

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

FLÁVIA MARQUES DE MELO

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES SUPRESSORES DE TUMOR *MEN1* E *AIP* EM
PROLACTINOMAS ASSOCIADOS A SÍNDROMES FAMILIAIS**

BELO HORIZONTE

OUTUBRO DE 2012

FLÁVIA MARQUES DE MELO

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES SUPRESSORES DE TUMOR *MEN1* E *AIP* EM
PROLACTINOMAS ASSOCIADOS A SÍNDROMES FAMILIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Medicina Molecular da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Luiz Armando De Marco

BELO HORIZONTE

OUTUBRO DE 2012

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Luiz Armando De Marco, por me receber em seu laboratório, por sua orientação, disponibilidade e paciência. Por me impulsionar ao mesmo tempo em que me mantem focada.

À Luciana Bastos Rodrigues que em mim acreditou e, generosamente, muito me ensinou. Pela amizade e compreensão.

A Marta Sarquis e Eduardo Dias por confiarem na qualidade do nosso trabalho e a seus pacientes que gentilmente concordaram em participar dessa pesquisa.

A Thiago Fonseca por me ensinar e auxiliar nos experimentos de perda de heterozigose.

Aos amigos do laboratório pelas excelentes discussões científicas, colaborações e pela deliciosa convivência.

Aos meus pais, irmãos, Pedro e família, por me apoiarem a buscar novos desafios e por tornarem a vida mais leve e prazerosa.

“Nossa maior fraqueza está em desistir.

O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez”.

Thomas Edison

RESUMO

Adenomas de hipófise são neoplasias benignas que ocorrem a partir da expansão de células específicas da adenohipófise. Estes tumores compreendem 10 a 15% de todos os tumores intracranianos. Os mecanismos patogênicos destes podem ocorrer em função de alterações genéticas ou epigenéticas, que resultam na desregulação do ciclo celular, alteração da sinalização intracelular ou perda de fatores supressores de tumor. O prolactinoma é o adenoma hipofisário mais frequente e pode causar infertilidade. No entanto, casos familiares da doença são raros e pouco entendidos. Portanto, a proposta deste trabalho foi realizar caracterizações moleculares de duas famílias com histórico de prolactinoma: a família 1, identificada como prolactinoma familiar isolado, e a família 2, um caso de neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (MEN1). Para isso, foram pesquisadas mutações em dois genes supressores de tumor, *AIP* e *MEN1*. DNA genômico foi extraído de integrantes hígidos e afetados das duas famílias estudadas. O sequenciamento foi realizado para os 9 exons codificantes de *MEN1*, e os 6 exons de *AIP*. Nenhuma variante foi detectada no gene *MEN1* nas amostras testadas de ambas as famílias. Também não foram detectadas mutações em *AIP* nos pacientes da família 1, mas o paciente portador de MEN1 apresentou a variante p.R16H. De acordo com os resultados desse trabalho, não há correlações entre mutações nos genes *MEN1* e *AIP* e o desenvolvimento de prolactinoma na família 1. O papel da variante p.R16H na progressão de MEN1 no paciente da família 2 necessita de maiores investigações.

Palavras-chaves: 1.Prolactinoma 2.Adenomas de hipófise 3.Neoplasia endócrina múltipla tipo 1 4.Genes supressores de tumor 5.*AIP* 6.*MEN1*

ABSTRACT

Pituitary adenomas are benign neoplasms that arise from the expansion of single cells from the adeno-pituitary. These tumors comprise 10 to 15% of all intracranial tumors. The pathogenic mechanisms of these tumors can be either genetic or epigenetic changes, resulting in the deregulation of cell cycle, signaling defects or loss of tumor suppressor factors. The prolactinoma is the most frequent pituitary adenoma, and may cause infertility. However, familial cases are rare and poorly characterized. Therefore, the propose of this work is to perform molecular characterization of two families that carry prolactinoma: family 1, which harbors familial isolated prolactinoma, and family 2, a familial multiple endocrine neoplasia type 1 case. We surveyed mutations in two tumor suppressor genes, *AIP* and *MEN1*. For this study, genomic DNA was extracted from affected as well as healthy members of both families. Sequencing was performed for the 9 coding exons of *MEN1*, and the 6 exons of *AIP*. Significant variants were not detected in *MEN1* for neither tested samples from both families. Unexpectedly, there were no mutations on *AIP* in family 1, but the multiple endocrine neoplasia type 1 patient has the genetic variation p.R16H in exon 1 of *AIP*. Considering the related results, no correlations were detected between mutations in the selected genes and prolactinoma development in family 1. The rule of p.R16H variant in pituitary adenoma development in family 2 patient needs further investigation.

Keywords: 1.Prolactinoma 2.Pituitary neoplasms 3.Multiple endocrine neoplasia type 1
4.Tumor suppressor genes 5.*AIP* 6.*MEN1*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte sagital esquemático da hipófise	14
Figura 2. Anatomia da adenohipófise e seus tipos celulares	15
Figura 3. Regulação da prolactina realizada pela dopamina.....	20
Figura 4. Tumorigênese adenohipofisária	26
Figura 5. Mecanismos de atuação da <i>menin</i> na tumorigênese adenohipofisária	30
Figura 6. Estrutura tridimensional de AIP	32
Figura 7. Mutações identificadas em AIP	35
Figura 8. Interações da proteína AIP.	36
Figura 9. Genealogia de família 1 portadora de prolactinoma familiar.	46
Figura 10. Genealogia da família 2 portadora de MEN1.	46
Figura 11. Alterações verificadas no exon 9 de <i>MEN1</i>	48
Figura 12. Eletroferogramas representativos dos polimorfismos A) c.1636A>G e B) c.1655A>G	49
Figura 13. Impacto de p.E552G (c.1655A>G) na estrutura tridimensional de <i>menin</i>	50
Figura 14. Análise de LOH amostra II.1 família 2.....	51
Figura 15. Mutação c.47G>A em AIP na amostra de sangue do paciente II.1 da família 2	52
Figura 16. Avaliação da alteração p.R16H na estrutura tridimensional de AIP	53
Figura 17. Mutação c.47G>A em AIP na amostra de tumor do paciente II.1 da família 2.....	53
Figura 18. Análise quaitativa do impacto da mutação p.R16H na atividade de AIP.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Hormônios adenohipofisários.....	15
Tabela 2. Regulação de hormônios hipofisários.....	18
Tabela 3. Classificação dos adenomas de hipófise.....	19
Tabela 4. Amostras utilizadas no trabalho.	39
Tabela 5. Pares de iniciadores para amplificação de <i>MEN1</i> utilizados no estudo.	43
Tabela 6. Pares de iniciadores para amplificação de <i>AIP</i> utilizados no estudo.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	-	Hormônio Adrenocorticotrófico
AIP	-	Aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein
<i>AIP</i>	-	Gene Aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein
AHR	-	Receptor aril hidrocarboneto
AMPC	-	Adenosina monofosfato cíclico
CEU	-	Caucasian/European: População europeia
CHB	-	Han Chinese: População chinesa
CNC	-	Complexo de Carney
CRH	-	Hormônio Liberador de Corticotrofina
D2R	-	Receptor dopaminérgico tipo D2
EZH2	-	Histona lisina metiltransferase
FIPA	-	Adenoma de hipófise familiar isolado
FSH	-	Hormônio Estimulador de Folículos
GHRF	-	Hormônio Liberador de Hormônio do Crescimento
GnRH	-	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
GPCRs	-	G Protein Coupled Receptors
HDACs	-	Histona deacetilase
hGH	-	Hormônio do Crescimento Humano
Hsp-90	-	Proteína heat shock 90
JPT	-	População japonesa
JunD	-	Fator de transcrição jun D proto-oncogene
kDa	-	Quilo Dalton

Kb	-	Quilo base
LH	-	Hormônio Luteinizante
LOH	-	Perda de heterozigose
MLL	-	Histona lisina metiltransferase
MEN1	-	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1
<i>MEN1</i>	-	Gene da Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1
MEN4	-	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 4
NF- κ B	-	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer de células B ativadas
pb	-	Pares de base
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
PDE4A5	-	Fosfodiesterase-4A5
PPAR γ	-	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
PRF	-	Fator liberador de prolactina
PRL	-	Prolactina
Prl-R	-	Receptor de prolactina
<i>RB1</i>	-	Gene do retinoblastoma
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SRIF	-	Somatostatina
TGF- β	-	Transforming growth factor beta
TPR	-	Domínio tetratricoptídeo
TRH	-	Hormônio Liberador de Tireotrofina
TSH	-	Hormônio Estimulador da Tireoide
VDR	-	Receptor de hormônio nuclear
VIP	-	Peptídeo Vasoativo Intestinal

YRI - Yoruba in Ibadan: População nigeriana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Características da adenohipófise	13
1.2 Funções dos hormônios adenohipofisários	15
1.3 Regulação dos hormônios adenohipofisários	17
1.4 Tumores da hipófise anterior.....	18
1.5 Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (MEN1).....	22
1.6 Adenomas de hipófise familiares isolados (FIPA): Prolactinoma	23
1.7 Tumorigênese dos adenomas de hipófise	25
1.8 Genes supressores de tumor.....	26
1.8.1 Gene da Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1: <i>MEN1</i>	27
1.8.2 Gene Aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein: <i>AIP</i>	31
2. OBJETIVO	37
3. MÉTODOS.....	38
3.1 Sujeitos	38
3.2 Coleta das amostras	38
3.3 Análises moleculares	39
3.3.1 Extração de DNA de sangue	39
3.3.2 Extração de DNA de tumor	40
3.3.3 Amplificação e sequenciamento das amostras.....	41
3.3.4 Análise de perda de heterozigose (LOH).....	44
4. RESULTADOS	45

4.1 Caracterização das famílias.....	45
4.2 Análise de mutações no gene <i>MEN1</i>	47
4.3 Análise de mutações no gene <i>AIP</i>	51
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO	62
7. REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características da adenohipófise

A hipófise é uma glândula de pequenas dimensões localizada na sela túrcica, uma cavidade óssea que ocorre na base do crânio (Atkinson, 2010). Embriologicamente essa glândula se origina de duas estruturas diferentes. Parte da hipófise possui origem ectodérmica e provem do teto da boca primitiva. Outra porção hipofisária possui origem neuronal e se expande a partir de uma extensão caudal do hipotálamo embrionário (Elster, 1993). Em consequência à dupla origem, a hipófise é dividida física e funcionalmente em duas regiões distintas: a hipófise anterior, de origem ectodérmica, denominada adenohipófise e a posterior, de origem neuronal, denominada neurohipófise (figura 1) (Melmed e Williams, 2011).

A adenohipófise é subdividida em três regiões distintas conforme sua morfologia. A *pars tuberalis* é uma região pouco vascularizada composta por células pequenas com função ainda desconhecida. Outra região, *pars intermedia*, é uma estrutura rudimentar que possui alguns tipos celulares característicos da *pars distalis*. Esta é a maior das regiões da hipófise, constituída por células glandulares dispostas em cordões espessos com grandes capilares que vascularizam ricamente as regiões intersticiais (Drummond *et al.*, 2003).

Na *pars distalis* encontram-se cinco tipos celulares altamente especializados na produção e secreção de hormônios (figura 2). Esses grupos celulares são nomeados de acordo com os hormônios tróficos que produzem. Somatotrofos são as células responsáveis pela secreção de hormônio do crescimento (hGH); os lactotrofos são células secretoras de prolactina (PRL); os corticotrofos produzem adrenocorticotrofina

(ACTH); gonadotrofos atuam na produção e secreção de hormônios gonadotróficos, que incluem o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH); e por fim, os tireotrofos são células secretoras de hormônio tireoestimulante (TSH) (Asa e Ezzat, 2002).

Esses grupos de células residem em regiões específicas da glândula e são altamente diferenciados e destinados, precocemente durante o desenvolvimento, a sintetizar produtos hormonais únicos. Os somatotrofos compreendem cerca de 50% das células da hipófise anterior, as células produtoras de PRL representam 10 a 25%, enquanto as produtoras de ACTH constituem de 10 a 20%. Assim como os gonadotrofos, os tireotrofos perfazem cerca de 10% do total de células da adenohipófise (Yeung *et al.*, 2006).

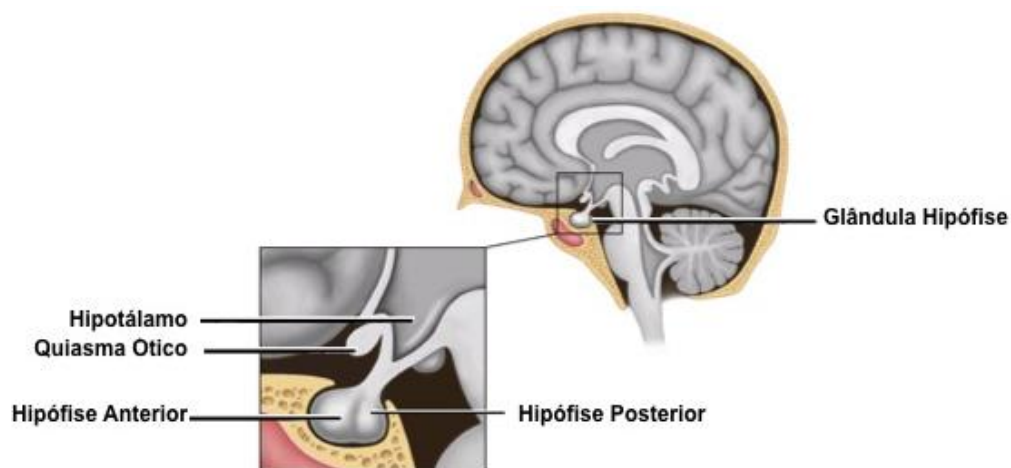


Figura 1. Corte sagital esquemático da hipófise. A glândula está situada na sela túrcica, logo abaixo do quiasma óptico, e conectada ao hipotálamo pela haste hipofisária. A hipófise ocupa cerca de 75% da sela túrcica normal e é dividida em dois lobos com origens embriológicas distintas, que são designados hipófise anterior e posterior (modificado de Basow DS, 2012).

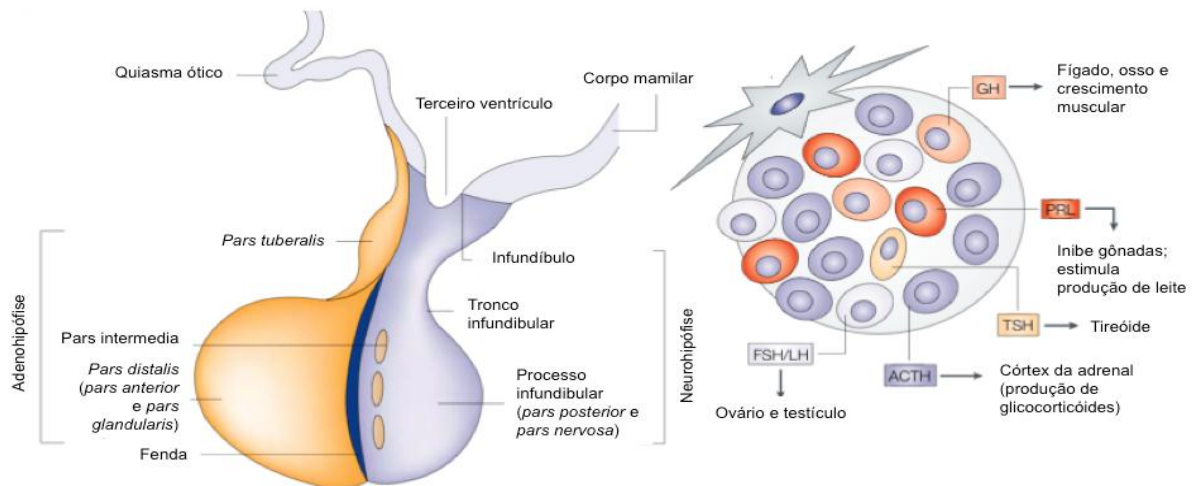


Figura 2. Anatomia da adenohipófise e seus tipos celulares. A adenohipófise é dividida em três regiões morfológicamente distintas. Em destaque, à direita, encontram-se os tipos celulares especializados na produção e secreção de hormônios que compõem a *pars distalis* (modificado de Asa e Ezzat, 2002).

1.2 Funções dos hormônios adenohipofisários

As funções da adenohipófise estão diretamente associadas aos hormônios por ela secretados. Estes atuam tanto em glândulas-alvo, como sistemicamente (tabela 1).

Tabela 1. Hormônios adenohipofisários.

Hormônio	Alvo	Função
hGH	Tecidos e órgãos	Crescimento linear/órgão
PRL	Glândulas mamárias	Lactação
ACTH	Córtex da adrenal	Homeostase celular
FSH e LH	Gônadas	Ovulação/espermatogênese
TSH	Tireoide	Proteica

O hormônio de crescimento é o peptídeo produzido em maior quantidade pela adenohipófise. Esse hormônio exerce um papel de destaque no crescimento ósseo e dos tecidos moles, particularmente no período pós-natal. hGH é um hormônio anabólico que atua no crescimento do organismo através da indução da síntese proteica, do número de mitoses e do aumento do tamanho das células (Carter-Su *et*

al., 1996). Em consequência a sua importância no desenvolvimento do organismo, variações séricas desse hormônio podem levar a distúrbios do crescimento. Sua deficiência pode resultar na ocorrência de nanismo (Boer, Blok e Van der Van, 1995), em contrapartida, sua hipersecreção se manifesta na forma de gigantismo ou acromegalia (Sano, Asa e Kovacs, 1988).

As ações do hormônio prolactina estão basicamente relacionadas aos processos reprodutivos do organismo. Dentre elas está sua atuação na glândula mamária, que é responsável pela síntese de proteínas, da lactose e de lipídeos, principais componentes do leite. Variações dos níveis séricos desse hormônio, quando em excesso, causam alterações menstruais, amenorréia, galactorréia e infertilidade em mulheres, bem como disfunção erétil e infertilidade em homens (Vieira, 2002).

O ACTH atua diretamente no córtex da glândula suprarrenal. Sua função primária é manter o tamanho da glândula, estrutura e atividade. Em consequência à sua ação na suprarrenal, o ACTH estimula a produção de cortisol, que atua no metabolismo das gorduras, proteínas e carboidratos (Wyllie *et al.*, 1973). O excesso da secreção de ACTH pode causar a doença de Cushing, que se caracteriza clinicamente por obesidade centrípeta, face em lua cheia, acne, hipertensão arterial e *diabetes mellitus*, dentre outros (Boscaro *et al.*, 2001).

LH e FSH agem nas gônadas estimulando a produção de hormônios esteróides (Medeiros e Medeiros, 2007). Deficiências nessas gonadotrofinas resultam em disfunção erétil e diminuição da libido em homens. Em mulheres, os sintomas associados são oligomenorréia ou amenorréia assim como mudanças no humor e insônia (Heys *et al.*, 1998).

Por fim, o TSH atua diretamente na regulação hormonal da tireóide (Rapoport *et al.*, 1998). Os sintomas e sinais mais frequentes do déficit de TSH no organismo são a sonolência, diminuição da concentração e memória, pele seca e intolerância ao frio (Lindsay, 1997). Sua hipersecreção é acompanhada de palpitações, arritmia, perda de peso e tremor (Alings *et al.*, 1998).

Esse envolvimento dos hormônios adenohipofisários em diversas funções do organismo requer um controle eficiente de seus níveis séricos. Isto para que não ocorram disfunções em consequência de sua hipo ou hipersecreção.

1.3 Regulação dos hormônios adenohipofisários

Os hormônios secretados pela hipófise estão sob influência de substâncias produzidas pelos núcleos hipotalâmicos (tabela 2). Essas são carregadas à hipófise anterior através de veias do sistema porta hipotálamo-hipofisário (Atkinson, 2010). As substâncias hipotalâmicas podem exercer efeitos inibitórios ou de liberação da secreção através da ativação de receptores únicos acoplados à proteína G (GPCRs) expressos em cada um dos tipos celulares residentes da adenohipófise (Melmed, 2003).

A secreção dos fatores e hormônios do hipotálamo sofre variações constantes de acordo com as necessidades fisiológicas do organismo. Essa regulação é realizada através da retroalimentação exercida por hormônios da hipófise anterior e por hormônios secretados por suas glândula-alvo (Atkinson, 2010). Apesar da regulação dos hormônios hipofisários ser eficiente, a hiperfunção hormonal pode ocorrer em consequência ao desenvolvimento de tumores adenohipofisários (Melmed, 2003).

Tabela 2. Regulação de hormônios hipofisários.

Hormônio	Regulação
hGH	GHRF(+) e SRIF(-)
PRL	PRF(+), dopamina(-), TRH(+) e VIP(+)
ACTH	CRH(+) e vasopressina (+)
FSH e LH	GnRH(+)
TSH	TRH(+) e SRIF(-)

(-) Sinais inibitórios (+) Sinais excitatórios (modificado de Melmed, 2003).

1.4 Tumores da hipófise anterior

A maioria dos tumores da hipófise são neoplasias benignas, também denominadas adenomas hipofisários. Estas originam-se de maneira monoclonal dos tipos celulares especializados na produção e secreção de hormônios que compõem a hipófise anterior (Wermer, 1954; Herman *et al.*, 1990). Apesar de terem características benignas, estas neoplasias são clinicamente significativas uma vez que podem resultar na hiperprodução hormonal da hipófise. Além disso, podem ocorrer efeitos de massa provocados pelo crescimento tumoral com compressão de estruturas adjacentes à hipófise (Vandeva *et al.*, 2010; Melmed e Williams, 2011). Esse efeito de massa é observado em alguns pacientes nos quais o crescimento supra selar dos tumores causa a compressão dos nervos, quiasma e trato ópticos e resultam em uma ampla variedade de alterações visuais (Ikeda e Yoshimoto, 1995; Asa e Ezzat, 2002).

A classificação dos tumores hipofisários é baseada em suas características morfológicas e funcionais. Morfológicamente, os tumores hipofisários são classificados como microadenomas (diâmetro inferior a 10mm) e macroadenomas (diâmetro superior a 10mm). Funcionalmente, essas neoplasias são classificadas de acordo com os hormônios que secretam em quantidade suficiente para induzir manifestações clínicas (tabela 3) (Bronstein e Melmed, 2005).

Tabela 3. Classificação dos adenomas de hipófise.

Tipo celular	Hormônio	Adenoma desenvolvido
Somatotrofo	GH	Somatotrofinoma
Lactotrofo	PRL	Prolactinoma
Corticotrofo	ACTH	Adenoma corticotrófico
Gonadotrofo	LH ou FSH	Gonadotrofinoma
Tireotrofo	TSH	Tireotrofinoma

(modificado de Melmed e Williams, 2011).

O prolactinoma, adenoma originado das células produtoras de PRL é o adenoma hipofisário mais frequente. Os prolactinomas são responsáveis por disfunções no eixo hipotálamo-hipófise- gonadal em ambos os sexos. Podem também levar a alterações neurológicas quando se apresentam como macroadenomas hipofisários. Embora a PRL seja diretamente relacionada à lactação e com seus efeitos gonadais, ela tem uma grande diversidade de ações que, somadas, são mais numerosas que as promovidas por todos os outros hormônios da adenohipófise combinados. Dentre essas atividades da PRL destacam-se seu papel no balanço hidroeletrólítico e na imunorregulação. Em humanos, a PRL ainda estimula o metabolismo de carboidratos e a síntese de fosfolipídios. Além de atuar na regulação dessas atividades metabólicas, a PRL também parece estar envolvida no comportamento parental de alguns vertebrados (Freeman *et al.*, 2000).

Os sintomas manifestados em prolactinomas ocorrem em consequência ao desequilíbrio na regulação de PRL. Ao contrário dos outros hormônios da adenohipófise, a regulação da PRL é predominantemente inibitória, exercida pela dopamina. Esta atinge a hipófise através do sistema porta-hipofisário e ativa os receptores dopaminérgicos do subtipo D2 localizados nos lactotrofos. Esse processo

leva a uma série de eventos de sinalização intracelular que, por fim, inibem a síntese e secreção de PRL (figura 3) (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 2000).

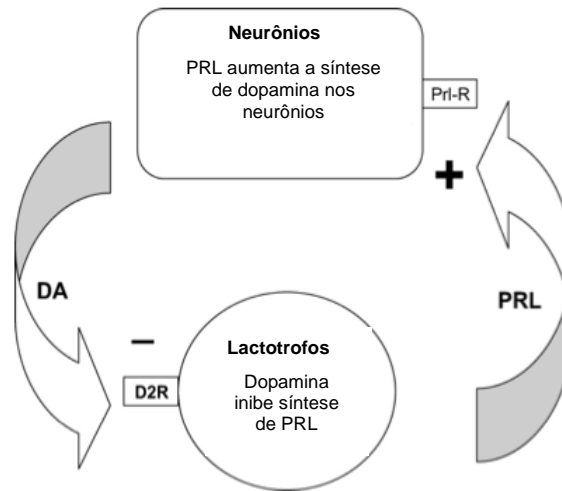


Figura 3. Regulação da prolactina realizada pela dopamina. Assim como os lactotrofos possuem receptores dopaminérgicos (D2R), neurônios produtores de dopamina expressam em sua membrana extracelular receptores para PRL (PrI-R). Desta maneira, excessos na secreção de PRL sensibilizam os neurônios, que por sua vez, promovem a liberação de dopamina. Em consequência, a dopamina liga-se a D2R localizado nos lactotrofos e inibe a produção e secreção de PRL (modificado de Freeman *et al.*, 2000).

Gigantismo e acromegalia são causados por adenoma secretor do hormônio de crescimento. Adenomas produtores de ACTH podem ser clinicamente inativos ou resultar nas Síndromes de *Cushing* ou *Nelson*. Adenomas que liberam TSH são raros e conhecidos como adenomas secretores de hormônio tireotrófico. Adenomas secretores de gonadotrofinas estão associados ao hipo e hipergonadismo. Ainda existem adenomas secretores tanto de GH quanto de PRL (Melmed e Williams, 2011).

Os adenomas de hipófise compreendem de 10 a 15% de todos os tumores intracranianos (DeLellis, 2004). De acordo com Vandeva *et al.* (2010), adenomas

hipofisários são o segundo tipo de tumor intracraniano mais frequente em adultos jovens nos Estados Unidos da América. Em um estudo de meta-análise observou-se uma ocorrência de 16,7% desses tumores em resultados de autópsia e radiologia (Ezzat *et al.*, 2004).

Em uma abordagem populacional realizada na província de Liege, Bélgica, a prevalência de adenomas hipofisários foi estimada em 1:1.064, distribuída da seguinte forma: 66,2% dos adenomas de hipófise eram prolactinomas (secretores de PRL), 14,7% foram caracterizados como tumores não-secretores, 13,2% eram somatotrofinomas (secretores de hGH) e 5,9% adenomas corticotróficos (secretores de ACTH) (Daly *et al.*, 2006a). Em um estudo semelhante realizado em Banbury, no Reino Unido, onde 81.449 habitantes foram avaliados, observou-se a prevalência de aproximadamente 7:10.000. Além de apresentarem prevalências semelhantes, ambos os estudos listam o prolactinoma como o tipo de adenoma mais frequente (Fernandez *et al.*, 2010).

Não há diferença na ocorrência de adenomas de hipófise em relação ao sexo, mas observam-se taxas de incidência maior em mulheres jovens e em homens adultos. Além disso, o tamanho médio dos tumores diagnosticados em pacientes do sexo masculino é maior que o encontrado em mulheres. Existe relação entre a ocorrência do tumor e ancestralidade dos pacientes, onde pacientes de origem afro-americana possuem tendência maior a desenvolverem tumores de hipófise (McDowell *et al.*, 2011).

Apesar da grande maioria dos tumores adenohipofisários (95%) ocorrerem de forma esporádica, ou seja, sua presença é restrita a alguns indivíduos independentemente de seu histórico familiar, há registros da ocorrência de casos

familiares da doença. São assim caracterizados aqueles em que tumores na adenohipófise ocorrem em mais de dois indivíduos de uma mesma família que apresentam fisiopatologias semelhantes ou não, com características genéticas em comum (Pinho *et al.*, 2010).

Dentre as síndromes em que ocorrem adenomas de hipófise familiares estão a Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (MEN1), os adenomas de hipófise familiares isolados (FIPA), a Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 4 (MEN4) e o Complexo de Carney (CNC) (Trivellin, 2011). Os dois primeiros são o foco desse trabalho e serão abordados em detalhe a seguir.

1.5 Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (MEN1)

A neoplasia endócrina múltipla tipo 1 é uma doença autossômica dominante caracterizada pelo desenvolvimento de tumores em mais de uma glândula endócrina (Thakker *et al.*, 2012). Nessa síndrome ocorre a combinação entre tumores das paratireoides, ilhotas pancreáticas e hipófise anterior. Estima-se que a prevalência de MEN1 seja de 0,01 a 2,5 por 1.000 indivíduos. A penetrância dessa síndrome varia, mas chega a atingir 94% aos 50 anos (Chandrasekharappa *et al.*, 1997). As manifestações clínicas da doença estão relacionadas aos órgãos afetados e podem incluir efeitos de massa devido ao tamanho do tumor, hipersecreção hormonal e malignidade (Marx *et al.*, 1999).

MEN1 é considerada familiar quando um indivíduo que apresenta MEN1 possui no mínimo um parente de primeiro grau com tumor em pelo menos um dos três órgãos mais frequentemente afetados na síndrome (Schussheim *et al.*, 2001).

O hiperparatiroidismo ocorre em mais de 90% dos casos, já os tumores pancreáticos em 30 a 80% e adenomas de hipófise em 20 a 50% dos episódios (Wermer, 1954). Apesar dos tumores da paratireóide serem a primeira manifestação de MEN1 na maioria dos pacientes, o insulinoma ou adenomas de hipófise ocorrem como primeira manifestação nos casos restantes. Aproximadamente 60% dos adenomas de hipófise que ocorrem em MEN1 são secretores de PRL, menos de 25% secretam hGH, 5% liberam ACTH, e o restante parecem ser não-funcionais (Thakker *et al.*, 2012).

O tratamento de MEN1 é complexo e a cura é difícil. Os pacientes frequentemente necessitam de várias intervenções médicas e cirúrgicas ao longo de suas vidas, já que os tumores têm alto potencial recidivante e causam síndromes hormonais importantes (Marx *et al.*, 1999). Pacientes diagnosticados com MEN1, mas não tratados, têm uma expectativa de vida reduzida, com probabilidade de 50% de morte aos 50 anos. Além disso, aproximadamente 70% dos pacientes portadores de MEN1 morrem de causas relacionadas à síndrome (Goudet *et al.*, 2010).

Apesar dos adenomas produtores de prolactina serem os mais prevalentes dentre os tumores da hipófise associados à MEN1, a ocorrência de prolactinomas familiares isolados também já foi descrita (Berezin e Karasik, 1995).

1.6 Adenomas de hipófise familiares isolados (FIPA): Prolactinoma

Adenomas de hipófise familiares isolados são assim caracterizados quando ocorrem em mais de dois indivíduos de uma mesma família, mas não estão associados a síndromes, como a neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (Daly *et al.*, 2006b). Assim como esta, a FIPA é herdada de maneira autossômica dominante; no entanto, possui

penetrância incompleta. A ocorrência de FIPA pode ser homogênea, quando o mesmo tipo de adenoma é verificado nos indivíduos afetados da família, ou heterogênea, assim denominada quando há manifestação de tipos diferentes de adenomas (Beckers e Daly, 2007).

Dos 5% de casos familiares de adenomas de hipófise estudados, estima-se que 3% ocorram em MEN1 e o restante é diagnosticado como adenoma de hipófise familiar isolado. A frequência da ocorrência dos diferentes tipos de adenomas de hipófise familiares é estabelecida na seguinte ordem: prolactinomas (41%), somatotrofinomas (30%), tumores não-secretores (13%), somato-lactotrofinomas (7%), gonadotrofinomas (4%), doença de Cushing (4%) e, mais raros, os tireotrofinomas (1%) (Daly *et al.*, 2009).

As manifestações clínicas dos prolactinomas familiares diferem moderadamente dos prolactinomas esporádicos. Em casos familiares indivíduos mais jovens são afetados; no entanto, microadenomas continuam a ser mais frequentes em mulheres e macroadenomas estão presentes, em sua maioria, em pacientes do sexo masculino (Daly *et al.*, 2009).

Através do conhecimento a respeito das vias de regulação da PRL, medicamentos que mimetizam a ação da dopamina têm sido administrados como principal tratamento para os prolactinomas. Esses agonistas dopaminérgicos são capazes de normalizar os níveis séricos de PRL e promover a redução da massa tumoral. Sabe-se que a maioria dos pacientes submetidos a essa terapêutica, cerca de 85 a 90%, respondem bem ao tratamento (Molitch, 2003).

No entanto, é necessário compreender por que alguns pacientes são resistentes a esse tipo de tratamento. Para isso, é importante conhecer os mecanismos que levam ao desenvolvimento de prolactinomas (Bronstein e Melmed, 2005).

1.7 Tumorigênese dos adenomas de hipófise

Embora os tumores hipofisários sejam de ocorrência frequente, os mecanismos que levam ao desenvolvimento destas lesões ainda não são bem caracterizados (Sonabend *et al.*, 2006). A tumorigênese é o processo constituído de múltiplas etapas que determinam a transformação progressiva de células normais em células malignas (Hanahan e Weinberg, 2000).

Adenomas da hipófise são tumores monoclonais, uma vez que para cada tipo de célula afetada, um adenoma diferente é desenvolvido. Esse fato sugere que, provavelmente, alterações somáticas precedem a expansão clonal das células e esse seria um evento fundamental na tumorigênese adenohipofisária (Asa e Ezzat, 2002).

Essas alterações somáticas diferem das usualmente encontradas em outras neoplasias humanas e são especificamente relacionadas à tumorigênese hipofisária. Apesar de ser considerado um mecanismo complexo, alguns genes relacionados a esse processo foram identificados (Asa e Ezzat, 1998). Acredita-se que um dos possíveis mecanismos seja a inativação de genes supressores de tumor. Estes poderiam levar a uma vantagem reprodutiva nas células, que por consequência, sofreriam expansão clonal (figura 4).

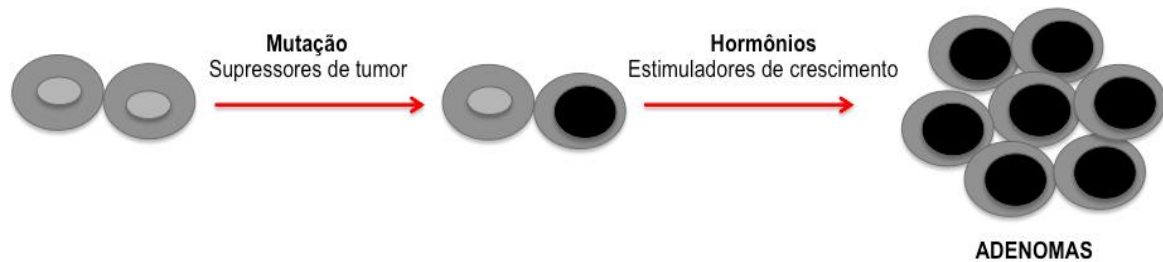


Figura 4. Tumorigênese adenohipofisária. Representação gráfica da teoria de expansão clonal em consequência a uma mutação que leva a vantagens proliferativas e ao desenvolvimento do adenoma. Células marcadas de preto são aquelas que sofreram alteração, neste caso, inativação de supressores de tumor (modificado de Asa e Ezzat, 1998).

1.8 Genes supressores de tumor

Supressores de tumor são genes que regulam negativamente o ciclo celular, desacelerando a mitose. Quando íntegros, os genes supressores de tumor reduzem a chance de uma célula se tornar um tumor (Berger *et al.*, 2011). Dessa maneira, mutações ou deleções envolvendo mecanismos genéticos ou epigenéticos podem levar a inativações de tais genes e consequente progressão tumoral.

Em 1971 Knudson elaborou uma teoria para explicar o papel desses genes supressores de tumor no desenvolvimento das neoplasias familiares, também conhecida como teoria *two hit*, ou dos dois eventos mutacionais (Knudson, 1971). O primeiro evento é uma mutação germinativa em heterozigose em determinado gene. O segundo evento consiste na perda somática do alelo normal restante do mesmo gene, chamada de perda de heterozigose (LOH). A ocorrência desses dois eventos leva à inativação completa da proteína supressora de tumor, o que resulta no descontrole do ciclo celular e, por fim, no desenvolvimento de neoplasias. De acordo com a teoria, uma mutação em heterozigose em um gene supressor de tumor predis põe o paciente

à doença, mas esta desenvolve-se somente após a inativação do segundo alelo nas células dos tecidos-alvo.

Knudson elaborou sua teoria a partir da observação de famílias portadoras de retinoblastoma, uma doença tumoral com apresentação clínica esporádica ou familiar. Tais pacientes, além de manifestações clínicas, possuíam mutações no gene *RB1*, o primeiro supressor de tumor a ser clonado (Friend *et al.*, 1986). Esse gene codifica a proteína retinoblastoma que inibe a transcrição de genes essenciais da passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Wu *et al.*, 1995).

O mecanismo para o desenvolvimento de retinoblastoma sugerido por Knudson é compatível com um padrão de herança dominante, assim como o que ocorre em MEN1 e em prolactinomas familiares isolados. Com base nas semelhanças entre essas doenças, alterações heterozigóticas do gene do retinoblastoma, *RB1*, também foram avaliadas em tumores de hipófise. No entanto, mutações em *RB1* não foram observadas em adenomas de hipófise humanos (Zhu *et al.*, 1994).

Por outro lado, estudos nessa área verificaram a perda de heterozigose em outra região, localizada no braço longo do cromossomo 11. Neste local, dois genes supressores de tumor foram associados ao desenvolvimento de prolactinomas familiares, são eles o *MEN1* e o *AIP* (Melmed e Williams, 2011). A relevância e a função destes genes serão apresentados a seguir.

1.8.1 Gene da Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1: *MEN1*

O gene *MEN1* está localizado no braço longo do cromossomo 11, região 1, sub-região 3 (11q13). Esse gene possui 9,2 Kb e consiste em 10 exons que codificam uma proteína de 610 aminoácidos chamada *menin* (Chandrasekharappa, 1997). Análises do

gene *MEN1* em pacientes portadores da síndrome MEN1 familiar documentaram a ocorrência de mutações germinativas. A partir desses trabalhos, foi possível observar que essas mutações germinativas ocorrem em associação à LOH nos tumores de MEN1. Este fenômeno fundamenta a hipótese de que *MEN1* é um gene supressor de tumor. Aproximadamente 75 a 95% dos pacientes portadores de MEN1 apresentam alterações em regiões codificantes do gene *MEN1* (Thakker *et al.*, 2012). Tais mutações foram descritas com alta frequência, inclusive em pacientes brasileiros (Toledo *et al.*, 2007).

Para determinar a associação entre mutações em *MEN1* e a ocorrência da neoplasia endócrina múltipla tipo 1, foram utilizados modelos animais, onde observou-se que camundongos mutados homocigotos para o gene *MEN1* (*MEN1*^{-/-}) morrem ainda durante seu desenvolvimento no útero. Já os animais que apresentam mutação do gene *MEN1* em heterocigose (*MEN1*^{+/-}) desenvolvem características semelhantes à síndrome MEN1. Estes animais apresentam tumores no pâncreas e adenomas da paratireóide aos 9 meses e, aos 16 meses, são observados tumores no córtex da adrenal e na hipófise (Crabtree *et al.*, 2001).

Atualmente, mais de 1.300 mutações em *MEN1* já foram descritas. Destas, 1.133 foram identificadas como germinativas. Em contrapartida, alterações somáticas foram notificadas em menor escala. Das alterações germinativas, 75% ocorrem em regiões codificantes ou de *splice* e levam à inativação da proteína (Lemos e Thakker, 2008).

A proteína codificada por *MEN1*, *menin*, é expressa de forma variável tanto nos tecidos endócrinos como em tecidos não-endócrinos (Ikeo *et al.*, 2000). Há evidências

de que *menin* se localize no núcleo, porém pode também ser encontrada no citoplasma durante a divisão celular (Huang *et al.*, 1999). Sabe-se que *menin* interfere no sistema de reparo de DNA. Tratamentos químicos em células de pacientes com MEN1 apresentam maiores taxas de alterações cromossômicas espontâneas e mitoses com divisões centroméricas prematuras (Scappaticci *et al.*, 1991). Além disso, células que superexpressam *menin* possuem atraso em seu ciclo celular (Ikeo *et al.*, 2000). Não se sabe, no entanto, o papel exato da proteína *menin* na tumorigênese adenohipofisária, mas interações importantes desta já foram descritas e alguns modelos foram propostos (Lemos e Thakker, 2008).

Menin participa da proliferação celular ao se ligar a JunD, um fator de transcrição, e inibir sua atividade transcricional. Algumas mutações já identificadas em *MEN1* interrompem a interação *menin*-JunD e estimulam a expressão de genes envolvidos na proliferação celular. No mesmo sítio onde a *menin* se liga a JunD esta também se liga a MLL, uma metiltransferase de lisina 4 da histona H3 que atua na regulação da transcrição gênica (Huang *et al.*, 2012; Lips *et al.*, 2012). Outras interações de *menin* foram identificadas e também associadas à proliferação celular, conforme descrito na figura 5.

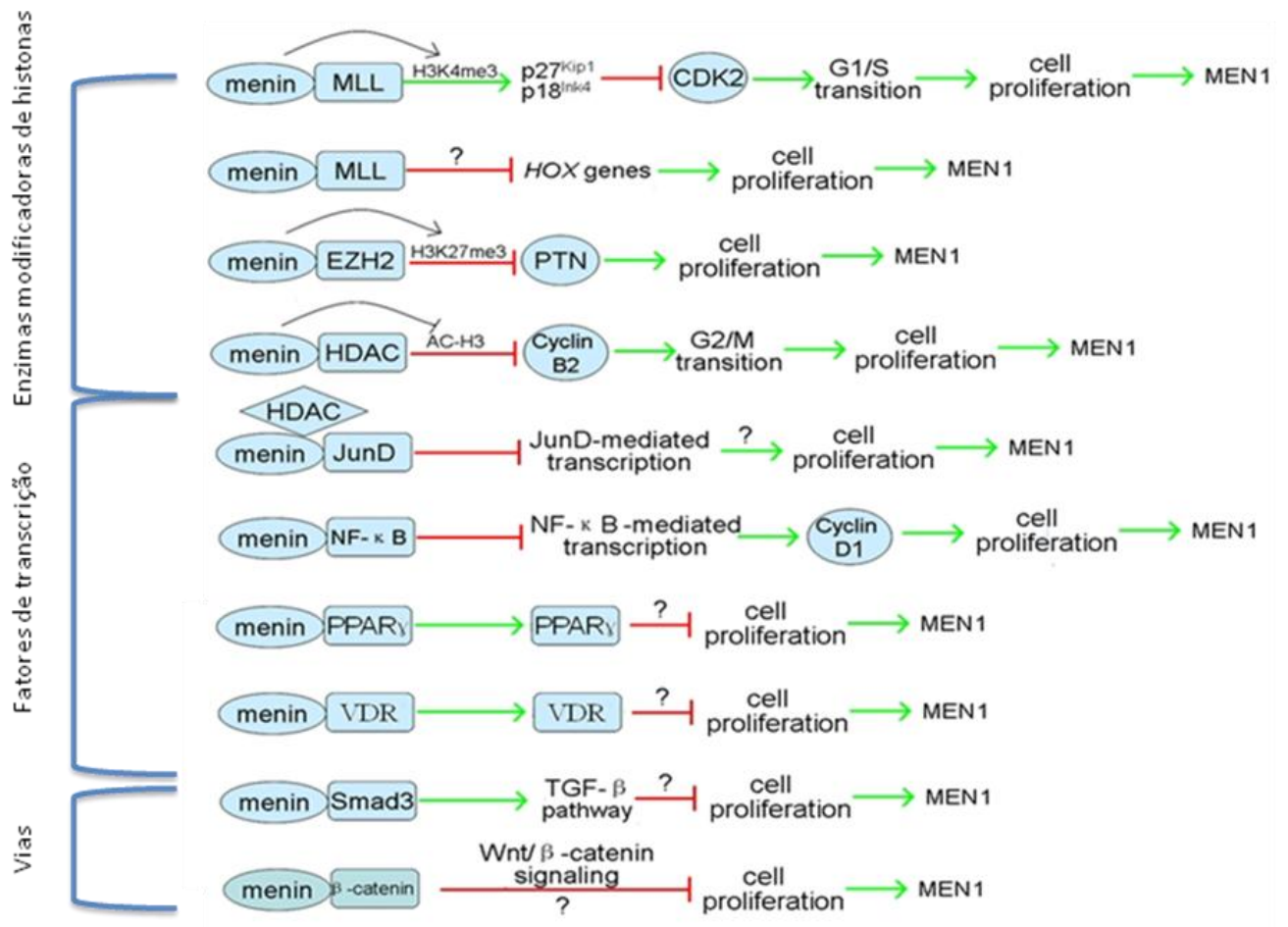


Figura 5. Mecanismos de atuação da *menin* na tumorigênese adenohipofisária. *Menin* interage com enzimas modificadoras de histonas, assim como MLL, EZH2 e HDACs, desta maneira afeta a transcrição gênica e reprime a proliferação celular. Além de JunD, *menin* também se liga a NF- κ B, PPAR γ e VDR, fatores de transcrição que regulam a progressão do ciclo celular. Da mesma maneira, *menin* inibe a proliferação celular via sinalização de TGF- β e Wnt/ β -catenina. Inativações de *menin* promovidas por mutações em *MEN1* levam à desregulação dessas vias e promovem a proliferação celular (Wu e Hua, 2011).

1.8.2 Gene Aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein: AIP

Assim como *MEN1*, o gene *AIP* está localizado no braço longo do cromossomo 11, região 1, sub-região 3 (11q13) (Carver *et al.*, 1998). *AIP* é formado por 330 aminoácidos que totalizam 6 exons. A proteína resultante é um supressor de tumor que possui 37kDa (figura 6) e localiza-se no citoplasma celular (Meyer *et al.*, 1998). O gene *AIP* é altamente conservado entre as espécies. Sua sequência primária apresenta similaridade de 100, 94 e 93% em chimpanzés, camundongos e ratos, respectivamente (Trivellin e Korbonits, 2011).

Mutações em *AIP* (figura 7) foram associadas a casos familiares de somatotrofinomas e prolactinomas (Vierimaa *et al.*, 2006). As primeiras observações de mutações na região cromossômica de *AIP* foram descritas em pacientes portadores de somatotrofinoma antes mesmo da descrição do gene em 2006 (Soares, Eguchi e Frohman, 2005). Até 2010, 167 casos familiares isolados de adenoma de hipófise haviam sido analisados para mutações em *AIP*. Destes, 22% apresentaram mutações (Chahal *et al.*, 2010). Em geral, pacientes portadores de mutações em *AIP* são predominantemente homens. A apresentação de sintomas é observada ainda na infância em 50% dos casos. Além disso, prolactinomas *AIP*-mutados requerem, em sua maioria, cirurgia ou radioterapia (Daly *et al.*, 2010).

Adenomas de hipófise em decorrência de mutações em *AIP* possuem penetrância reduzida, ou seja, a frequência de ocorrência de tumores de hipófise entre indivíduos adultos portadores dessas mutações é de aproximadamente 30%. Outra característica de famílias que apresentam mutações em *AIP* é a heterogeneidade dos tumores de hipófise desenvolvidos entre indivíduos (Naves, 2007). Ainda não está claro como mutações em *AIP* levam ao desenvolvimento de adenomas na hipófise,

mas sua função na homeostase celular tem sido bastante pesquisada (Igreja *et al.*, 2010).

Estudos identificaram a ocorrência de três domínios tetratricoptídeo (TPR) na porção C-terminal de AIP, conforme demonstrado na figura 6 (Trivellin e Korbonits, 2011). Estes são domínios de 34 aminoácidos organizados em repetições em *tandem* que formam duas α -hélices, as quais originam uma estrutura anfipática antiparalela. De acordo com esses trabalhos, são as regiões TPRs que caracterizam as interações e funções de AIP.

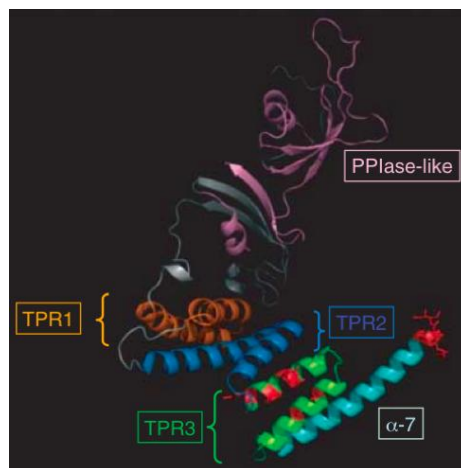


Figura 6. Estrutura tridimensional de AIP. Proteína contendo 330 aminoácidos que totalizam peso molecular de 37KDa. Destaca-se as três regiões de domínios tetratricoptídeo (TPR). Estas parecem ser as regiões de interação que conferem a AIP sua função (Trivellin, 2011).

Sabe-se que a proteína citoplasmática AIP atua na estabilização de um complexo formado por AHR (receptor aril hidrocarboneto) e a chaperona Hsp-90. AHR é conhecido como um fator de transcrição que, na presença de AIP, é mantido inativado no citoplasma. A

ligação de toxinas nesse complexo leva à sua instabilidade e translocação ao núcleo. No núcleo, AIP se desprende de AHR e retorna ao citoplasma, enquanto AHR interage diretamente com regiões promotoras de DNA regulando a transcrição de diversos genes (Meyer *et al.*, 2000; Chahal *et al.*, 2010).

Além de estabilizar AHR, AIP também parece estar envolvido na via de sinalização do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPC). A interação *in vitro* de AIP com PDE4A5, uma fosfodiesterase dependente de AMPC foi recentemente verificada e sustenta tal suposição. PDE4A atua na regulação dos níveis de AMPC através da sua degradação, e assim, regula processos como a proliferação celular. Em ensaios experimentais, foi possível perceber que a expressão de *AIP* mutante em linhagem celular derivada de adenoma de hipófise leva à perda da capacidade proliferativa das mesmas. Quando avaliadas individualmente, diferentes mutações que desencadearam esses efeitos também levam à ruptura da interação proteína-proteína entre AIP e PDE4A5 (Leontiou *et al.*, 2008). A figura 8 ilustra as vias descritas de sinalização de AIP.

A determinação de como ocorre a tumorigênese adenohipofisária é um processo complexo e que frequentemente envolve a inativação de um dos dois genes supressores de tumor descritos, *MEN1* e *AIP*. Apesar de raros, os eventos familiares de adenomas de hipófise constituem uma área de pesquisa interessante para que seja feita a identificação dos fatores genéticos comuns intra-familiares que possam levar ao desenvolvimento de tumores. Além de aprofundarem o conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese hipofisária, esse tipo de estudo auxilia no desenvolvimento de ferramentas genéticas para análise da predisposição a

esses tumores que poderiam, eventualmente, serem incorporadas à clínica. Neste trabalho foram avaliadas alterações nos genes supressores de tumor, *MEN1* e *AIP* em casos de prolactinoma familiar.

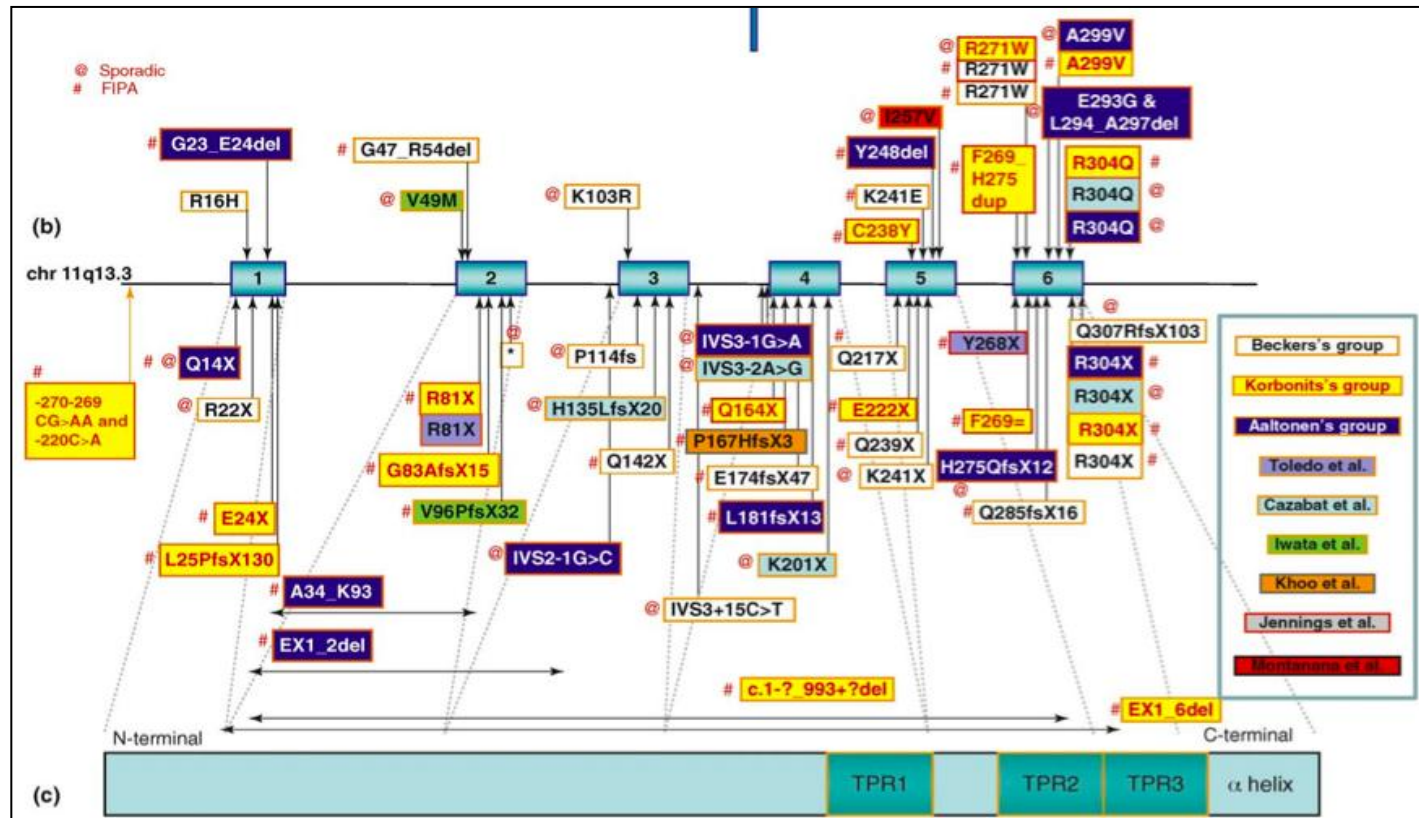


Figura 7. Mutações identificadas em AIP. Entre as alterações identificadas em toda extensão de AIP estão mutações sem-sentido, de sentido trocado, deleções, inserções e alterações em regiões promotores e de *splice*. As cores na imagem representam os grupos que identificaram cada uma das mutações. Na figura também estão identificadas alterações associadas a casos esporádicos e familiares (Chahal *et al.*, 2010).

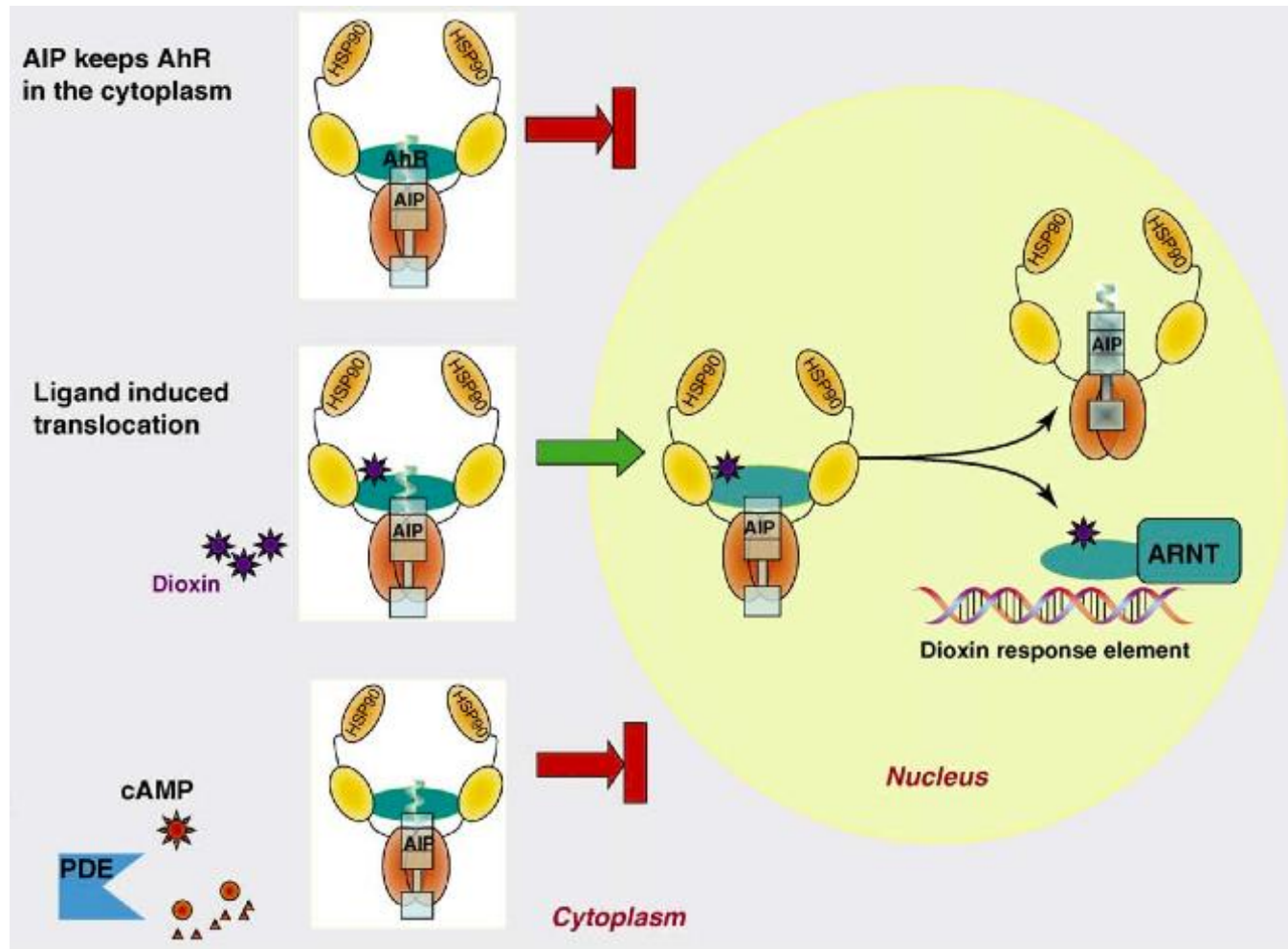


Figura 8. Interações da proteína AIP. Além de interagir com o complexo AHR e Hsp-90 no citoplasma, AIP também parece interagir com fosfodiesterase e atuar na via de sinalização de AMPc (Chahal *et al.*, 2010).

2. OBJETIVO

Avaliar mutações nos genes supressores de tumor *MEN1* e *AIP* em dois casos familiares de prolactinoma, o primeiro identificado como prolactinoma familiar isolado e o segundo associado à neoplasia endócrina múltipla tipo 1.

3. MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Os pacientes das duas famílias avaliadas foram encaminhados ao laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais para realização das análises moleculares.

Ainda, como controles negativos, foram incluídas neste trabalho duas amostras de tumor não-secretor, quatro amostras de tumor secretor de hormônio de crescimento e uma amostra de sangue de paciente portador de neoplasia endócrina múltipla tipo 1, forma esporádica. Dez indivíduos saudáveis com mais de cinquenta e cinco anos, sem história prévia de câncer foram recrutados do Ambulatório do Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção à Saúde do Idoso do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG e selecionados para serem utilizados como amostra controle para o sequenciamento (tabela 4).

3.2 Coleta das amostras

Cerca de 10mL de sangue periférico de todos os pacientes e controles foram coletados em tubos a vácuo contendo solução de EDTA.

A amostra de tecido tumoral do paciente II.1 da família 2, utilizada nas análises de LOH, foi coletada no momento da cirurgia e posteriormente dividida em dois fragmentos. Um fragmento foi armazenado em tubo de 1.5mL contendo a solução *RNAlater*[®] e armazenado a 80°C negativos, o outro fragmento foi fixado em formol 10%.

Tabela 4. Amostras utilizadas no trabalho.

Número da amostra	Tumor	Tipo de amostra
1	Prolactinoma (Família 1)	Sangue
2	Prolactinoma (Família 1)	Sangue
3	Prolactinoma (Família 1)	Sangue
4	Controle (Família 1)	Sangue
5	Controle (Família 1)	Sangue
6	Controle (Família 1)	Sangue
7	Acromegalia	Tumor
8	Acromegalia	Sangue
9	Acromegalia	Sangue
10	Acromegalia	Sangue
11	Tumor não secretor	Tumor
12	Tumor não secretor	Tumor
13	MEN1 (Família 2)	Sangue e tumor
14	Controle (Família 2)	Sangue
15	Controle (Família 2)	Sangue
16	MEN1 esporádica	Sangue
-	10 pacientes hígidos	Sangue

3.3 Análises moleculares

3.3.1 Extração de DNA de sangue

O DNA genômico dos pacientes e dos controles foi isolado das amostras de sangue total utilizando-se o método de Lahiri e Nurnberger (Lahiri e Nurnberger, 1991) com algumas modificações.

As amostras de sangue foram transferidas para tubos de 50mL ao qual a solução TKM1 (TrisHCl 10mM; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; EDTA 4mM) foi adicionada. Em seguida, 500µL de Triton X-100 foi acrescentado à solução com a finalidade de promover a hemólise. Após agitação vigorosa da mistura contida no tubo de 50mL, a mesma foi centrifugada a 1.255 x g por 15 minutos a 4°C.

Após centrifugação o sobrenadante repleto de restos de hemácias foi removido e o precipitado contendo leucócitos foi lavado com a solução TKM1. Neste passo, uma centrifugação a 475 x g por 10 minutos a 4°C foi realizada. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo leucócitos mantido no tubo. Nesta etapa, 1600µL de TKM2 (TrisHCl 10mM; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; EDTA 4mM; NaCl 400mM) foi adicionado ao precipitado juntamente com 100µL SDS 10%, este utilizado para promover a lise de leucócitos. Em seguida, o tubo foi mantido a 55°C em banho-maria por 20 minutos. Após o período de incubação, 900µL de NaCl (6M) foram adicionados com a função de promover a precipitação de proteínas. Uma última centrifugação de 15 minutos a 21.800 x g a 4°C foi realizada. Desta vez, o sobrenadante, contendo DNA, foi transferido para novo tubo com 5mL de álcool a 100%. Neste momento houve a visualização do DNA e o mesmo foi lavado em álcool 70%, secado e transferido para tudo contendo o tampão de eluição TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 7.0-8.0). As amostras permaneceram armazenadas a 80°C negativos durante todo período da pesquisa.

3.3.2 Extração de DNA de tumor

A extração de DNA da amostra de tecido seguiu o protocolo de proteinase K (Miller, Dykes e Polesky, 1988).

Brevemente, a amostra foi macerada e posicionada em um tubo de 1.5mL juntamente a 200µL de tampão de lise (Tris HCl 50mM, pH 8; EDTA 10mM; pH 8; SDS 0.5%; q.s.p 200mL H₂O) e proteinase K (20mg/mL). Em seguida, o tubo foi mantido em banho-maria a 65°C por 1 hora. Após esse período, 200µL de tampão de lise foram adicionados à mistura. A amostra foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos

e, posteriormente, centrifugada por 20 minutos a 11.000 x g.

O sobrenadante resultante foi coletado e a ele foram adicionados dois volumes de etanol 100%, e 10% do volume de sobrenadante de acetato de sódio (3M pH 8). A amostra foi então homogeneizada até que o DNA pudesse ser visualizado. O DNA resultante foi lavado em etanol 70% e, após a secagem, eluído em TE e armazenado a 80°C negativos.

3.3.3 Amplificação e sequenciamento das amostras

Um conjunto de iniciadores específicos para a amplificação dos diferentes exons de *MEN1* e *AIP* foram desenhados utilizando o programa Primer3 v.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) ou artigos previamente publicados (tabelas 5 e 6). Todos foram conferidos manualmente através da análise da sequência disponível no banco de dados do *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>).

O DNA extraído foi quantificado através de espectrofotometria. Para as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas diluições de 50ng/μL das amostras extraídas.

A reação padrão de PCR utilizada seguiu os parâmetros: 100ng de DNA, 2.5μL de Tampão IIB 10x (NaCl 40mM; Tris-HCl 10mM, pH 8; Triton X-100 0.1%; MgCl₂ 1.5mM), 2.5μL de dNTPs (0.2mM), 0.5μL de cada par de iniciadores (10pmol/mL) e 0.5μL de Taq DNA polimerase (0.625U). Os produtos foram amplificados em termociclador, utilizando as seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 3 minutos, e, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento que variou entre 55 e 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Ao término dos ciclos, as reações passaram por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation, Madison, WI). A visualização dos produtos da PCR e seus purificados foi realizada em gel de poliacrilamida 6.5%. O protocolo de coloração envolveu uma etapa de fixação em ácido acético 10%, lavagem em água destilada por 3 minutos, impregnação em solução de nitrato de prata (10.5g AgNO_3 , q.s.p 100mL H_2O , formaldeído 37%, q.s.p 50mL de água destilada) lavagem em água destilada e a etapa de revelação em solução de carbonato de sódio (3g de NaCO_3 , q.s.p 100mL H_2O , 75mL de formaldeído 100% e 20mL de tiosulfato de sódio 10mg/mL).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando *BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit*, seguindo as instruções do fabricante (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). As sequências foram obtidas em sequenciador *ABI 3130 Genetic Analyzer 4 capillaries* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) e analisadas utilizando-se o programa *Sequencher v.4.9*.

Tabela 5. Pares de iniciadores para amplificação de *MEN1* utilizados no estudo.

Exon	Senso (5'-3')	Antisenso (5'-3')	Tamanho (pb)
2. 1*	GGAACCTTAGCGGACCCTGGGAG	GGAAGGTGAGCTCGGGAACGTTGG	288
2. 2*	GTTTTCCCAGTCACGACGTGGAGCAT	ACCCCTTCTCGAGGATAGA	204
2. 3*	CGACCTGTCCCTCTATCCTC	GAGGGTTTTGAAGAAGTGGG	197
3	AGGGTGTAACAGGGAGAGAGATC	GGCTTGGGCTACTACAGTATGAA	453
4	GAGACATAATGATCTCATCC	AAGTCTGGCCTAGCCCAGTC	202
5	CCTGTTCCGTGGCTCATAACTC	CTAGGAAAGGATCATAATTCAGGC	160
6	GGGTGGCAGCCTGAATTATG	CCCCAACACACAAAGTTCT	220
7	GGCTGCCTCCCTGAGGATC	CTGGACGAGGGTGGTTGG	250
8	CGACCCTACAGAGACCCAC	CCATCCCTAATCCCGTAC	273
9	ATCGTGCCCTCCCTCCCC	CTGTCACCACCTGTAGTGCC	240
10. 1*	CGGCAACCTTGCTCTCACC	CCAGGCCCTTGCCAGTG	203
10. 2*	GGGAGTCCAAGCCAGAGGAG	GCCCTTCATCTTCTCACTCTGG	227
10. 3*	TGCCAGCACCCACAGCATC	CCCACAAGCGGTCCGAAGTCC	254

* para os exons 2 e 10, mais de um par de iniciadores foi desenhado, como estratégia para amplificação do fragmento de interesse.

Tabela 6. Pares de iniciadores para amplificação de *AIP* utilizados no estudo.

Exon	Senso (5'-3')	Antisenso (5'-3')	Tamanho (pb)
1	AACCAATCACCATCCGTTTC	GTCGAGTTGTGCATGTGAGC	397
2	GGACTGGACTTCTCCTTGGG	GTCTAGCAGAGGGTGGAGGG	246
3	GATGGTGGTGGGGAAGG	ACCCCTGGGTGGACAGG	359
4 e 5	CTCTGCTGCTGGTGTGTGAT	GAAAGGCCACTCTCTGACCA	597
4 e 5	GAGCCCCTGTGATATG	TGCACTGGCAGTAGTTGAGC	387
6	ATGGTGCCAGGAGACATGA	AACAGCCACCCAAGTACCAG	477

3.3.4 Análise de perda de heterozigose (LOH)

As análises de LOH foram realizadas por dois métodos: sequenciamento direto da região da mutação e genotipagem por microssatélite localizado na região promotora do gene *MEN1*, *D11S1369*. Os genótipos dos marcadores foram analisados em DNA extraído de sangue e do tumor do paciente II.1 da família 2. A ausência e a diminuição do sinal no tumor de algum alelo encontrado no sangue foi o padrão considerado para atestar a perda somática do alelo normal do gene *MEN1*, ou seja, existência da LOH. A reação com primer marcado foi realizada com AmpliTaq Gold® (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) seguindo recomendações do fabricante.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das famílias

Dois casos familiares de prolactinoma foram investigados neste trabalho, o primeiro caracterizado como prolactinoma familiar isolado. O segundo caso trata-se de hiperparatiroidismo primário associado a prolactinoma e gastrinoma, diagnosticado como MEN1 familiar.

A família 1 (figura 9) é composta por 12 indivíduos. Dos quais, três foram diagnosticados com tumores adenohipofisários isolados secretores de PRL. Para análise, amostras de sangue de seis indivíduos foram coletadas. Três são pessoas híginas, assintomáticas e três pacientes com diagnóstico confirmado de prolactinoma. A média de idade ao diagnóstico foi de 42 anos (34 - 49). De acordo com os dados clínicos, os portadores de prolactinoma foram testados para MEN1, que não foi detectado no rastreio bioquímico. Todos apresentaram níveis normais de cálcio, hormônio da paratireoide e gastrina. Atualmente, o tratamento destes pacientes é realizado através da administração oral de agonista de dopamina, o que resultou na estabilização da doença.

A família 2 (figura 10) também apresenta paciente portador de prolactinoma, nesta, associado a MEN1. A família é composta por um indivíduo do sexo masculino diagnosticado com carcinoide aos 27 anos, e aos 28 confirmado diagnóstico clínico para MEN1. Este apresenta gastrinoma, hiperparatiroidismo e prolactinoma. Seu pai faleceu aos 61 também com diagnóstico de MEN1.

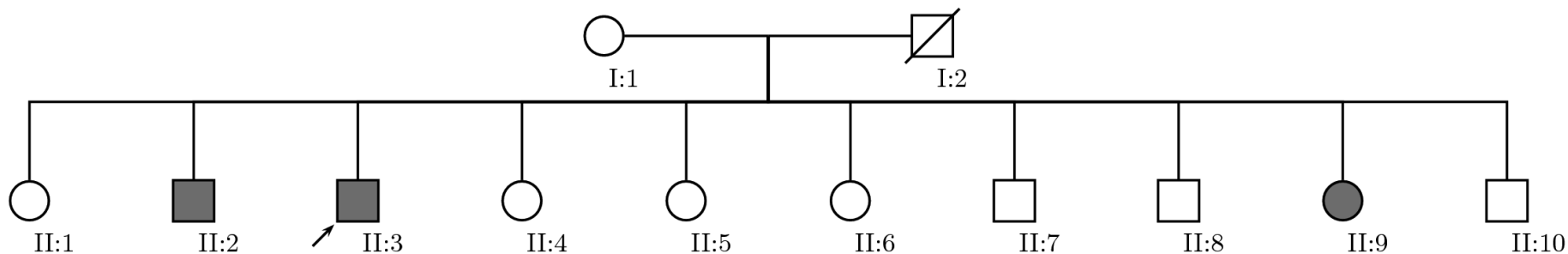


Figura 9. Genealogia de família 1 portadora de prolactinoma familiar. Indivíduo II.3, probando; DNA extraído de I.1, II.2, II.3, II.6, II.7 e II.9.

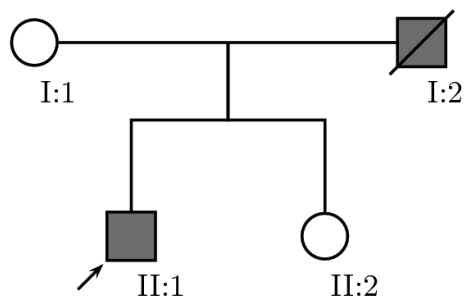


Figura 10. Genealogia da família 2 portadora de MEN1. Amostras de sangue e tumor foram coletadas do indivíduo II.1, apontado pela seta. Seu pai, falecido, apresentava a mesma síndrome.

4.2 Análise de mutações no gene *MEN1*

MEN1 foi analisado em todos os pacientes do estudo através de sequenciamento direto dos nove exons codificantes do gene. O exon 1, não codificante, não foi investigado nesse trabalho. Foram utilizados os pares de iniciadores descritos na tabela 4. Na amplificação dos exons 2 e 10 mais de um par de iniciadores foi utilizado para a fragmento de interesse. Nenhuma alteração foi identificada nos exons 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 de *MEN1*.

Dois polimorfismos foram detectados no exon 9 de *MEN1* em todas as amostras estudadas, inclusive em controles (figura 11). A primeira, c.1269C>T (figura 11a), ocorre em heterozigose no indivíduo II.9, portador de prolactinoma familiar e nos indivíduos I.1, II.6 e II.7, integrantes hígidos da família 1. Os indivíduos II.2 e II.3, também integrantes da família 1 e portadores de prolactinoma, são homozigotos para a mesma alteração (c.1269C>T). O paciente portador de neoplasia endócrina múltipla tipo 1, II.1 da família 2, também apresentou a variante c.1269C>T em heterozigose.

A segunda alteração, c.1314T>C, identificada no exon 9 de *MEN1*, ocorre em homozigose em todas as amostras testadas de ambas as famílias, incluindo-se controles saudáveis da família 1 (figura 11b). Tanto c.1269C>T, quanto c.1314T>C são alterações silenciosas, ou seja, nelas não ocorre alteração da sequência primária do produto proteico de *MEN1*.

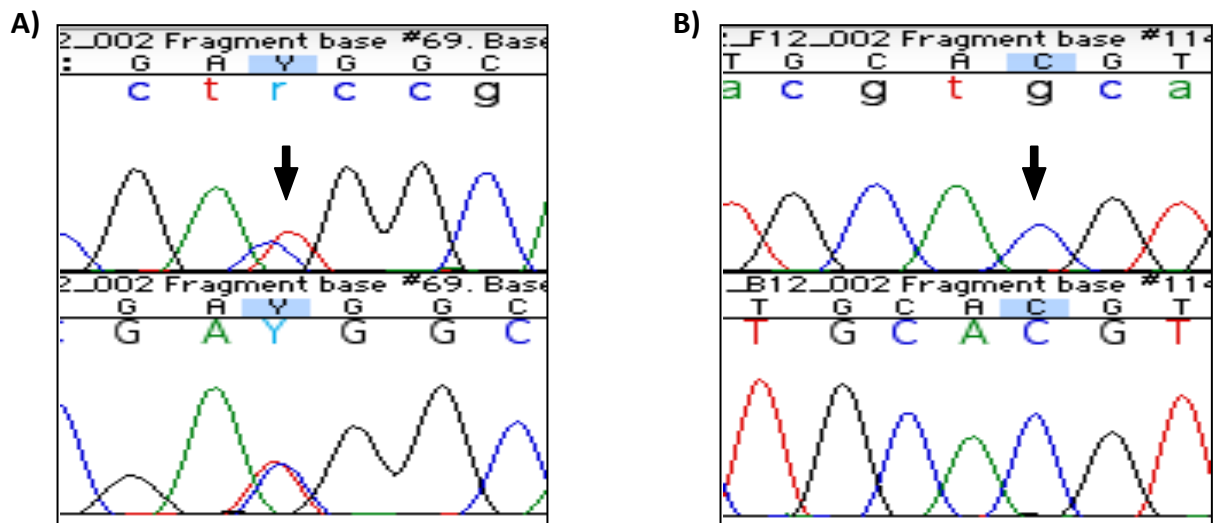


Figura 11. Alterações verificadas no exon 9 de *MEN1*. Imagens representativas da amostra II.7 (A) c.1269C>T em heterozigose e (B) c.1314T>C em homozigose. Dois sequenciamentos independentes são apresentados para cada uma das alterações, a posição de ambas está indicada pelas setas.

Duas alterações também foram identificadas no exon 10 de *MEN1*. A primeira, c.1636A>G, leva à troca de uma treonina por uma alanina na posição 546 da proteína. Foi identificada em homozigose em todos os indivíduos afetados de ambas as famílias, bem como irmãos hígidos da família 1 (figura 12a). Para avaliar a frequência dessa alteração, casos esporádicos de diferentes adenomas de hipófise e amostras de 10 indivíduos sadios também foram avaliadas (tabela 4). A alteração c.1636A>G foi identificada em todas as amostras adicionais estudadas.

A segunda variante detectada no exon 10 de *MEN1* não havia sido descrita anteriormente na literatura, c.1655A>G. Esta apresenta-se em heterozigose em três amostras (figura 12b). Nela ocorre a troca de uma ácido glutâmico por uma glicina na posição 552 (p.E552G) de *menin*. Todas as amostras que registraram a alteração são

integrantes da família 1. Dois são indivíduos afetados e um hígido. O paciente diagnosticado com neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (II.1, família 2) não apresentou a variante.

Com o objetivo de se verificar se ocorrência dessa variante é restrita aos integrantes da família 1, outros casos de adenomas de hipófise também foram avaliados para esta alteração. Dentre os oito pacientes esporádicos avaliados, uma portadora de neoplasia endócrina múltipla tipo 1 também apresentou o polimorfismo c.1655A>G em heterozigose.

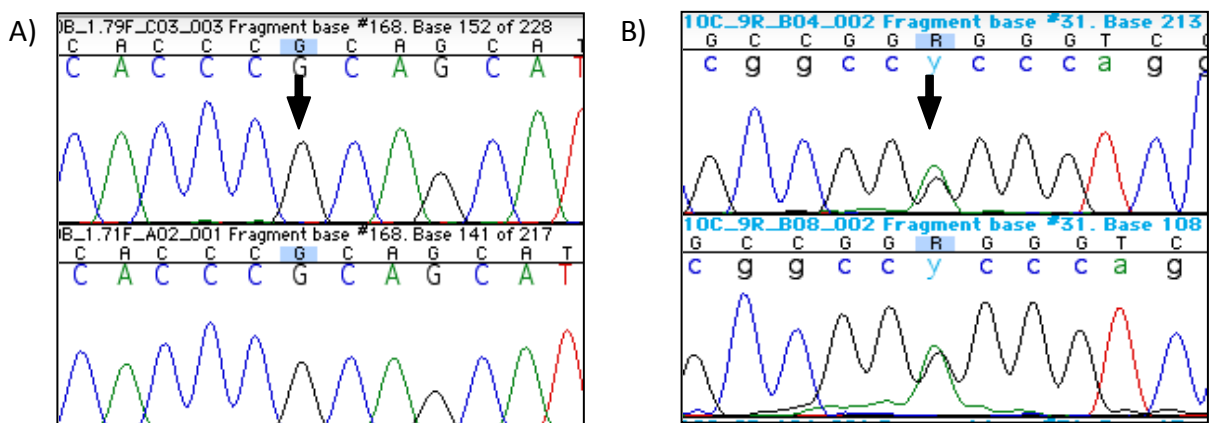


Figura 12. Eletroferogramas representativos dos polimorfismos A) c.1636A>G e B) c.1655A>G. Encontrada em homozigose a primeira alteração ocorre em todas as amostras testadas. A segunda alteração foi identificada em heterozigose em duas das amostras estudadas na família 1. Os pontos de ocorrência das variantes são indicados pelas setas.

Com a finalidade de avaliar o possível impacto da alteração p.E552G na estrutura terciária de *menin*, o programa *PolyPhen-2* foi utilizado. Este software prediz o possível impacto das substituições de aminoácidos sobre a estrutura e função das

proteínas estudadas. A figura 13 apresenta o resultado da predição realizada, onde é possível observar que apesar de não ter sido descrita anteriormente, a alteração pouco interfere na estrutura de *menin*.

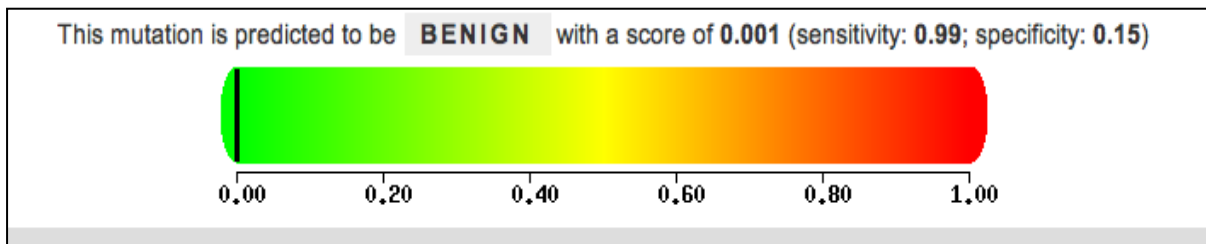


Figura 13. Impacto de p.E552G (c.1655A>G) na estrutura tridimensional de *menin*.

Para avaliar o impacto da alteração o programa utiliza uma escala que varia de 0 a 1, onde, quanto mais próximo de um, maior é o impacto da alteração na estrutura proteica. A escala numérica também é acompanhada por uma escala de cores que varia de verde, alterações benignas, a vermelho, que indica a maior possibilidade da alteração ser deletéria. A variante p.E552G parece não impactar a estrutura de *menin*.

Uma vez que mutações relevantes não foram detectadas pela técnica de sequenciamento direto, o experimento de LOH foi realizado nas amostras de sangue e tumor do paciente II.1 da família 2, diagnosticado clinicamente com neoplasia endócrina múltipla tipo 1. Este experimento foi desenhado para avaliar se o paciente apresenta alterações na região promotora de *MEN1* que pudessem levar à modulação de sua expressão e justificassem a ocorrência da síndrome. O ensaio foi realizado através da utilização do marcador *D11S1369*, localizado nessa região. Para estas condições de análise, nenhuma alteração foi verificada na amostra (figura 14).

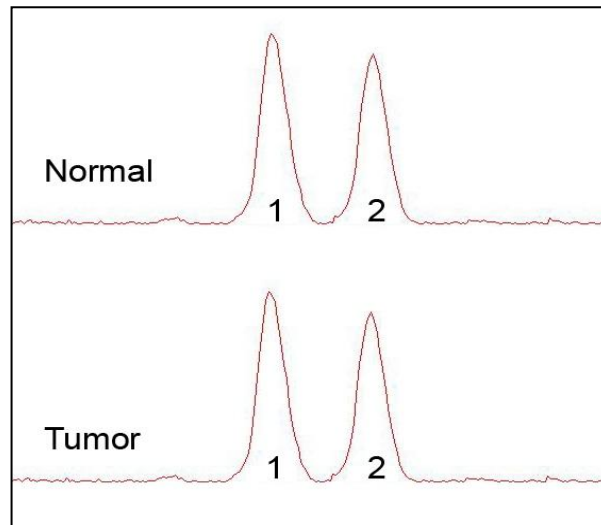


Figura 14. Análise de LOH amostra II.1 família 2. A LOH é considerada quando um alelo na amostra de tumor é menor do que 50% quando comparado com a amostra de sangue do mesmo paciente. Na amostra tumoral do paciente em questão não houve detecção de LOH em sua região promotora.

4.3 Análise de mutações no gene *AIP*

Os iniciadores listados na tabela 5 foram utilizados para o sequenciamento de *AIP*. Assim como *MEN1*, todos os exons codificantes de *AIP* foram sequenciados.

Não foram verificadas alterações em *AIP* nas amostras de indivíduos da família 1. No entanto, o paciente portador de neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (II.1 da família 2), apresentou-se heterozigoto para a mutação c.47G>A no exon 1 de *AIP* (figura 15). Essa alteração leva à troca de uma arginina por uma histidina na posição 16 da estrutura primária da proteína, também identificada como p.R16H.

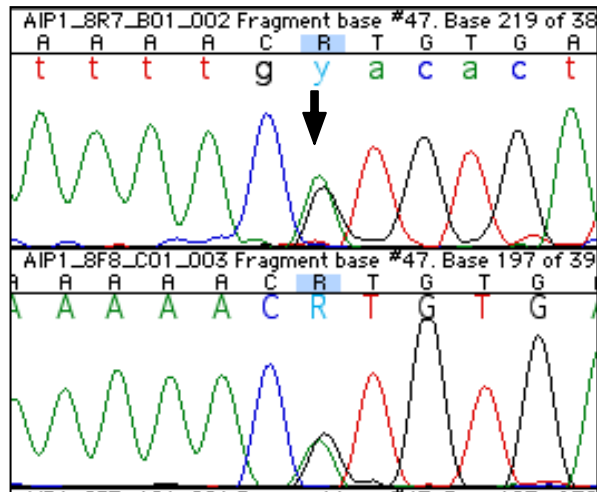


Figura 15. Mutação c.47G>A em AIP na amostra de sangue do paciente II.1 da família

2. Os eletroferogramas de duas reações independentes de sequenciamento mostram a existência da mutação c.47G>A em heterozigose no paciente. A seta indica o local exato da alteração.

Para avaliar o impacto dessa alteração na estrutura proteica terciária, o programa *PolyPhen-2* foi utilizado. A figura 16 apresenta o resultado da predição realizada. É possível observar que a alteração detectada no paciente II.1 da família 2 possui alto potencial de interferir na estrutura terciária de AIP. O valor da predição é de 0,969, muito próximo ao valor máximo de potencial danoso detectado pelo *software*.

Análise de LOH para a mutação c.47G>A no exon 1 de AIP foi realizada para o paciente II.1 (família 2) através de sequenciamento direto de uma amostra tumoral deste. É possível verificar, através do eletroferograma da figura 17, que não ocorre perda de heterozigose nesse *locus*.

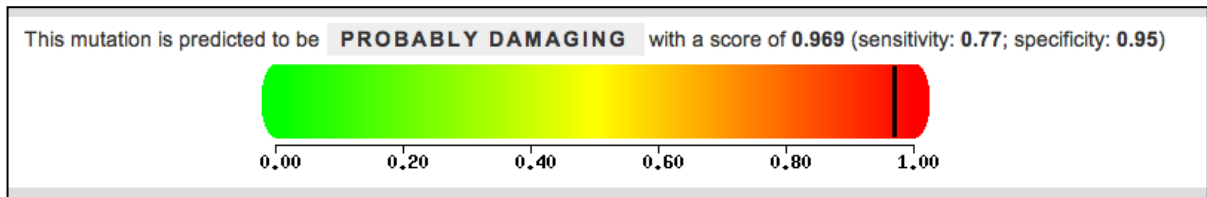


Figura 16. Avaliação da alteração p.R16H na estrutura tridimensional de AIP. De acordo com os parâmetros estabelecidos pelo programa *PolyPhen*, é possível observar que a alteração p.R16H possui forte potencial de impacto na estrutura de AIP.

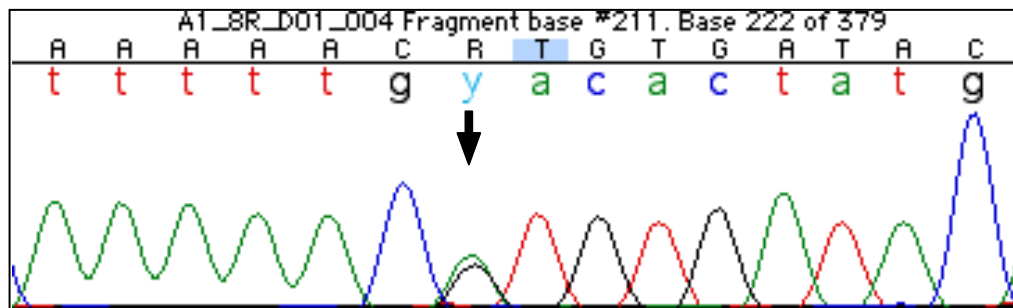


Figura 17. Mutação c.47G>A em AIP na amostra de tumor do paciente II.1 da família

2. Assim como ocorre na amostra de sangue do paciente, o tumor apresenta a mutação c.47G>A em heterozigose. Não houve, portanto, perda de heterozigose.

A fim de caracterizar melhor a alteração c.47G>A em AIP na família 2 foram analisadas amostras da mãe (hígida) e de uma prima paterna do probando, a qual foi diagnosticada com hiperparatiroidismo, mas que não teve diagnóstico clínico conclusivo de MEN1. A variante p.R16H não foi identificada nesses indivíduos. Duas amostras de tumor não-secretor de hipófise, quatro amostras de acromegalia e uma amostra sangue de MEN1 esporádica foram rastreados para alteração p.R16H, mas a mesma não foi identificada nas amostras.

5. DISCUSSÃO

A tumorigênese hipofisária é um processo complexo que frequentemente envolve a inativação de genes supressores de tumor. A identificação desses genes é fundamental para a caracterização e compreensão da doença. Casos familiares, apesar de raros, constituem uma área de pesquisa interessante para que seja feita tal identificação, uma vez que para a maioria das famílias mutações únicas em um determinado gene são comuns aos indivíduos afetados.

Esta identificação gênica é fundamental tanto para confirmação do diagnóstico de MEN1 e FIPA, quanto para aconselhamento genético de indivíduos afetados e seus familiares. Apesar de não serem relevantes para determinação da terapêutica, esses dados são cruciais para o início precoce do tratamento convencional, o que pode melhorar e prolongar a vida do indivíduo afetado (Balogh *et al.*, 2004).

MEN1 é o gene utilizado no *screening* gênico de MEN1 (Balogh *et al.*, 2004). Por sua vez, *AIP* é o gene mais associado a casos familiares de adenomas de hipófise isolados (Korbonits *et al.*, 2012).

A descoberta do gene *MEN1* por clonagem posicional em 1997 resultou no desenvolvimento de testes genéticos para suas mutações (Chandrasekharappa *et al.*, 1997). Desde então variações sem sentido, de sentido trocado, alteração na janela de leitura e deleções foram descritas em pacientes portadores da síndrome sendo que a maioria das famílias estudadas apresentam mutações únicas (Klein *et al.*, 2005).

Adenomas de hipófise são as primeiras manifestações de MEN1 em cerca de 10% dos casos familiares. Esses tumores ocorrem mais precocemente em pacientes portadores de MEN1 que apresentam mutações em *MEN1* (Beckers, Rostomyan e

Daly, 2012). O fenótipo de tumores de adenohipófise associados a MEN1 não está diretamente relacionado a mutações específicas no gene *MEN1* (Tanaka *et al.*, 1998; Lemos e Thakker, 2008), mas sabe-se que prolactinomas associados à síndrome tendem a ser mais agressivos que casos não-relacionados (Vergès *et al.*, 2002).

Nesse estudo, duas famílias de indivíduos portadores de prolactinoma familiar foram investigadas para estabelecer a presença ou não de mutações germinativas no gene *MEN1*. A família 1 apresenta prolactinoma familiar isolado não associado clinicamente à MEN1. Já a segunda família apresenta caso índice diagnosticado clinicamente como portador da síndrome, mas para o qual *screening* gênico ainda não havia sido realizado.

Apesar de estudos demonstrarem que 90% dos casos familiares de MEN1 apresentem mutações no gene *MEN1*, apenas 25% de casos da síndrome em que há a ocorrência de adenomas de hipófise apresentam essas mutações (Klein *et al.*, 2005). Já para casos familiares isolados de prolactinoma, cerca de 1% apresentam mutações no gene *MEN1* (Boguszewski *et al.*, 2010). Até o presente momento foram descritas 1.133 mutações germinativas em toda região codificante do gene, sendo que 23% das mutações são sem sentido, 9% em regiões de *splice*, 41% deleções e inserções fora de *frame*, 6% deleções e inserções *in-frame*, 20% mutações de sentido trocado, e 1% de deleções totais ou parciais (Lemos e Thakker, 2008).

As alterações c.1269C>T e c.1314T>C identificadas no exon 9 de *MEN1* nas amostras das famílias 1 e 2 são variações silenciosas, ou seja, nelas não ocorre alteração da sequência primária do produto proteico de *MEN1*. Em c.1269C>T o códon “GAC” é alterado para “CAT” e continua a codificar ácido aspártico. Ainda, de acordo com os registros populacionais disponíveis para acesso público pelo *Ensembl* (Flicek *et*

al., 2012), essa variação ocorre em 43% das populações CEU (europeia), CHB (chinesa) e JPT (japonesa) caracterizando-a como um polimorfismo de alta frequência.

A segunda alteração, c.1314T>C, foi identificada em todas as amostras testadas. Conforme informações também registradas no *Ensembl* (Flicek *et al.*, 2012) ela está presente em 100% das populações CEU, CHB e JPT e em 90% da população YRI (Nigéria). Assim como o polimorfismo anterior, a troca de base nitrogenada nesta posição é silenciosa. Onde “CAT” é convertido em “CAC” e continua a codificar uma histidina.

Duas alterações também foram identificadas no exon 10 de *MEN1*. No primeiro polimorfismo, c.1636A>G, ocorre a troca de uma treonina, que possui cadeia lateral não carregada, por uma alanina, cuja cadeia lateral é apolar. Apesar do potencial desta alteração para modificar a estrutura tridimensional da proteína, ela foi registrada em algumas populações, atingindo altas frequências. De acordo com dados do *Ensembl* (Flicek *et al.*, 2012), ocorre em 99% da população CEU, 78% em CHB e JPT, e 68% em YRI.

Apesar de ter sido identificada pela primeira vez, a alteração c.1655A>G parece não estar envolvida na tumorigênese adenohipofisária, isto porque não houve constância na presença da alteração e a manifestação dos adenomas. Além disso, a mesma foi igualmente identificada em amostras controles. Adicionalmente, de acordo com a predição do impacto dessa alteração na estrutura terciária de *menin*, não houve demonstração de relevância para interferir em sua função.

Dessa maneira, apesar de descritas com frequência em casos familiares de MEN1 e em menor escala em casos familiares isolados de adenoma de hipófise (Ozawa *et al.*, 2007), nenhuma alteração germinativa relevante no gene *MEN1* foi identificada nas

amostras avaliadas nesse trabalho. Resultados semelhantes foram obtidos por Agarwal *et al.* (1997) e Takana *et al.* (1998) em estudos de quatro casos familiares de MEN1.

Apesar de coincidentes com a literatura, esses resultados não excluem totalmente o envolvimento de *menin* no desenvolvimento da doença. Algumas grandes deleções de *MEN1* que ocorrem na síndrome não podem ser detectados pela técnica de sequenciamento direto. Além disso, a presença de mutações em regiões não-codificantes, que não são rotineiramente avaliadas, podem resultar em achados falso-negativos (Rusconi *et al.*, 2011).

Assim, para descartar a possibilidade do paciente II.1 da família 2 possuir alterações somáticas em *MEN1*, também foi realizado experimento de perda de heterozigose para região promotora do gene. No entanto, nenhuma alteração foi identificada em *MEN1*.

Existem diversas mutações já descritas para *MEN1* em diferentes casos já estudados de MEN1 familiar (Balogh *et al.*, 2004). Mas, como ocorreu nessa e em outras investigações, quando o *screening* genético não revela a origem de uma mutação germinativa presente em uma família, uma mutação em um gene diferente deve ser considerada e investigada.

Mutações germinativas no gene *AIP* são associadas ao desenvolvimento de tumores na hipófise desde 2006, quando o gene foi descrito (Vierimaa *et al.*, 2006). O tipo de adenoma de hipófise familiar isolado que apresenta mutações em *AIP* em maior frequência é o somatotrofinoma, seguido por somato-prolactinoma e prolactinoma isolado (Vierimaa *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2007).

Modelos animais foram desenvolvidos recentemente para avaliar o fenótipo encontrado diante a ocorrência de inativação de *AIP*. Camundongos *AIP^{-/-}* são

extremamente propensos a tumores de hipófise, em particular, tumores secretores de GH. Além disso, os adenomas de hipófise associados à mutação em *AIP* possuem caráter agressivo nos animais testados (Raitila *et al.*, 2010). Em humanos, observa-se que adenomas de hipófise frequentemente apresentam *down*-regulação da expressão de *AIP*. Sendo que tanto a quantidade de RNA mensageiro, quanto dados de imunohistoquímica de *AIP* demonstram que há redução de sua expressão em prolactinomas (Jaffrain-Rea *et al.*, 2009).

Aproximadamente 10 a 15% dos indivíduos portadores de mutações em *AIP* apresentam prolactinoma. Destes, a maioria é do sexo masculino e com predominância de macroadenomas com diâmetro médio de 31 mm (Daly *et al.*, 2010; Igreja *et al.*, 2010). O indivíduo II.1 da família 2, que apresenta a mutação p.R16H em heterozigose foi diagnosticado ainda jovem, assim como o descrito para outros pacientes portadores de mutações em *AIP* (Naves *et al.*, 2010).

Embora as mutações em *AIP* ocorram em maior frequência em casos isolados de prolactinoma familiar (Daly *et al.*, 2010), uma deleção neste gene foi recentemente detectada em paciente portador de neoplasia endócrina múltipla tipo 1, de origem espanhola (Belar *et al.*, 2012). Em 2009, Igreja *et al.* realizaram a mesma análise em casos familiares de MEN1, mutantes negativos para *MEN1*, mas não identificaram nenhuma mutação na região codificante de *AIP* (Igreja *et al.*, 2009).

Considerando-se essa observação, a amostra do paciente portador de neoplasia endócrina múltipla tipo 1, da família 2, também foi avaliada para alterações germinativas em *AIP*. Surpreendentemente, este apresentou a mutação c.47G>A (p.R16H) em heterozigose no exon 1 de *AIP*. Sua mãe, hígida, também foi avaliada e não apresentou alteração, que deve portanto, ter sido herdada do pai, afetado pela

síndrome. Uma prima paterna, diagnosticada com hipertireoidismo também foi avaliada, mas não apresentou a alteração.

De acordo com dados do *Ensembl* (Flicek *et al.*, 2012) o alelo G, selvagem, possui frequência de 0,998. O alelo A, mutante, possui frequência de 0,002 na população espanhola. Essa mutação leva à troca de uma arginina por uma histidina, ambos aminoácidos com cadeias laterais básicas, positivas. Sendo que o aminoácido selvagem, arginina, é altamente conservado entre as espécies (Georgitsi *et al.*, 2007). Para avaliar o impacto dessa alteração na proteína codificada por *AIP*, a predição de estrutura foi realizada através do programa *PolyPhen*. Apesar de não ocorrer uma troca drástica no tipo de aminoácido, percebe-se que a alteração leva a uma modificação significativa e provavelmente danosa na estrutura proteica.

Essa alteração germinativa em *AIP* foi inicialmente identificada por Daly *et al.* em 2007 em um caso familiar isolado de acromegalia. Em 100 amostras controles avaliadas no mesmo trabalho a alteração p.R16H não foi identificada (Daly *et al.*, 2007). Posteriormente, p.R16H também foi encontrada em amostras de sangue de dois pacientes com câncer de cólon, mas que não apresentavam dados clínicos quanto a ocorrência de adenoma de hipófise. Neste trabalho, 209 indivíduos hígidos foram analisados, mas não apresentaram a alteração (Georgitsi *et al.*, 2007a). É possível que os pacientes positivos para p.R16H possuíssem adenoma de hipófise, uma vez que a correlação entre acromegalia e câncer de cólon está bem estabelecida (Dutta *et al.*, 2012).

Outros quatro estudos identificaram a mesma alteração. No primeiro, 532 controles de origem europeia foram avaliados. Destes, um indivíduo alemão apresentou a mutação p.R16H (Georgitsi *et al.*, 2007b). Em outro estudo, 154

indivíduos portadores de acromegalia foram avaliados; destes, dois pacientes apresentaram mutação. No mesmo trabalho, 270 controles foram testados e dois indivíduos também apresentaram a variante p.R16H (Cazabat *et al.*, 2007). No terceiro estudo, dos 110 pacientes caucasianos alemães avaliados, dois apresentaram p.R16H em heterozigose (Buchbinder *et al.*, 2008). O quarto trabalho avaliou 163 pacientes e 200 controles e identificou essa mutação em um paciente portador de prolactinoma e um paciente portador de somatropinoma esporádicos (Tichomirowa *et al.*, 2011).

Em 2010, Igreja *et al.* realizaram análises quantitativas, através de experimentos de duplo híbrido, para avaliar o impacto da alteração p.R16H na interação entre AIP e PDE4A5. Nesse estudo a variante p.R16H reduziu em 30% a interação entre AIP e PDE4A5 (Igreja *et al.*, 2010). Isto ocorre mesmo sem que a alteração esteja localizada na mesma na região de interação entre PDE4A5 e AIP (figura 18).

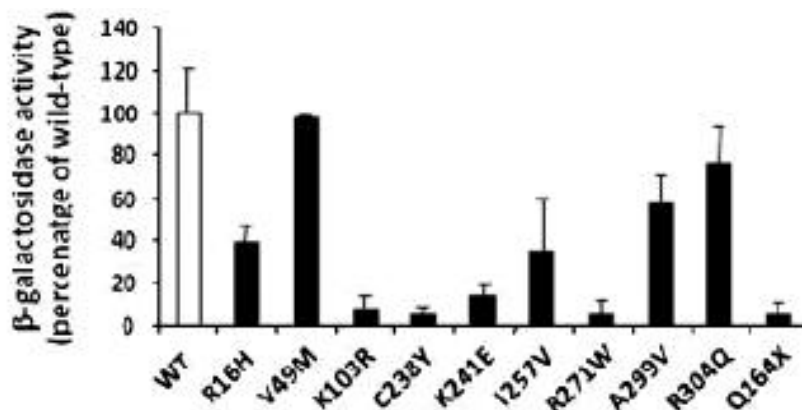


Figura 18. Análise quantitativa do impacto da mutação p.R16H na atividade de AIP. A interação entre AIP e PDE4A5 foi analisada através de ensaios de duplo híbrido. A atividade de β-galactosidase quantifica o impacto de cada uma das mutações descritas na interação de ambas as proteínas, por consequência, na função de AIP (Igreja *et al.*, 2010).

No presente trabalho análise de LOH em *AIP* para o *locus* de p.R16H foi conduzida; no entanto, em concordância com os trabalhos supracitados, a mesma é encontrada também em heterozigose na amostra tumoral testada. Contudo, devido à baixa penetrância das mutações *AIP* e da possibilidade de contaminação com tecido hipofisário normal durante as análises de LOH, a genotipagem de mais controles e outros estudos funcionais como os de Igreja *et al.* (2010) seriam necessários para avaliar a patogenicidade da alteração p.R16H no desenvolvimento da síndrome no paciente avaliado. Além disso, *screening* de mutações em *AIP* e avaliação da ocorrência de MEN1 em outros indivíduos da família 2 são necessários para avaliação da co- segregação entre mutação e síndrome.

Nesse estudo, não foram obtidos resultados conclusivos quanto a ocorrência de mutação em *AIP* e desenvolvimento de MEN1. No entanto, mutações em *AIP* e em *MEN1* foram descartadas como causa do desenvolvimento de prolactinoma familiar isolado. Outros estudos são necessários para identificação do fator genético comum na família que esteja relacionado à progressão desse tumor.

6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi pesquisada a ocorrência de mutações nos genes supressores de tumor *MEN1* e *AIP* em dois casos familiares de prolactinoma, o primeiro identificado como prolactinoma familiar isolado e o segundo associado à neoplasia endócrina múltipla tipo 1.

Para a família 1, mutações em *MEN1* e *AIP* não foram identificadas. Outros estudos em busca de fatores genéticos comuns entre indivíduos afetados devem ser investigados nessa família.

Apesar de *MEN1* ter sido clinicamente estabelecido para o indivíduo II.1 da família 2, o diagnóstico genético não foi confirmado. No entanto, esse é o primeiro trabalho a identificar a variante p.R16H em um caso clássico de *MEN1*.

7. REFERÊNCIAS

- Agarwal SK, Kester MB, Debelenko LV, Heppner C, Emmert-Buck MR, Skarulis MC, Doppman JL, Young KS, Lubensky IA, Zhuang Z, Green JS, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Liotta LA, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Burns AL, e Marx SJ. 1997. Germline mutations of the MEN1 gene in familial multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *Hum Mol Genet.* 6: 1169-1175.
- Alings AM, Fliers E, Herder WW, Hofland LJ, Sluiter HE, Links TP, Van der Hoeven JH, e Wiersinga WM. 1998. A Thyrotropin-secreting pituitary adenoma as a cause of thyrotoxic periodic paralysis. *J Endocrinol Invest.* 21: 703-706.
- Asa SL e Ezzat S. 1998. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev.* 19: 798-827.
- Asa SL e Ezzat S. 2002. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat Rev Cancer.* 2: 836-849.
- Atkinson AB. 2010. From then to now: Lessons from developments in our understanding of the pituitary gland. *Ulster Med J.* 79: 89-94.
- Balogh K, Patócs A, Majnik J, Rácz K, e Hunyady L. 2004. Genetic screening methods for the detection of mutations responsible for multiple endocrine neoplasia type 1. *Mol Genet Metab.* 83: 74-81.
- Beckers A e Daly AF. 2007. The clinical, pathological, and genetic features of familial isolated pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol.* 157: 371-782.
- Beckers A, Rostomyan L, e Daly AF. 2012. Overview of genetic testing in patients with pituitary adenomas. *Ann Endocrinol.* 73: 62-64.
- Belar O, De La Hoz C, Pérez-Nanclares G, Castaño L, Gaztambide S, e Spanish MEN1

- Group. 1995. Novel mutations in MEN1, CDKN1B and AIP genes in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome in Spain. *Clin Endocrinol* 2012; 76: 719-724.
- Berezin M, Karasik A. Familial prolactinoma. *Clin Endocrinol*. 42: 483-486.
- Berger AH, Knudson AG, e Pandolfi PP. 2011. A continuum model for tumour suppression. *Nature*. 476: 163-169.
- Boer H, Blok G e Van der Veen EA. 1995. Clinical aspects of growth hormone deficiency in adults. *Endocr Rev*. 16: 63-86.
- Boguszewski CL, Bianchet LC, Raskin S, Nomura LM, Borba LA, e Cavalcanti TCS. 2010. Application of genetic testing to define the surgical approach in a sporadic case of multiple endocrine neoplasia type 1. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 54: 705-710.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*. 19: 225-268.
- Boscaro MAE, Barzon L, Fallo F, Sonino N. 2001. Cushing's Syndrome. *The Lancet*. 357: 783-791.
- Bronstein, MD e Melmed S. 2005. Pituitary tumorigenesis. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 49: 615-625.
- Buchbinder S, Bierhaus A, Zorn M, Nawroth PP, Humpert P, e Schilling T. 2008. Aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene (AIP) mutations are rare in patients with hormone secreting or non-secreting pituitary adenomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 116: 625-628.

- Carter-Su C, Schwartz J, Smit LS. 1996. Molecular mechanism of growth hormone receptor activation. *Annu Rev Physiol.* 58: 187-207.
- Carver LA, LaPres JJ, Jain S, Dunham EE, Bradfield CA. 1998. Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J Biol Chem.* 273: 33580-33587.
- Cazabat L, Libè R, Perlemoine K, René-Corail F, Burnichon N, Gimenez-Roqueplo AP, Dupasquier-Fediaevsky L, Bertagna X, Clauser E, Chanson P, Bertherat J, e Raffin-Sanson ML. 2007. Germline inactivating mutations of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in a large cohort of sporadic acromegaly: Mutations are found in a subset of young patients with macroadenomas. *Eur J Endocrinol.* 157: 1-8.
- Chahal HS, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, and Korbonits M. 2010. Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA). *Trends Endocrinol Metab.* 21: 419-427.
- Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR, Debelenko LV, Zhuang Z, Lubensky IA, Liotta LA, Crabtree JS, Wang Y, Roe BA, Weisemann J, Boguski MS, Agarwal SK, Kester MB, Kim YS, Heppner C, Dong Q, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ. 1997. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science.* 276: 404-407.
- Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, Garrett-Beal L, Emmert-Buck MR, Edgemon KA, Lorang D, Libutti SK, Chandrasekharappa SC, Marx SJ, Spiegel AM, e Collins FS. 2001. A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 98: 1118-1123.

Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA, e Beckers A. 2006a. High prevalence of pituitary adenomas: A cross-sectional study in the province of liege, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab.* 91: 4769-4775.

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

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

Daly AF, Tichomirowa MA e Beckers A. 2009. Update on familial pituitary tumors: From multiple endocrine neoplasia type 1 to familial isolated pituitary adenoma. *Horm Res* 71 Suppl 1: 105-111.

Daly AF, Tichomirowa MA, Petrossians P, Heliövaara E, Jaffrain-Rea ML, Barlier A, Naves LA, Ebeling T, Karhu A, Raappana A, Cazabat L, De Menis E, Montañana

CF, Raverot G, Weil RJ, Sane T, Maiter D, Neggers S, Yaneva M, Tabarin A, Verrua E, Eloranta E, Murat A, Vierimaa O, Salmela PI, Emy P, Toledo RA, Sabaté MI, Villa C, Popelier M, Salvatori R, Jennings J, Longás AF, Labarta Aizpún JI, Georgitsi M, Paschke R, Ronchi C, Valimaki M, Saloranta C, De Herder W, Cozzi R, Guitelman M, Magri F, Lagonigro MS, Halaby G, Corman V, Hagelstein MT, Vanbellinthen JF, Barra GB, Gimenez-Roqueplo AP, Cameron FJ, Borson-Chazot F, Holdaway I, Toledo SP, Stalla GK, Spada A, Zacharieva S, Bertherat J, Brue T, Bours V, Chanson P, Aaltonen LA, Beckers A. 2010. Clinical characteristics and therapeutic responses in patients with germ-line AIP mutations and pituitary adenomas: An international collaborative study. *J Clin Endocrinol Metab.* 95: 373-383.

DeLellis RA. 2004. *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon: IARC Press. 320.

Drummond JB, Martins JCT, Soares MMS, e Dias EP. 2003. Alterações da haste hipofisária e suas implicações clínicas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 47: 458-466.

Dutta P, Bhansali A, Vaiphei K, Dutta, Kumar PR, Masoodi S, Mukherjee KK, Varma A, e Kochhar R. 2012. Colonic neoplasia in acromegaly: Increased proliferation or decreased apoptosis? *Pituitary.* 15: 166-173.

Elster AD. 1993. Imaging of the sella: anatomy and pathology. *Semin Ultrasound CT MR.* 14: 182-194.

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

Fernandez A, Karavitaki N, e Wass JAH. 2010. Prevalence of pituitary adenomas: A community-based, cross-sectional study in Banbury. *Clin Endocrinol.* 72: 377-382.

Flicek PM, Ridwan A, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Gil L, Gordon L, Hendrix M, Hourlier T, Johnson N, Kähäri A, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Komorowska M, Koscielny G, Kulesha E, Larsson P, Longden I, McLaren W, Muffato M, Overduin B, Pignatelli M, Pritchard B, Riat HS, Ritchie GRS, Ruffier M, Schuster M, Sobral D, Tang YA, Taylor K, Trevanion S, Vandrovcova J, White S, Wilson M, Wilder SP, Aken BL, Birney E, Cunningham F, Dunham I, Durbin R, Fernández-Suárez XM, Harrow J, Herrero J, Hubbard TJP, Parker A, Proctor G, Spudich G, Vogel J, Yates A, Zadissa A e Searle SMJ. 2012. *Ensembl Nucleic Acids Research.*

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, e Nagy G. 2000. Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 80: 1523-1631.

Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.* 323: 643-646.

Georgitsi M, Karhu A, Winqvist R, Visakorpi T, Waltering K, Vahteristo P, Launonen V, e Aaltonen L A. 2007a. Mutation analysis of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene in colorectal, breast, and prostate cancers. *Br J Cancer.* 96: 352-356.

Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, Tuppurainen K, kinenb M, Vierimaa O, Paschked R, Saegere W, Van der Lu R, Saneg T, Robledoh M, Menisi E, Weilj R, Wasikk A, Zielinskil G, Lucewiczm O, Lubinskik J, Launonena V, Vahteristo P, e L Aaltonena.

- 2007b. Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations. *PNAS* 10: 4101-4105.
- Goudet P, Murat A, Biquet C, Cardot-Bauters C, Costa A, Ruszniewski P, Niccoli P, Ménégaux F, Chabrier G, Borson-Chazot F, Tabarin A, Bouchard P, Delemer B, Beckers A, Bonithon-Kopp C. 2010. Risk factors and causes of death in MEN1 disease. A GTE (groupe d'etude des tumeurs endocrines) cohort study among 758 patients. *World J Surg* 34: 249-255.
- Hayes FJ, Seminara SB, Crowley WF Jr. 1998. Hypogonadotropic hypogonadism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 27: 739-763.
- Herman VJ, Fagin R, Gonsky K, Kovacs, e Melmed S. 1990. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 71: 1427-1433.
- Huang SC, Zhuang Z, Weil RJ, Pack S, Wang C, Krutzsch HC, Pham TA, Lubensky IA. 1999. Nuclear/cytoplasmic localization of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin. *Lab Invest.* 79: 301-310.
- Huang J, Gurung B, Wan B, Matkar S, Veniaminova NA, Ke Wan, Merchant JL, Hua X, e Lei M. 2012. The same pocket in menin binds both MLL and JUND but has opposite effects on transcription. *Nature.* 482: 542-546.
- Igreja S, Chahal HS, Akker SA, Gueorguiev M, Popovic V, Damjanovic S, Burman P, Wass JA, Quinton R, Grossman AB, e Korbonits M. 2009. Assessment of p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) and aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) genes in multiple endocrine neoplasia (MEN1) syndrome patients without any detectable MEN1 gene mutations. *Clin Endocrinol.* 70: 259-264.

Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, Chapple JP, Trivellini G, Gueorguiev M, Guegan K, Stals K, Khoo B, Kumar AV, Ellard S, Grossman AB, e Korbonits M; International FIPA Consortium. 2010. Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Hum Mutat.* 31: 950-960.

Ikeda H e T Yoshimoto. 1995. Visual disturbances in patients with pituitary adenoma. *Acta Neurol Scand.* 92: 157-60.

Ikeo Y, Sakurai A, Suzuki R, Zhang MX, Koizumi S, Takeuchi Y, Yumita W, Nakayama J, Hashizume K. 2000. Proliferation-associated expression of the MEN1 gene as revealed by in situ hybridization: possible role of the menin as a negative regulator of cell proliferation under DNA damage. *Lab Invest.* 80: 797-804.

Jaffrain-Rea ML, Angelini M, Gargano D, Tichomirowa MA, Daly AF, Vanbellinghen JF, D'Innocenzo E, Barlier A, Giangaspero F, Esposito V, Ventura L, Arcella A, Theodoropoulou M, Naves LA, Fajardo C, Zacharieva S, Rohmer V, Brue T, Gulino A, Cantore G, Alesse E, Beckers A. 2009. Expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) and ahr-interacting protein in pituitary adenomas: Pathological and clinical implications. *Endocr Relat Cancer.* 16: 1029-1043.

Klein RD, Salih S, Bessoni J, and Bale AE. 2005. Clinical testing for multiple endocrine neoplasia type 1 in a DNA diagnostic laboratory. *Genetics in Medicine.* 7: 131-138.

Knudson AG. 1971. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci.* 68: 820-3.

Korbonits M, Storr H, e Kumar AV. 2012. Familial pituitary adenomas - who should be tested for AIP mutations? *Clin Endocrinol.* 77: 351-356.

- Lahiri DK e Nurnberger JI. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19: 5444.
- Lemos MC e Thakker RV. 2008. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): Analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat.* 29: 22-32.
- Leontiou CA, Gueorguiev M, Van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JA, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A Jr, Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, Peters G, Bolger GB, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, e Korbonits M. 2008. The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 93: 2390-2401.
- Lindsay RS. 1997. Hypothyroidism. *Lancet.* 350: 275-279.
- Lips CJ, Koen M Dreijerink, e Jo W Höppener. 2012. Variable clinical expression in patients with a germline MEN1 disease gene mutation: Clues to a genotype-phenotype correlation. *Clinics.* 67: 49-56.
- Marion DW. 2012. Pituitary adenoma. In: UpToDate, Basow, DS (Ed), UpToDate, Waltham, MA.
- Marx SJ, Agarwal SK, Kester MB, Heppner C, Kim YS, Skarulis MC, James LA, Goldsmith PK, Saggar SK, Park SY, Spiegel AM, Burns AL, Debelenko LV, Zhuang Z, Lubensky IA, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Guru SC, Manickam P, Crabtree J, Erdos MR, Collins FS, Chandrasekharappa SC. 1999. Multiple endocrine neoplasia type 1:

- clinical and genetic features of the hereditary endocrine neoplasias. *Recent Prog Horm Res.* 54: 397-438.
- McDowell BD, Wallace RB, Carnahan RM, Chrischilles EA, Lynch CF, e Schlechte JA. 2011. Demographic differences in incidence for pituitary adenoma. *Pituitary.* 14: 23-30.
- Medeiros SF e Medeiros MMWY. 2007. Modificações dos níveis de gonadotrofinas durante a vida reprodutiva. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 29: 48-55.
- Melmed S. 2003. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: The plastic pituitary. *Journal of Clinical Investigation.* 112: 1603.
- Melmed S e Williams RH. 2011. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol* 7: 257-266.
- Meyer BK, Petrulis JR, e Perdev GH. 2000. Aryl hydrocarbon (AH) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones.* 5: 243-254.
- Meyer BK, Pray-Grant MG, Vanden Heuvel JP, Perdev GH. 1998. Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Molec Cell Biol.* 18: 978-988.
- Miller SA, Dykes DD, e Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
- Molitch ME. 2003. Dopamine resistance of prolactinomas. *Pituitary.* 6: 19-27.
- Naves LA, Daly AF, Vanbellinhen JF, Casulari LA, Spilioti C, Magalhães AV, Azevedo MF, Giacomini LA, Nascimento PP, Nunes RO, Rosa JW, Jaffrain-Rea ML, Bours V, Beckers A. 2007. Variable pathological and clinical features of a large Brazilian

family harboring a mutation in the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene. *Eur J Endocrinol.*157: 383-391.

Naves LA, Jaffrain-Rea M, Vêncio SAC, Jacomini CZ, Casulari LA, Daly AF, e Beckers A. 2010. Aggressive prolactinoma in a child related to germline mutation in the ARYL hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 54: 761-767.

Ozawa At, Agarwal SK, Mateo CM, Burns AL, Rice TS, Kennedy PA, Quigley CM, Simonds WF, Weinstein LS, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Marx SJ. 2007. The parathyroid/pituitary variant of multiple endocrine neoplasia type 1 usually has causes other than p27kip1 mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 92: 1948-1951.

Pinho LKJ, Vieira LN, Wildemberg LEA, Moraes AB, Takiya CM, Frohman LA, Korbonits M, e Gadelha MR. 2010. Familial isolated pituitary adenomas experience at a single center: Clinical importance of AIP mutation screening. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 54: 698-704.

Raitila A, Lehtonen HJ, Arola J, Heliövaara E, Ahlsten M, Georgitsi M, Jalanko A, Paetau A, Aaltonen LA, e Karhu A. 2010. Mice with inactivation of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) display complete penetrance of pituitary adenomas with aberrant ARNT expression. *Am J Pathol.* 177: 1969-1976.

Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaune JC, e Mclachlan SM. 1998. The thyrotrophin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev.* 83: 3095-3099.

Rusconi D, Valtorta E, Rodeschini O, Giardino D, Lorenzo L, Predieri B, Losa M, Larizza L, e Finelli P. 2011. Combined characterization of a pituitary adenoma and a

- subcutaneous lipoma in a MEN1 patient with a whole gene deletion. *Cancer Genet.* 204: 309-315.
- Sano T, Asa SL, e Kovacs K. 1988. Growth hormone-releasing hormone-producing tumors: clinical, biochemical, and morphological manifestations. *Endocr Rev.* 9: 357-373.
- Scappaticci S, Maraschio P, del Ciotto N, Fossati GS, Zonta A, e Fraccaro M. 1991. Chromosome abnormalities in lymphocytes and fibroblasts of subjects with multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer Genet Cytogenet.* 52: 85-92.
- Schusheim DH, Skarulis MC, Agarwal SK, Simonds WF, Burns AL, Spiegel AM, e Marx SJ. 2001. Multiple endocrine neoplasia type 1: new clinical and basic findings. *Trends Endocrinol Metab.* 12: 173-178.
- Soares BS, Eguchi K, e Frohman LA. Tumor deletion mapping on chromosome 11q13 in eight families with isolated familial somatotropinoma and in 15 sporadic somatotropinomas. 2005. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 90: 6580-6587.
- Sonabend AM, Musleh W, e Lesniak MS. 2006. Oncogenesis and mutagenesis of pituitary tumors. *Expert Rev Anticancer Ther.* 6 Suppl 9: S3-14.
- Tanaka C, Yoshimoto K, Yamada S, Nishioka H, Li S, Moritani M, Yamaoka T, e Itakura M. 1998. Absence of germ-line mutations of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene in familial pituitary adenoma in contrast to MEN1 in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab.* 83: 960-965.
- Thakker RV, Newey PJ, Walls GV, Bilezikian J, Dralle H, Ebeling PR, Melmed S, Sakurai A, Tonelli F, Brandi ML. 2012. Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab.* 97: 2990-3011.

- Tichomirowa MA, Barlier A, Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ronchi C, Yaneva M, Urban JD, Petrossians P, Elenkova A, Tabarin A, Desailoud R, Maiter D, Schürmeyer T, Cozzi R, Theodoropoulou M, Sievers C, Bernabeu I, Naves LA, Chabre O, Montañana CF, Hana V, Halaby G, Delemer B, Aizpún JI, Sonnet E, Longás AF, Hagelstein MT, Caron P, Stalla GK, Bours V, Zacharieva S, Spada A, Brue T, Beckers A. 2011. High prevalence of AIP gene mutations following focused screening in young patients with sporadic pituitary macroadenomas. *Eur J Endocrinol.* 165: 509-515.
- Toledo RA, Lourenço DM Jr, Coutinho FL, Quedas E, Mackowiack I, Machado MC, Montenegro F, Cunha-Neto MB, Liberman B, Pereira MA, Correa PH, Toledo SP. 2007. Novel MEN1 germline mutations in Brazilian families with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol.* 67: 377-384.
- Trivellin G. 2011. Evaluation of the role of AIP, CDKN1B, mir-107 and AHRR in the pathogenesis of sporadic and familial pituitary adenomas. Tese. Universidade de Padova.
- Trivellin G e Korbonits M. 2011. AIP and its interacting partners. *J Endocrinol.* 210: 137-155.
- Vandeva SVV, Vroonen L, Naves L, Jaffrain-Rea M-L, Daly AF, Zacharieva S, e Beckers A. 2010. Familial pituitary adenomas. *Ann Endocrinol.* 71: 479-485.
- Vergès B, Boureille F, Goudet P, Murat A, Beckers A, Sassolas G, Cougard P, Chambe B, Montvernay C, e Calender Alain. 2002. Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): Data from the france-belgium MEN1 multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 457-65.
- Vieira JGH. 2002. Macroprolactinemia. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 46: 45-50.

- Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gündogdu S, De Menis E, Mäkinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA. 2006. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science*. 312: 1228-30.
- Wermer, P. 1954. Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands. *Am J Med*. 16: 363-71.
- Wu CL, Zukerberg LR, Ngwu C, Harlow E, Lees JA. 1995. In vivo association of E2F and DP family proteins. *Molecular Cellular Biology*. 15: 2536-2546.
- Wu T e Hua X. 2011. Menin represses tumorigenesis via repressing cell proliferation. *Am J Cancer Res*. 1: 726-739.
- Wyllie AH, Kerr JFR, e Macaskill IAM. 1973. Adrenocortical cell deletion: the role of ACTH. *The Journal of Pathology*. 11: 85-94.
- Yeung CM, Chan CB, Leung PS, e Cheng CHK. 2006. Cells of the anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol*. 38: 1441-1449.
- Zhu J, Leon SP, Beggs AH, Busque L, Gilliland DG, Black PM. 1994. Human pituitary adenomas show no loss of heterozygosity at the retinoblastoma gene locus. *Clin Endocrinol Metab*. 78: 922-997.



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpq@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE MESTRADO DE **FLAVIA MARQUES DE MELO**, n.º de registro 2011656804. No dia quatro de outubro de dois mil e doze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES SUPRESSORES DE TUMOR MEN1 E AIP EM PROLACTINOMAS ASSOCIADOS À SÍNDROMES FAMILIAIS.”**; requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Luiz Armando Cunha De Marco, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco/ orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovada</u>
Profa. Beatriz Santana Soares	Instituição UNIFENAS	Indicação: <u>aprovado</u>
Profa. Maria Marta Sarquis Soares	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovada</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 04 de outubro de 2012.

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco / orientador [assinatura]

Profa. Beatriz Santana Soares [assinatura]

Profa. Maria Marta Sarquis Soares [assinatura]

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco/ Coordenador [assinatura]

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Molecular - Faculdade de Medicina UFMG



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Luiz Armando Cunha De Marco, Maria Marta Sarquis Soares e Beatriz Santana Soares, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES SUPRESSORES DE TUMOR MEN1 E AIP EM PROLACTINOMAS ASSOCIADOS À SÍNDROMES FAMILIAIS.”**, de **FLAVIA MARQUES DE MELO** estando a mesma apta à obtenção do título de Mestre em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 04 de outubro de 2012.

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco
Orientador

Profa. Maria Marta Sarquis Soares

Profa. Beatriz Santana Soares

COMISSÃO EXAMINADORA
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG