S	c.654 +1 G>T	Intron 3
	F7	3	HPT - AH - TEP	N - N - S	c.654 +1 G>T	Intron 3
	F8	2	HPT - AH	N - N	-----	-----
NEM1 Esporádico	E1	1	HPT - AH - TEP	N - N - N	-----	-----
	E2	1	HPT - AH - TEP	N - N - S	c.830 C>G	Exon 6

* Agressividade baseada em parâmetros clínicos.

5.3.3 Malignidade dos TEPs/NEM1 relacionados a presença de mutações

Quanto à malignidade relacionada aos TEPs/NEM1, ela foi documentada em 03 casos, por achados patológicos e/ou a presença de metástases hepáticas. A Tabela 11 mostra essa associação da presença de metástases, valores de Ki67 e a identificação das mutações por família.

Tabela 11: Presença/ausência de metástases em pacientes com TEPs/NEM1, associado a valores de Ki67 e às mutações identificadas por família.

	ID	ID Paciente	Tumores	Metástase Hepática (S/N)	Ki67	Mutações no gene <i>MEN1</i>
NEM1 Familiar	F1	023	Gastrinoma	NÃO	2%	c.654 +1 G>T
	F3	009	Gastrinoma	SIM	10%	c.654 +1 G>T
		017	Gastrinoma	NÃO	< 2%	
	F5	019	Gastrinoma	SIM	2%	c.654 +1 G>T; c.597 C>T
		028	Insulinoma	NÃO	15%	
	F7	005	Insulinoma	NÃO	10%	c.654 +1 G>T
		007	Não - secretor	SIM	4%	
NEM1 Esporádico	E1	001	Não - secretor	NÃO	18%	-----

5.3.4 Resposta ao tratamento farmacológico em AH/NEM1 relacionados a presença de mutações

A resposta ao tratamento farmacológico com um agonista dopaminérgico (cabergolina ou bromocriptina) em pacientes com prolactinomas (AH/NEM1) foi considerada satisfatória quando gerou um controle bioquímico da secreção hormonal e/ou redução do volume tumoral. A tabela 12 mostra uma distribuição entre a resposta ao tratamento farmacológico, o tamanho do tumor e identificação das mutações por família.

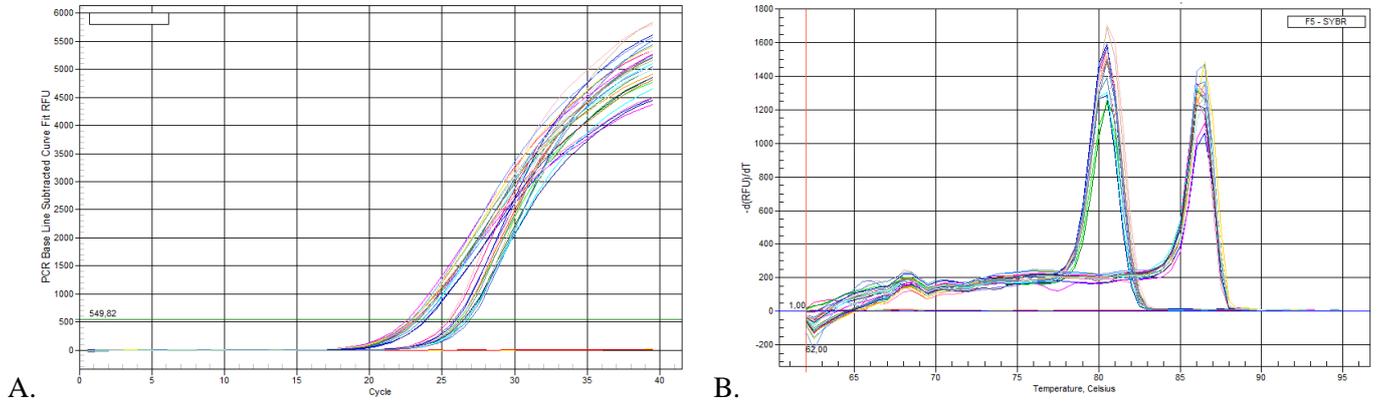
Tabela 12: Resposta ao tratamento farmacológico, associado ao tamanho do tumor e às mutações identificadas por família.

	ID	ID Paciente	Tamanho do Tumor ¹	Resposta (S/N)	Mutações no gene <i>MEN1</i>
NEM1 Familiar	F1	023	MICRO	SIM	c.654 +1 G>T
		030	MACRO	SIM	
		031	MACRO	SIM	
	F2	029	MICRO	SIM	c.654 +1 G>T
		020	MICRO	SIM	
		024	MICRO	SIM	
	F3	033	MACRO	SIM	c.654 +1 G>T
		013	MICRO	NÃO	
	F4	008	MACRO	SIM	c.654 +1 G>T
		012	MACRO	SIM	
		015	MICRO	SIM	
	F5	016	MICRO	SIM	c.654 +1 G>T; c.597 C>T
		017	MICRO	SIM	
		019	MICRO	SIM	
		028	MACRO	SIM	
	F6	002	MICRO	SIM	c.654 +1 G>T
		006	MICRO	SIM	
		032	MACRO	NÃO	
F7	005 ²	MACRO	NÃO	c.654 +1 G>T	
	007	MACRO	SIM		
	010	MACRO	SIM		
F8	027	MACRO	SIM	-----	
NEM1 Esporádico	E1	001	MACRO	SIM	N/A ³
	E2	021	MACRO	SIM	c.830 C>G

¹ Macro: macroadenoma (> 10mm); Micro: microadenoma (<10 mm); ² AH Co-secretor de GH e prolactina; ³ N/A: nenhuma alteração.

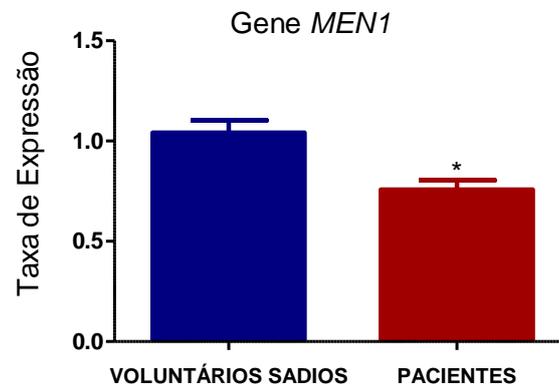
5.4 Análise de expressão do gene *MEN1*

Foram observadas diferenças no perfil de expressão entre os pacientes portadores de NEM1 quando comparados com os voluntários saudáveis. O gene *MEN1*, nos pacientes com NEM1 estudados, estava regulado negativamente (“down-regulated”).

Figura 22: Perfil de expressão do gene *MEN1*

A: Curvas de amplificação voluntários sadios e pacientes portadores de NEM1. Genes *MEN1* e *GAPDH*;
B: Curva de dissociação. Genes *MEN1* e *GAPDH*.

Figura 23: Níveis de expressão do gene *MEN1* em pacientes portadores de NEM1 e em voluntários sadios ($p = 0,0003$).



6 DISCUSSÃO

Apresentamos nesse estudo resultados sobre o perfil clínico e molecular de pacientes portadores de Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 acompanhados no SED-HUWC. Este estudo é pioneiro não apenas no estado do Ceará, como também em toda a região Nordeste.

6.1 Perfil Clínico do pacientes com NEM1

No presente estudo foram acompanhados e analisados um total de 33 pacientes dos 43 pacientes em seguimento clínico no Serviço de endocrinologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (SED-HUWC). Os pacientes cujas amostras não foram coletadas e, conseqüentemente, não entraram nesse estudo, foram chamados para participar do mesmo, entretanto não compareceram em nenhuma das tentativas.

Observamos, entre os pacientes do estudo, existir um predomínio do sexo feminino (27 mulheres x 6 homens), embora não exista um prevalência por sexo em NEM1, afetando igualmente homens e mulheres (MARINI et al., 2006). Uma das justificativas para esse predomínio seria que, especialmente em nossa cultura, a busca por assistência médica é mais frequentemente realizada por mulheres.

O número atual de pacientes representa um esforço por parte do SED-HUWC pela busca ativa de novos casos. Desde 2008, o serviço vem adotando um protocolo padronizado de rastreamento de novos casos familiares de NEM1, conforme recomendações do Consenso de 2001 (BRANDI et al., 2001), bem como, a realização de exames nos pacientes afetados. Com esta estratégia, houve um aumento considerável do número de casos, assim como aumento na detecção de tumores relacionados à síndrome, contribuindo para um diagnóstico precoce e possível diminuição das co-morbidades (Figs. 19 e 20). White et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes, com o incremento de novos casos após busca ativa por familiares de casos índices.

Figura 24: Evolução no número de pacientes (familiares e esporádicos) com NEM1 acompanhados no SED-HUWC, considerando como marcos temporais os anos de 2008, 2010 e 2012.

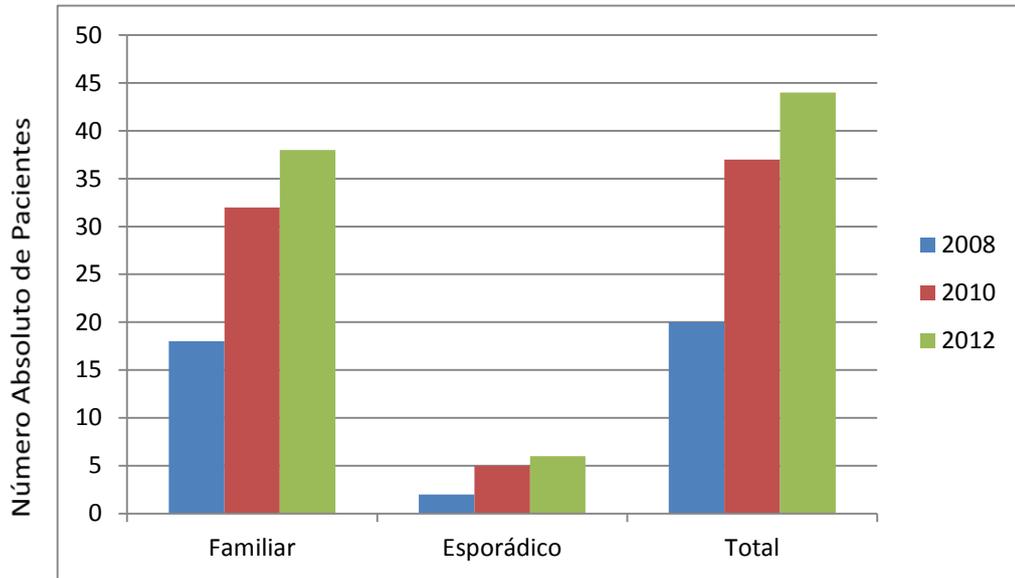
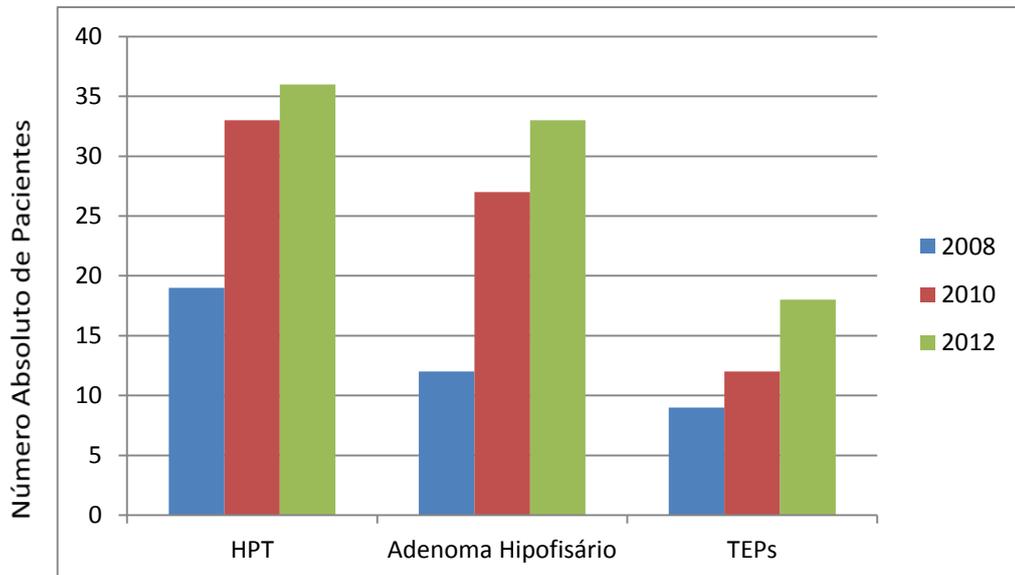


Figura 25: Incremento no diagnóstico dos principais tumores relacionados a síndrome NEM1 nos pacientes acompanhados no SED-HUWC, considerando como marcos temporais os anos de 2008, 2010 e 2012.



A prevalência do HPT entre os pacientes desse estudo foi elevada (87,8%), assim como a dos TEPs (54,5%), com valores em concordância com aqueles descritos na literatura (BRANDI et al., 2001; VERGES et al., 2002; MARX, 2005; THAKKES, 2012). A prevalência dos tumores hipofisários (81,8%) também foi elevada, apresentando valores acima da média geralmente descrita na literatura (BURGESS et al., 1996; VERGES et al., 2002; LOURENÇO Jr. et al., 2008), mas ao considerar que esses valores oscilam bastante dependendo da população estudada, eles estão dentro de uma variação considerada normal.

A manifestação clínica inicial mais presente entre os pacientes afetados foram os adenomas hipofisários (57,5%), ao contrário do que mostra a literatura, onde geralmente a manifestação inicial mais comum é o HPT (que se mostrou em 18,1%, nesse estudo) (SCHUSSHEIM et al., 2001; VERGES et al., 2002), com tumores hipofisários podendo ser a manifestação inicial da síndrome em apenas até 25% dos casos (KAMEYA; TSUKADA; YAMAGUCHI, 2004; STRATAKIS et al., 2010). Nesse caso, essa prevalência pode demonstrar que o diagnóstico de NEM1 nesses pacientes tem sido tardio, realizado já em um estágio clínico da doença. Isso pode ser também um reflexo da predominância de mulheres entre os pacientes, onde sintomas de galactorréia e amenorréia (típicos de prolactinoma), motivaram a consulta médica inicial. Outro fator importante que deve ser lembrado é que, nos pacientes do SED-HUWC, a busca ativa de novos casos de NEM1 partiu, em parte, a partir de pacientes diagnosticados com prolactinomas, o que seria outra questão importante para explicar essa prevalência de AHs (prolactinomas) na manifestação clínica inicial.

Entretanto, vale lembrar que apesar de o HPT estar presente na quase totalidade dos casos de NEM1, em aproximadamente 80% das vezes são os tumores hipofisários, tumores secretores gastroenteropancreáticos ou tumores carcinóides que motivarão a consulta médica inicial, por serem tumores mais sintomáticos em estágios menos avançados. Assim, como conduta prática, é importante procurar um possível HPT em pacientes com diagnóstico de tumor hipofisário ou tumores gastroenteropancreáticos, dosando-se inicialmente a calcemia (CORBETTA et al., 1997; BRANDI et al., 2001; PIECHA; CHUDEK; WIECEK, 2008). Em pacientes portadores de tumores hipofisários supostamente esporádicos, o *screening* para a presença de hiperparatireoidismo através da dosagem de cálcio e PTH pode resultar em novos diagnósticos de NEM1, como descrito em uma série de 166 pacientes portadores de diferentes tipos de tumores hipofisários, onde 4,8% dos pacientes tinham HPT associado a NEM1 (CORBETTA et al., 1997). Levantamento realizado no SED-HUWC demonstrou achado semelhante, onde a dosagem de cálcio sérico e PTH permitiu o diagnóstico de HPT/NEM1 em 4,7% (07/149) dos pacientes inicialmente portadores apenas de prolactinomas esporádicos.

Nos pacientes com HPT, a taxa de cura pós-cirúrgica (64,7%) foi em consonância com dados da literatura para HPT/NEM1, onde a normalização do cálcio sérico ocorre em torno de 70% dos casos (CARLING; UDELSMAN, 2005). Entretanto, no período de uma década, 50% destes pacientes recidivam. A recidiva, em vários desses pacientes, ocorre múltiplas vezes ao longo da vida e, portanto, muitos requerem várias intervenções cirúrgicas (GOUDET

et al., 2001). Entre os pacientes do estudo, 41,2% (07/17) tiveram recidiva, sendo submetidos a mais de uma cirurgia de paratireoidectomia. Essa recidiva pode também ser explicada pelo fato de que a grande maioria dos pacientes submetidos à paratireoidectomia (com exceção de quatro) não foram submetidos a primeira cirurgia conforme preconizado pelo Consenso de 2001, onde tratamento do HPT/NEM1 deve ser via: a) paratireoidectomia subtotal (três glândulas e meia) ou b) paratireoidectomia total seguida de enxerto heterotópico de tecido paratiroidiano no antebraço não-dominante (para eventual fácil remoção em casos com recorrência) (BRANDI et al., 2001; CARLING; UDELSMAN, 2005).

A indicação da timectomia, geralmente recomendada na primeira abordagem cirúrgica do HPT, foi realizada em apenas 23,5% (04/17) dos pacientes submetidos a cirurgia, sendo de fundamental importância pois é sítio frequente de paratireoide ectópica e/ou supranumerária (que ocorre em 20% dos pacientes com NEM1), assim como sede de tumor carcinóide tímico, o que resultaria em insucesso cirúrgico ou recidiva do HPT (MARINI et al., 2009; TONELLI et al., 2009).

Nos pacientes com adenoma hipofisário, houve um predomínio de macroadenomas (55,5%) sobre os microadenomas (40,7%), de acordo com o descrito na literatura, onde existe um predomínio de macroadenomas nos HIP/NEM1 (VERGES et al., 2002). O prolactinoma foi o subtipo mais frequente, ocorrendo em 88,8% (24/27) dos pacientes, em consonância com a literatura, que mostra ser o prolactinoma o tumor mais frequente entre os HIP/NEM1, ocorrendo em cerca de 76% dos casos (MATSUZAKI; CANTO-COSTA; HAUACHE, 2004).

A resposta satisfatória ao tratamento com agonistas dopaminérgicos nos pacientes com prolactinoma ou co-secretor de GH/prolactina foi alta (88%), demonstrado pela regressão do tamanho tumoral e/ou normalização da prolactina. Esses dados estão de acordo com a literatura, que mostra uma taxa de resposta alta, ocorrendo em 70 – 90% dos pacientes (LOSA et al., 2002; HOFF; HAUACHE, 2005).

Nos pacientes com tumores entero-pancreáticos (TEPs), houve um predomínio de gastrinomas (50%), estando de acordo com dados da literatura, onde o gastrinoma é o TEP funcionante mais comum, ocorrendo em 40-75% dos pacientes (KOUVARAKI et al., 2006; FAGGIANO et al., 2008). Dentre os pacientes com TEP, apenas 16,6% (3/18) apresentaram metástase hepática, com valores inferiores aos mostrados na literatura, onde 30% a 60% dos pacientes com essas lesões desenvolvem metástases hepáticas no decorrer da vida (MARINI

et al., 2009; OBERG, 2010). Entretanto, como essas metástases podem ocorrer ao decorrer da vida, ainda existe a possibilidade desses pacientes desenvolverem metástase no futuro.

Os resultados de imuno-histoquímica dos pacientes com TEP que fizeram cirurgia (61,2%) mostram valores de Ki67 bastante variáveis, onde uma distribuição entre valores mais elevados e menos elevados (quando disponíveis) e a presença de metástases não foi observada. O Ki67 é utilizado para definir a estratégia terapêutica adjuvante, índices > 20% estão associados a doença mais agressiva e de comportamento incerto (MASSIRONI et al., 2008). Entretanto, o Ki67 é um índice ainda contestado na literatura, em parte decorrente da subjetividade de avaliação.

6.2 Perfil molecular dos pacientes portadores de NEM1

As causas associadas à variabilidade fenotípica observada em diversas síndromes mendelianas, como a NEM1, ainda não são bem esclarecidas. No presente estudo, investigamos possíveis associações entre o perfil clínico e o perfil mutacional do gene *MEN1* em portadores de Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1.

Foram identificadas, entre os pacientes do estudo, três mutações germinativas (duas *missense* e uma *splice-site*), duas dessas não anteriormente descritas, segundo Lemos e Thakker (2008), que em um estudo de revisão lista 459 diferentes mutações germinativas descritas no gene *MEN1*.

Os mecanismos patogênicos destas novas mutações permanecem desconhecidos. Entretanto, dados *in silico* de análises de homologia e das propriedades físico-químicas dos aminoácidos, puderam oferecer informações de que a mutação c.830 C>G (P277R) leva a uma mudança de aminoácido não tolerável, afetando na função da proteína e, provavelmente, levando à predisposição à NEM1. Um possível mecanismo patogênico para mutações *missense* é a rápida degradação da proteína mutante por meio da via de ubiquitinação (YAGUCHI et al., 2004).

Com relação à mutação c.597 C>T (H199H), essa está localizada em uma região altamente conservada, pois é onde se localiza o segundo domínio de ligação da proteína MENIN com a JunD (CHANDRASEHARAPPA; TEH, 1998). Modificações que ocorrem nesses códons provavelmente levariam a inativação do complexo MENIN/JunD, supressor

tumoral. No entanto, nesse caso, a mutação foi silenciosa, não levando a troca de aminoácido na sequência da proteína codificada.

A mutação c.830 C>G também está localizada em uma região conservada, no domínio de ligação com o NF κ -B (CHANDRASEHARAPPA; TEH, 1998).

A mutação IVS3+1, identificada em quase todas as famílias, afeta a região intron/exon-3 e foi anteriormente reportada em pacientes com NEM1 (TEH et al., 1998). Mutações ocorrendo em regiões intron/exon no gene *MEN1* foram previamente descritas como sendo patogênicas (STENSON et al., 2003; TURNER 2002).

O polimorfismo D418D no exon 9 é a alteração silenciosa mais frequente do gene *MEN1*, tendo sido observado em diferentes frequências, com grande variação, dependendo da população estudada. Em populações americanas e europeias sua frequência varia de 42-47% (CHANDRASEHARAPPA, 1997; GIRAUD et al., 1998; BASSET, 1998; JAGER et al., 2006), enquanto que em genealogias asiáticas as frequências são mais baixas, 0 a 25% (TSO et al., 2003; JAP et al., 2005). No presente estudo, esse polimorfismo esteve presente em um dos pacientes e em 50% dos controles.

A família 08, a qual apenas dois membros entraram no estudo, e um caso esporádico não apresentaram mutações. Geralmente em 70-90% dos casos hereditários são encontradas mutações no gene *MEN1* (MARX, 2005). A ausência de mutações nesses outros 10-30% dos casos decorre, provavelmente, da presença de mutações fora da região codificadora do gene; presença de grandes deleções, que impossibilitam a amplificação do alelo mutado; ou mesmo variação de sensibilidade dos métodos laboratoriais empregados para análise (CAVACO, 2002). Outro fator que explicaria essa ausência de mutações no gene *MEN1* em alguns pacientes com NEM1, seria uma heterogeneidade molecular dessa doença, ou seja, o envolvimento de outros genes além do *MEN1* na tumorigênese da NEM1, como o gene *p27(kip1)/CDKN1B* (PELLEGATA et al., 2006) e o gene *AIP* (GEORGITSI et al., 2007).

Com relação à distribuição das mutações nos casos estudados; a mutação c.654 +1 G>T (IVS3+1G→T) foi compartilhada por praticamente todas as famílias, no entanto o perfil clínico das mesmas foi variável. Dessa forma não foi possível estabelecer uma associação entre genótipo-fenótipo nesses pacientes portadores de NEM1. Esses dados estão de acordo com vários estudos realizados em diversas famílias portadoras de NEM1 e de tumores

esporádicos, onde não é possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo em NEM1 (AGARWAL et al., 1997; BASSETT et al., 1998; GIRAUD et al., 1998; TEH et al., 1998; SCHUSSHEIM et al., 2001; WAUTOT et al., 2002).

Entretanto, algumas mutações que ocorreram exclusivamente em uma ou outra família, mostraram manifestações clínicas interessantes. A mutação c.597 C>T ocorreu apenas na família 5. Essa família apresenta tumores bastante agressivos, do ponto de vista clínico, com 60% (3/5) dos pacientes apresentando tumores enteropancreáticos, todos já operados e com presença de metástase hepática em um dos casos. A frequência de ocorrência dentro dessa família está acima da média descrita na literatura, onde os TEPs ocorrem em aproximadamente 35% dos pacientes com NEM1 (MARX, 2005; TONELLI et al., 2006; KOUVARAKI et al., 2006).

A mutação P277R ocorreu exclusivamente no caso esporádico 2. Essa paciente tem um quadro clínico peculiar, apresentando todos os principais tumores associados a NEM1 (HPT, AH, TEP), um tumor carcinóide de pulmão, um adenocarcinoma e um tumor de mediastino de linhagem neuroendócrina com metástase linfonodal.

No que diz respeito à agressividade dos tumores nas famílias estudadas, não foi possível fazer qualquer associação com as mutações encontradas. No entanto, a família 5, que mostrou manifestação clínica mais agressiva, foi a única a possuir mutação no exon 3.

A respeito da malignidade dos tumores enteropancreáticos, todos os pacientes que apresentaram metástase hepática possuíam a mutação c.654 +1 G>T. No entanto, isso pode ter sido apenas mera coincidência, uma vez que essa mutação se repetiu em praticamente todas as famílias. Não foi possível fazer uma correlação entre os valores de Ki67 com a presença ou ausência de metástase.

Com relação à resposta ao tratamento farmacológico com agonistas dopaminérgicos (cabergolina ou bromocriptina) em pacientes com prolactinomas (AH/NEM1), não foi possível estabelecer uma associação entre o tamanho do tumor e a resposta apresentada. Da mesma forma, não foi possível associar nenhuma mutação a resposta apresentada, satisfatória ou não.

A respeito da expressão do gene *MEN1* em sangue periférico, foram observadas diferenças no perfil de expressão entre os pacientes portadores de NEM1 quando comparados com os voluntários saudáveis. O gene *MEN1*, nos pacientes com NEM1 estudados, estava regulado negativamente (“down-regulated”).

Foram também observadas pequenas diferenças nos níveis de expressão do gene entre os pacientes portadores de NEM1 estudados. No entanto essas diferenças não parecem ser consequência de diferentes padrões de mutação nos pacientes estudados, as quais resultam apenas em alteração na estrutura da proteína. Dessa forma, não foi possível associar uma mutação a um padrão de expressão específico.

Portanto, o perfil de expressão do gene *MEN1* parece ser um potencial marcador a ser melhor estudado, juntamente com outros genes descritos como relacionados a NEM1 (i.e. *p27(kip1)*, *CDKN1B* e *AIP*). Para isso, faz-se necessário o estudo desses não apenas em sangue periférico, mas também no próprio tecido tumoral, contribuindo também para um melhor entendimento do processo de tumorigênese nos tumores endócrinos NEM1 relacionados.

7 CONCLUSÕES

- 1) A manifestação clínica inicial mais frequente entre os pacientes desse estudo foram os adenomas hipofisários.
- 2) Sete das oito famílias portadoras de NEM1 aqui estudadas possuíam mutações germinativas no gene *MEN1*.
- 3) Duas das mutações no gene *MEN1* aqui identificadas não haviam sido descritas previamente, sendo estas localizadas em regiões conservadas que provavelmente estão envolvidas em funções supressoras de tumor da proteína MENIN.
- 4) Não foi possível estabelecer uma relação genótipo-fenótipo nos pacientes desse estudo.
- 5) O gene *MEN1*, nos pacientes com NEM1 estudados, mostrou-se regulado negativamente (“down-regulated”), quando comparado ao grupo controle.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Buscar novos casos de NEM1 em familiares dos casos índices, a partir de screening genético dos familiares ainda não acompanhados no SED-HUWC, permitindo um diagnóstico em um estágio inicial ou não clínico da doença.
- Analisar outros genes que possam estar envolvidos na tumorigênese da NEM1, como o *p27(kip1)/CDKN1B* e o *AIP*, a fim de investigar a influência desses genes no grupo de pacientes acompanhados no SED-HUWC.
- Estudar a influência de miRNAs no controle de expressão gênica e outros mecanismos que possam influenciar no desenvolvimento de tumores associados a NEM1.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.K.; GURU, S.C.; HEPPNER, C.; ERDOS, M.R.; COLLINS, R.M.; PARK, S.Y. et al. Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. **Cell**, v.96, p.143–152, 1999.
- AGARWAL, S.K.; KENNEDY, P.A.; SCACHERI, P.C.; NOVOTNY, E.A.; HICKMAN, A.B.; CERRATO, A. et al. Menin molecular interactions: insights into normal functions and tumorigenesis. **Horm. Metab. Res.**, v.37, p.369-374, 2005.
- AGARWAL, S.K.; KESTER, M.B.; DEBELENKO, L.V.; HEPPNER, C.; EMMERT-BUCK, M. R.; SKARULIS, M. C. et al. Germline mutations of the MEN1 gene in familial multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6, p.1169–1175, 1997.
- AGARWAL, S.K.; LEE BURNS, A.; SUKHODOLETS, K.E.; KENNEDY, P.A.; OBUNGU, V.H.; HICKMAN, A.B. et al. Molecular pathology of the MEN 1 gene. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.1014, p.189-198, 2004.
- AKERSTROM, G.; HESSMAN, O.; HELLMAN, P.; SKOGSEID, B. Pancreatic tumors as part of the MEN1 syndrome. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v.19, n. 5, p.819-830, 2005.
- ASGHARIAN, B.; CHEN, Y-J.; PATRONAS, N.J.; PEGJINI, P.L.; REYNOLDS, J.C.; VORTMEYER, A. et al. Meningiomas may be a component tumor of multiple endocrine neoplasia type 1. **Clin. Cancer Res.**, v.10, p.869-880, 2004.
- BASSETT, J.H.D.; FORBES, S.A.; PANNETT, A.A.J.; LLOYD, S.E.; CHRISTIE, P.T.; WOODING, C. et al. Characterization of mutations in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. **Am. J. Hum. Genet.**, v.62, p.232–244, 1998.
- BECKERS, A.; BETEA, D.; VALDES SOCIN, H.; STEVENAERT, A. The treatment of sporadic versus MEN-1 related pituitary adenomas. **J. Int. Med.**, v.253, p.599-605, 2003.
- BILEZIKIAN, J.P.; POTTS Jr, J.T.; FULEIHAN, GEL-H; KLEEREKOPER, M.; NEER, R.; PEACOCK, M. et al. Summary statement from a workshop on asymptomatic primary hyperparathyroidism: a perspective for the 21st century. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 12, p.5353-5361, 2002.
- BONE, H.G. Diagnosis of multiglandular endocrine neoplasias. **Clin. Chem.**, v. 36, n. 5, p.711-718, 1990.
- BOTSIOS, D.; VASILIADIS, K.; TSALIS, K.; IORDANIDIS, F.; MEGALOPOULOS, A.; TSACHALIS, T. et al. Management of nonfunctioning pancreatic endocrine tumors in the context of multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome. **J. Gastrointest. Liver Dis.**, v.16, p.257-262, 2007.

BRANDI, M.L.; GAGEL, R.F.; ANGELI, A.; BILEZIKIAN, J.P.; BECK-PECCOZ, P.; BORDI, C. et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, p.5658-5671, 2001.

BRANDI, M.L.; MARX, S.J.; AURBACH, G.D.; FITZPATRICK, L.A. Familial multiple endocrine neoplasia type 1: a new look at pathophysiology. **Endocr. Rev.**, v.8, p.391-405, 1987.

BROWN, M.A.; SOLOMON, E. Studies on inherited cancers: outcomes and challenges of 25 years. **Trends Genet.**, v.13, p. 202–206, 1997.

BURGESS, J.R.; DAVID, R.; GREENAWAY, T.M.; PARAMESWARAN, V.; SHEPHERD, J.J. Osteoporosis in multiple endocrine neoplasia type 1: severity, clinical significance, relationship to primary hyperparathyroidism and response to parathyroidectomy. **Arch. Surg.**, v.134, n. 10, p.1119-1123, 1999.

BURGESS, J.R.; SHEPHERD, J.J.; PARAMESWARAN, V.; HOFFMAN, L.; GREENAWAY, T.M. Prolactinomas in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1: Clinical features and inheritance pattern. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.81, p.1841-1845, 1996.

CALENDER, A.; GIRAUD, S.; COUGARD, P.; CHANSON, P.; LENOIR, G.; MURAT, A. et al. Multiple endocrine neoplasia type 1 in France: clinical and genetic studies. **J. Intern. Med.**, v.238, p.263-268, 1995.

CARLING, T.; UDELSMAN, R. Parathyroid surgery in familial hyperparathyroid disorders. **J. Intern. Med.**, v. 257, n. 1, p.27-37, 2005.

CARON, P.; BECKERS, A.; CULLEN, D.R.; GOTH, M.I.; GUTT, B.; LAURBERG, P. et al. Efficacy of the new long-acting formulation of lanreotide (lanreotide autogel) in the management of acromegaly. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.87, p.4054-4058, 2002.

CARTY, S.E.; HELM, A.K.; AMICO, J.A.; CLARKE, M.R.; FOLEY, T.P.; WATSON, C.G.; MULVIHILL, J.J. The variable penetrance and spectrum of manifestations of multiple endocrine neoplasia type 1. **Surgery**, v. 124, p. 1106-1114, 1998.

CAVACO, B.M.; DOMINGUES, R.; BACELAR, M.C.; CARDOSO, H.; BARROS, L.; GOMES, L. et al. Mutational analysis of Portuguese families with multiple endocrine neoplasia type 1 reveals large germline deletions. **Clin. Endocrinol.**, v.56, p. 465-473, 2002.

CHANDRASEKHARAPPA, S.C.; TEH, B.T. Functional studies of the *MEN1* gene. **J. Intern. Med.**, v.256, p. 606-615, 1998.

CHANDRASEKHARAPPA, S.C.; GURU, S.C.; MANICKAM, P.; OLUFEMI, S.E.; COLLINS, F.S.; EMMERT-BUCK, M.R. et al. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia type 1. **Science**, v.276, p.404-407, 1997.

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.**, v. 47, n. 5, p. 507-512, 1997.

DALY, A.F.; RIXHON, M.; ADAM, C.; DEMPEGIOTI, A.; TICHOMIROVA, M.A.; BECKERS, A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 12, p. 4769-4775, 2006.

DELCORE, R.; FRIESEN, S.R. Gastrointestinal neuroendocrine tumors. **J. Am. Coll. Surg.**, v. 178, p. 187-211, 1994.

DONG, Q.; DEBELENKO, L.V.; CHANDRASEKHARAPPA, S.C.; LOTTREMAN, C.; SKARULIS, M.; EMMERT-BUCK, M.R. et al. Loss of heterozygosity at 11q13: Analysis of pituitary tumours, lung carcinoids, lipomas, and other uncommon tumours in subjects with familial multiple endocrine neoplasia type 1. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.82, p.1416-1420, 1997.

FAGGIANO, A.; TAVARES, L.B.; TAUCHMANOVA, L.; MILONE, F.; MANSUETO, G.; RAMUNDO, V. et al. Effect of treatment with depot somatostatin analogue octreotide on primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 1 patients. **Clin. Endocrinol.**, v.69, p.756-762, 2008.

FONTANIERE, S.; CASSE, H.; BERTONILO, P.; ZHANG, C.X. Analysis of p27(Kip1) expression in insulinomas developed in pancreatic beta-cell specific Men1 mutant mice. **Fam. Cancer**, v.5, n. 1, p.49-54, 2006.

GAGEL, R.F. Polyendocrine disorders: multiple endocrine neoplasia. In WILSON, J. D.; FOSTER, D. W. **Willians textbook of endocrinology**. 9th ed. Philadelphia: Saunders Company, 1998. p.1537-1542.

GEERDINK, E.A.; VAN DER LUIJT, R.B.; LIPS, C.J. Do patients with multiple endocrine neoplasia syndrome type 1 benefit from periodical screening? **Eur. J. Endocrinol.**, v.149, p. 577-582, 2003.

GEORGITSI, M.; RAITILA, A.; KARHU, A.; TUPPURAINEN, K.; MAKINEN, M.J.; VIERIMAA, O. et al. Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.104, n. 10, p. 4101-4105, 2007.

GIBRIL, F.; VENZON, D.J.; OJEABURU, J.V.; BASHIR, S.; JENSEN, R.T. Prospective study of the natural history of gastrinoma in patients with MEN1: definition of an aggressive and a nonaggressive form. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, p.5282-5293, 2001.

GIRAUD, S.; ZHANG, C.X.; SEROVA-SINILNIKOVA, O.; WAUTOT, V.; SALANDRE, J.; BUISSON, N. et al. Germ line mutation analysis in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 and related disorders. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 63, p. 455-446, 1998.

GOUDET, P.; COUGARD, P.; VERGES, B.; MURAT, A.; CARNAILLE, B.; CALENDER, A. et al. Hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 1: surgical trends and results of a 256-patient series from Groupe D'Etude des Neoplasies Endocriniennes Multiples Study Group. **World J. Surg.**, v.25, p. 886-890, 2001.

HAI, N.; AOKI, N.; MATSUDA, A.; MORI, T.; KOSUGI, S. Germline MEN1 mutations in sixteen Japanese families with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). **Eur. J. Endocrinol.**, v.141, p.475–480, 1999.

HEPPNER, C.; BILIMORIA, K.Y.; AGARWAL, S.K.; KESTER, M.; WHITTY, L.J.; GURU, S.C. et al. The tumor suppressor protein menin interacts with NF-kappaB proteins and inhibits NF-kappaB mediated transactivation. **Oncogene**, v. 20, p. 4917-4925, 2001.

HOFF, A.O.; COTE, G.J.; GAGEL, R.F. Multiple Endocrine Neoplasias. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 62, p.377-411, 2000.

HOFF, A.O.; GAGEL, R.F. Multiple endocrine neoplasia types 1 and 2: phenotype, genotype, diagnosis and therapeutic plan with special reference to children and adolescents. **Curr. Opin. Endocrinol. Diab.**, v.4, p.91-99, 1997.

HOFF, A.O.; HAUACHE, O.M. Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1: Diagnóstico Clínico, Laboratorial e Molecular e Tratamento das Doenças Associadas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.49, n. 5, p.735-746, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Estimativa 2012**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>>. Acesso em: 2 jun. 2013.

JAGER, A.C.; FRIIS-HANSEN, L.; HANSEN, T.V.; ESKILDSEN, P.C.; SOLLING, K.; KNIGGE, U. et al. Characteristics of the Danish families with Multiple endocrine Neoplasia Type 1. **Mol. Cell Endocrinol.**, v.249, p. 123-132, 2006.

JAP, T.S.; CHIU, C.Y.; WON, J.G.; WU, Y.C.; VHEN, H.S. Novel mutations in the MEN1 gene in subjects with Multiple Endocrine Neoplasia-1. **Clin. Endocrinol.**, v.62, p. 336-342, 2005.

JIN, S.; MAO, H.; SCHNEPP, R.W.; SYKES, S.M.; SILVA, A.C.; D'ANDREA, A.D. et al. Menin associates with FANCD2, a protein involved in repair of DNA damage. **Cancer Res.**, v.63, p.4204-4210, 2003.

KAJI, H.; CANAFF, L.; LEBRUN, J.J.; GOLTZMAN, D.; HENDY, G. N. Inactivation of menin, a Smad3- interacting protein, blocks transforming growth factor type signaling. **Proc Natl Acad Sci**, v.98, p.3837–3842, 2001.

KAMEYA, T.; TSUKADA, T.; YAMAGUCHI, K. Recent advances in MEN1 gene study for pituitary tumor pathogenesis. **Front. Horm. Res.**, v.32, p. 265-291, 2004.

KARNIK, S.K.; HUGHES, C.M.; GU, X.; ROZENBLATT-ROSEN, O.; MCLEAN, G.W.; XIONG, Y. et al. Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.102, n. 41, p.14659-14664, 2005.

KNUDSON, A.G. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.68, p.820-823, 1971.

KOUVARAKI, M.A.; SHAPIRO, S.E.; COTE, G.J.; LEE, J.E.; YAO, J.C.; WAGUESPACK, S.G. et al. Management of pancreatic endocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1. **World J. Surg.**, v.30, p.643-653, 2006.

LAIRMORE, T.C.; PIERSALL, L.D.; DEBENEDETTI, M.K.; DILLEY, W.G.; MUTCH, M.G.; WHELAN, A.J.; ZEHNBAUER, B. Clinical Genetic testing and early surgical intervention in patients with multiple endocrine neoplasia type 1(MEN 1). **Ann. Surg.**, v.239, p.637-647, 2004.

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**, v.332, p.85-87, 1988.

LEMMENS, I.; VAN DE VEN, W.J.M.; KAS, K.; ZHANG, C.X. ; GIRAUD, S. ; WAUTOT, V. et al. Identification of the Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. **Hum. Molec. Genet.**, v.6, p. 1177-1183, 1997.

LEMOS, M.C.; TRAKKER, R.V. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. **Hum. Mutat.**, v.29, p.22-32, 2008.

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.**, v.278, p.175-183, 2002.

LOSA, M.; MORTINI, P.; BARZAGHI, R.; GIOIA, L.; GIOVANELLI, M. Surgical treatment of prolactin-secreting pituitary adenomas: early results and long-term outcome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.87, p.3180-3186, 2002.

LOURENÇO JR, D.M.; COUTINHO, F.L.; TOLEDO, R.A.; CAVALCANTI, M.G. MONTENEGRO, F.; MACHADO, M.C. TOLEDO, S.P.A. Variabilidade clínica na Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM-1): Estudo em 39 casos. In: 27º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia, 2006, Recife. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, p. S639, 2006.

LOURENÇO Jr, D.M.; COUTINHO, F.L.; TOLEDO, R.A.; QUEDAS, E.; CAVALCANTI, M.G.; MONTENEGRO, F. et al. Hiperparatireoidismo Assintomático (HPTa) na Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM-1). **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, p. S608, 2006.

LOURENÇO JR, D.M.; TOLEDO, R.A.; MACKOWIAK, I.I.; COUTINHO, F.L.; CAVALCANTI, M.G.; CORREIA-DEUR, J.E.M. et al. Multiple endocrine neoplasia type 1 in Brazil: MEN1 founding mutation, clinical features, and bone mineral density profile. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 159, p. 259-274, 2008.

LOURENÇO-JR, D.M.; TOLEDO, R.A.; COUTINHO, F.L.; MARGARIDO, L.C.; SIQUEIRA, S.A.; DOS SANTOS, M.A. et al. The impact of clinical and genetic screenings on the management of the multiple endocrine neoplasia type 1. **Clinics**, v.62, n. 4, p. 465–476, 2007.

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

MARINI, F.; FALCHETTI, A.; LUZI, E.; TONELLI, F.; MARIA LUISA, B. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1) Syndrome. In: RIEGERT-JOHNSON, D. L.; BOARDMAN, L. A.; HEFFERON, T.; ROBERTS, M. (Ed.). **Cancer Syndromes**. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2009. Disponível em :<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7029/>>. Acesso em : 12 June 2013.

MARINI, F.; FALCHETTI, A.; DEL MONTE, F.; SALA, S.C.; GOZZINI, A.; LUZI, E.; BRANDI, M.L. Multiple endocrine neoplasia type 1. **Orphanet J. Rare Dis.**, v.1, n. 38, 2006.

MARX, S.; SPIEGEL, A.M.; SKARULIS, M.C.; DOPPMAN, J. L.; COLLINS, F. S.; LIOTTA, L. A. Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical and genetic topics. **Ann. Intern. Med.**, v.129, n. 6, p.484-494, 1998.

MARX, S.J. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. **Nat. Rev. Cancer**, v.5, p. 367-375, 2005.

MARX, S.J.; AGARWAL, S.K.; KESTER, M.B.; HEPPNER, C.; KIM, Y.S.; SKARULIS, M.C. et al. Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical and genetic features of the hereditary endocrine neoplasias. **Recent Prog. Horm. Res.**, v.54, p.397-438, 1999.

MASSIRONI, S.; SCIOLA, V.; PERACCHI, M.; CIAFARDINI, C.; SPAMPATTI, M. P.; CONTE, D. Neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. **World J. Gastroenterol.**, v.14, n. 35, p. 5377-5384, 2008.

MATSUZAKI, L.N.; CANTO-COSTA, M.; HAUACHE, O.M. Cushing's disease as first clinical manifestation of Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN 1) associated with R460X mutation of MEN 1 gene. **Clin. Endocrinol.**, v.60, p.142-143, 2004.

METZ, D.C.; JENSEN, R.T.; BALE, A.E.; SKARULIS, M.C.; EASTMAN, R.C.; NIEMAN, L. et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type I: clinical features and management. In: BILEZIKIAN, J.P.; LEVINE, M.A.; MARCUS, R. **The parathyroids**. New York: Raven Press, 1994. p. 591-646.

MILLER, C.A.; ELLISON, C. Therapeutic alternatives in metastatic neuroendocrine tumors. **Surg. Oncol. Clin. N. Am.**, v.7, p.863-879, 1998.

NEWY, P.J.; THAKKER, R.V. Role of multiple endocrine neoplasia type 1 mutational analysis in clinical practice. **Endocr. Pract.**, v.17, p.8-17, 2011.

NG, P. C.; HENIKOFF, S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. **Nucleic Acids Res.**, v.31, p. 3818-3814, 2003.

NORTON, J.; ALEXANDER, H.R.; FRAKER, D.L.; VENZON, D.J.; GIBRIL, F.; JENSEN, R.T. Does the use of routine duodenotomy (DUODX) affect rate of cure, development of liver metastases, or survival in patients with Zollinger-Ellison syndrome? **Ann. Surg.**, v. 239, p. 617-626, 2004.

NOWELL, P.C. Mechanisms of tumor progression. **Cancer Res.**, v. 46, p. 2203-2207, 1986.

OBERG, K., Pancreatic endocrine tumors. **Semin. Oncol.**, v.37, n. 6, p. 594-618, 2010.

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.**, v.282, p.1206–1210, 2001.

PANNETT, A.A.; THAKKER, R.V. Multiple endocrine neoplasia type 1. **Endocrine Related Cancer**, v. 6, p.449–473, 1999.

PANNETT, A.A.; THAKKER, R.V. Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson “two-hit” hypothesis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, p.4371-4374, 2001.

PELLEGATA, N.S.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; SIGGELKOW, H.; SAMSON, E.; BINK, K.; HOFER, H. et al. Germline mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine syndrome in rats and humans. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.103, p.15558-15563, 2006.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nucleic Acid Res.**, v. 29, p. e45, 2001.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. **Nucleic Acid Res.**, v.30, p. e36, 2002.

PIECHA, G.; CHUDEK, J.; WIECEK, A. Multiple Endocrine Neoplasia type 1. **Eur. J. Intern. Med.**, v.19, n. 2, p. 99-103, 2008.

SCHUSSHEIM, D.H.; SKARULIS, M.C.; AGARWAL, S.K.; SIMONDS, W.F.; BURNS, A.L.; SPIEGEL, A.M. et al. Multiple endocrine neoplasia type 1: new clinical and basic findings. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.12, p.173-178, 2001.

SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant, disponível em: < <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>>. Acesso em: 12 June 2013.

SKOGSEID, B. Plasma chromogranin A in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.84, p.2712-2717, 1999.

SKOGSEID, B.; ERIKSSON, B.; LUNDQVIST, G.; LORELIUS, L.E.; RASTAD, J.; WIDE, L. et al. Multiple endocrine neoplasia type 1: A 10- year prospective screening study in four kindreds. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.73, p.281-287, 1991.

SKOGSEID, B.; RASTAD, J.; OBERG, K. Multiple endocrine neoplasia type 1. Clinical features and screening. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v.23, p.1-18, 1994.

SOWA, H.; KAJI, H.; HENDY, G.N.; CANAFF, L.; KOMORI, T.; SUGIMOTO, T. et al. Menin is required for bone morphogenetic protein 2- and transforming growth factor beta-regulated osteoblastic differentiation through interaction with Smads and Runx2. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.40267-40275, 2004.

STENSON, P.D.; BALL, E.V.; MORT, M.; PHILLIPS, A.D.; SHIEL, J.A.; THOMAS, N.S. et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. **Hum. Mutat.**, v.21, p. 577-581, 2003.

STRATAKIS, C.A. ; TICHOMIROWA, M. A.; BOIKOS, S.; AZEVEDO, M. F.; LODISH, M.; MARTARI, M. et al. The role of germline AIP, MEN1, PRKAR1A, CDKN1B and CDKN2C mutations in causing pituitary adenomas in a large cohort of children, adolescents, and patients with genetic syndromes. **Clin. Genet.**, v.78,, n. 5, p. 457-463, 2010.

THAKKER, R.V. Genetics of endocrine and metabolic disorders: Parathyroid. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v.5, p.37-51, 2004.

THAKKER, R.V. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.24, p. 355-370, 2010.

THAKKER, R.V. Multiple endocrine neoplasia type 1. In: DEGROOT, L.; BESSER, G.M.; BURGER, H.G.; JAMESON, J. L. (Ed.) et al. **Endocrinology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. p.2815–2831.

THAKKER, R.V.; NEWAY, P.J.; WALLS, G.V.; BILEZIKIAN, J.; DRALLE, H.; EBELING, P.R. et al. Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 97, n. 9, p. 0000-0000, 2012.

THAKKER, R.V.; POOK, M.A.; WOODING, C.; BOSCARO, M.; SCANARINI, M.; CLAYTON, R.N. Association of somatotrophinomas with loss of alleles on chromosome 11 and with gsp mutations. **J. Clin. Invest.**, v.91, p.2815–2821, 1993.

TEH, B.T.; KYTÖLÄ, S.; FARNEBO, F.; BERGMAN, L.; WONG, F.K.; WEBER, G. et al. Mutation analysis of the MEN1 gene in multiple endocrine neoplasia type 1, familial acromegaly and familial isolated hyperparathyroidism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p.2621–2626, 1998.

TOLEDO, R.A.; LOURENCO Jr, D.M.; COUTINHO, F.L.; QUEDAS, E.; MACKOWIACK, I.; MACHADO, M.C.C. et al. Novel MEN1 germline mutations in Brazilian families with multiple endocrine neoplasia type 1. **Clin. Endocrinol.**, v. 67, p.377-384, 2007.

TONELLI, F.; MARCUCCI, T.; GIUDICI, F.; FALCHETTI, A.; BRANDI, M. L. Surgical approach in hereditary hyperparathyroidism. **Endocr. J.**, v. 56, n. 7, p. 827-841, 2009.

TONELLI, F.; FRATINI, G.; NESI, G.; TOMMASI, M.S.; BATIGNANI, G.; FALCHETTI, A.; BRANDI, M.L. Pancreatectomy in multiple endocrine neoplasia type 1-related gastrinomas and pancreatic endocrine neoplasias. **Ann. Surg.**, v.244, p.61-70, 2006.

TRIPONEZ, F.; GOUDET, P.; DOSSEH, D.; COURGARD, P.; BAUTERS, C.; MURAT, A. et al. Is surgery beneficial for MEN1 patients with small(≤ 2 cm), nonfunctioning pancreaticoduodenal endocrine tumor? An analysis of 65 patients from the GTE. **World J. Surg.**, v.30, p.654-662, 2006.

TRUMP, D.; FARREN, B.; WOODING, C.; PANG, J.T.; BESSER, G.M.; BUCHANAN, K.D. et al. Clinical studies of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). **Q. J. Med.**, v.89, p.653-669, 1996.

TSO, A.K.; RONG, R.; LO, C.Y.; TAN, K.C.; TIU, S.C.; WAT, N.M. et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1): genetic and clinical analysis in the Southern Chinese. **Clin. Endocrinol.**, v.59, p.129-135, 2003.

TUNER, J.J.; LEOTLELA, P.D.; PANNERR, A.A. ; FORBES, S. A.; BASSETT, J. H.; HARDING, B. et al. Frequent occurrence of an intron 4 mutation in multiple endocrine neoplasia type 1. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.87, p. 2688-2693, 2002.

VAN DER LELY, A. J.; HUTSON, R.K.; TRAINER, P.J.; BESSER, G.M.; BARKAN, A.L.; KATZNELSON, L. et al. Long-term treatment of acromegaly with pegvisomant, a growth hormone receptor antagonist. **Lancet**, v.358, p.1754-1759, 2001.

VARMUS, H.E. The molecular genetics of cellular oncogenes. **Annu. Rev. Genet.**, v.18, p.553-612, 1984.

VERGES, B.; BOUREILLE, F.; GOUDET, P.; MURAT, A. ; BECKERS, A. ; SASSOLAS, G. et al. A. Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1) : data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 2, p. 457-465, 2002.

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**, v.312, p. 1228-1230, 2006.

WAUTOT, V.; VERCHERAT, C.; LESPINASSE, L.; CHAMBE, B.; LENOIR, G.M.; ZHANG, C. X. et al. Germline 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.**, v.20, p.35- 47, 2002.

WERMER P. Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands. **Am. J. Med.**, v.16 p. 363-371, 1954.

WHITE, H. D.; BLAIR, J.; PINKNEY, J.; CUTHBERTSON, D. J.; DAY, R.; WEBER, A.; MACFARLANE, I. A. Improvement in the care of multiple endocrine neoplasia type 1 through a regional multidisciplinary clinic. **QJM**, v.103, n. 5, p. 337-345, 2010.

WILKINSON, S.; THE, B.T.; DAVEY, K.R.; McARDLE, J.P.; YOUNG, M.; SHEPHERD, J.J. Cause of death in multiple endocrine neoplasia type 1. **Arch. Surg.**, v.128, p.683-690, 1993.

YAGUCHI, H.; OHUKURA, N.; YAKAHASHI, M.; NAGUMURA, Y.; KITABAYASHI, I.; ISUKADA, T. Menin missense mutants associated with multiple endocrine neoplasia type 1 are rapidly degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. **Mol. Cell Biol.**, v.24, p. 6569-6580, 2004.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

Nome: _____
 Idade: _____ Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: () M () F
 Naturalidade: _____ Procedência: _____
 Endereço: _____
 Telefones: _____ Profissão: _____ Cor: _____
 _____ Escolaridade: _____

DADOS SOBRE A PESQUISA:

Título: “ESTUDO DO PERFIL MOLECULAR DO GENE *MEN1* EM PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 1, CORRELAÇÃO COM AGRESSIVIDADE TUMORAL, PERFIL CLÍNICO E RESPOSTA A TERAPÊUTICA FARMACOLÓGICA INSTITUÍDA”

Pesquisadores:

- **Daniel Pascoalino Pinheiro**, Biólogo formado pela Universidade Estadual do Ceará. Mestrando em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.
- **Michele Renata de Souza**, Médica Endocrinologista formada pelo Serviço de Endocrinologia e Diabetes do Hospital Universitário Walter Cantídio - Universidade Federal do Ceará. Especialista titulada pela SBEM.
- **Ana Rosa Pinto Quidute**, Médica Endocrinologista assistente do SED, coordenadora do ambulatório de neuroendocrinologia do SED, Mestre em Ciências Médicas pela USP. Especialista Titulada pela SBEM.

Nós pesquisadores estamos realizando um estudo que tem por objetivos:

- Analisar o perfil molecular de pacientes portadores de Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1, a partir de amostras de sangue periférico e de tumores mais frequentemente observados (paratireóide, gastoenteropancreáticos, hipofisário).

- Acompanhar regularmente os pacientes com diagnóstico de Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 do Serviço de Endocrinologia e Diabetes do Hospital Universitário Walter Cantídio conforme protocolo de seguimento clínico proposto tendo como base as recomendações científicas atuais.

ESCLARECIMENTOS AO PACIENTE SOBRE A PESQUISA

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo principal acompanhar a intervalos regulares todos os pacientes com diagnóstico de Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (NEM1) com a realização de exames clínicos, laboratoriais e de imagem disponíveis para identificação, acompanhamento e tratamento das principais manifestações encontradas nos portadores de NEM1 segundo recomenda o Consenso (orientação para conduta médica baseada na opinião de especialistas no assunto) para diagnóstico e tratamento de NEM1(2001), assim como demais evidências científicas atuais.

Após ser esclarecido e caso concorde em participar, será preenchido durante consulta ambulatorial de rotina um protocolo com dados pessoais de identificação (nome completo, sexo, data de nascimento, endereço e estado civil), assim como dados relacionados à sua doença (presença de sinais e sintomas – o que você está sentindo e alterações relacionadas à sua doença; tempo de diagnóstico – há quanto tempo sua doença foi descoberta; relato de outras doenças endócrinas ou não-endócrinas das quais você é portador; resultados de exames laboratoriais e de imagem por você realizados; detalhamento de todos os medicamentos em uso, relato de tratamentos como cirurgias anteriores, quimioterapia, radioterapia ou outros; histórico de doenças em sua família). O exame físico será realizado conforme rotina e dados importantes poderão ser inseridos na pesquisa. A revisão do seu prontuário será realizada para fins do estudo. Os exames solicitados durante os acompanhamentos ambulatoriais fazem parte da rotina indicada para NEM TIPO1, não sendo experimentais em nenhum aspecto. Não serão solicitados exames extras.

A pesquisa também tem o objetivo de estudar a molécula de DNA presente nas células do seu sangue periférico e do tecido tumoral por ocasião do procedimento cirúrgico (biópsias realizadas em cirurgias anteriores e em novas cirurgias, quando o procedimento cirúrgico for indicado por sua equipe clínico-cirúrgica para o tratamento de lesões tumorais). O seu material biológico (sangue e tecido tumoral) será utilizado para estudar e conhecer melhor a sua doença.

Para essa pesquisa, será necessária uma amostra de aproximadamente 4 ml (um tubo de coleta de sangue) de seu sangue periférico. Você realizará coleta de sangue através de punção venosa periférica (a partir de uma veia de seu braço), o que poderá levar a um leve desconforto no local de colocação da agulha. A coleta será realizada por profissional qualificado e todo material usado será descartável.

O benefício de tal estudo encontra-se na realização sistemática de todos os procedimentos necessários e disponíveis para o acompanhamento desta patologia de apresentação ampla. Os resultados desta pesquisa não mudarão o acompanhamento do seu caso. Entretanto, no futuro, este estudo poderá ajudar a melhorar o tratamento dos pacientes portadores de Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1.

Os dados coletados durante a pesquisa serão utilizados somente para fins deste estudo. Seus dados clínicos e resultados obtidos com este projeto serão publicados em revistas científicas e apresentados em congressos e reuniões científicas, sendo mantido sigilo quanto a sua identidade. A qualquer momento você poderá ter acesso aos resultados encontrados na pesquisa.

Suas dúvidas quanto a sua doença e a pesquisa serão respondidas. Caso você não queira participar ou queira desistir durante a pesquisa, não haverá nenhum problema e o seu acompanhamento e tratamento continuará da mesma forma, no nosso serviço, sem prejuízo ao seu cuidado. Você não terá nenhum gasto financeiro com essa pesquisa, tendo garantido o sigilo dos dados pessoais utilizados.

CONTATOS DOS RESPONSÁVEIS PELA PESQUISA

- Dra. Michele Renata de Souza (Pesquisadora) CRM 8524/ Telefone: (85) 8877-4497.

- Dr. Ana Rosa Pinto Quidute (Pesquisadora) CRM 7116- Universidade Federal do Ceará / Serviço de Endocrinologia e Diabetes do Hospital Universitário Walter Cantídio / Telefone: (85) 3366-8165.

Em caso de dúvida ou alguma consideração sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Ceará – Rua Coronel Nunes de Melo 1127, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8338 – E-mail: comepe@ufc.br

CONSENTIMENTO APÓS ESCLARECIMENTO

Declaro que li o termo de consentimento livre e esclarecido e fui esclarecido pelos pesquisadores, e que tive oportunidade de tirar minhas dúvidas quanto aos procedimentos e tudo que me foi explicado, e que concordo em participar da pesquisa conforme descrita acima e autorizo a realização de estudos genéticos em material biológico, isto é, autorizo o armazenamento, processamento e análise de amostras de sangue e de tecidos tumorais já retirados total ou parcialmente e/ou que venham a ser retirados total ou parcialmente durante procedimentos cirúrgicos quando indicados pela equipe médica do HUWC, desde que minha identificação seja mantida em sigilo.

Assinatura do paciente ou seu representante legal (se aplicável)

Data _____

Assinatura da testemunha (se aplicável)

Data _____

Nos casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva e ou visual.

Assinatura do responsável pela aplicação do TCLE

Data _____

ANEXO B

# Amostra	[] ng/μL	260/280	260/230
001	160,90	1,86	1,57
002	105,90	1,85	2,19
003	241,30	1,90	2,25
005	189,40	1,88	2,11
006	115,60	1,86	2,29
007	176,90	1,91	2,12
008	175,60	1,88	2,30
009	177,80	1,86	2,21
010	191,50	1,88	2,25
011	92,10	1,84	1,99
012	237,70	1,88	2,25
013	258,80	1,89	2,25
014	234,90	1,90	2,27
015	169,70	1,89	2,24
016	292,90	1,89	2,28
017	104,90	1,90	2,15
018	175,10	1,92	1,81
019	98,80	1,91	2,29
020	129,50	1,90	2,04
021	200,80	1,91	2,04
022	136,70	1,91	1,79
023	189,50	1,89	1,97
024	111,40	1,90	1,90
025	186,70	1,90	1,91
026	128,10	1,89	1,74
027	42,30	1,88	1,75
028	172,30	1,88	1,87
029	260,90	1,86	1,73
030	231,40	1,89	1,69
031	166,30	1,88	1,71
032	38,30	1,80	1,13
033	76,50	1,79	2,02
034	73,30	1,76	1,30
035	93,30	1,86	2,15
036	78,50	1,81	2,07
037	48,20	1,79	2,13
038	29,70	1,80	1,85
039	83,60	1,84	2,24
040	77,00	1,85	2,14
041	75,70	1,86	2,28
042	92,90	1,84	2,05
043	109,70	1,86	2,07
044	103,00	1,87	2,23

