



Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Hiperparatireoidismo Primário:
Caracterização molecular e Biomarcadores

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre apresentada à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Trabalho realizado por Maria Inês de Oliveira Alvelos.

Orientador: Prof. Doutora Paula Soares.



Agradecimentos

Gostaria de agradecer de uma forma muito especial a todas as pessoas, que me ajudaram e de alguma forma contribuíram para este trabalho:

À Doutora Paula Soares (À Paulinha!!) o meu muito obrigada pelas oportunidades que me deu, e pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada por todos os momentos críticos, orientação, disponibilidade, apoio, confiança e amizade que sempre me transmitiu.

A todos os meus amigos e colegas de laboratório: Joana, Seca, João, Helena, Ricardo, Hugo, Patrícia, Jorge...obrigada pela partilha de experiências, pelo companheirismo, pelas sugestões. Seca, obrigada por me ajudares a entrar no mundo do *coffalyzer*!!!!

À Senrinha e Inês...tenho muitas saudades e este trabalho tem um bocadinho vosso.

À minha Li e à minha Bá...por todos aqueles momentos tão únicos, e por tudo aquilo que faz com que a nossa amizade seja tão nossa.

À Xana e à Ju...obrigada por partilharem comigo todos os momentos, por estarem sempre do meu lado, por todos aqueles cafezinhos de “10minutos”, pelo companheirismo, enfim...por tudo.

Martinha, obrigada pelo grande apoio, carinho e amizade que tanta força me dão.

Cátia, Zéze...Obrigada pelos bons momentos de descontração, que sabem tão bem !!

À minha Ritinha e ao Bruno...obrigada por estarem sempre lá.

À minha Mãe, ao meu Pai e à minha Maninha ...MUITO OBRIGADA por me apoiarem sempre e por estarem sempre comigo!! Obrigada por aturarem muitas(s) vezes aquele feitiçozinho “particular” que as vezes se apodera e também por toda a força e incentivo!! Vocês são sem dúvida as melhores pessoas do MUNDO!! Obrigada também à minha PUNKAS...☺

Vítor...já ta☺ Obrigada...

A todos os meus amigos, que sempre me apoiaram

Inês Alvelos

Lista de abreviaturas, símbolos e convenções

A	Resíduo de nucleótido contendo como base a adenina
ATP	Adenosina Trifosfato (do inglês, <i>Adenosine triphosphate</i>)
bp	(Número de) Pares de resíduos de nucleótidos (do inglês, <i>base pairs</i>)
C	Resíduo de nucleótido contendo como base a citosina
CaSR	Receptor sensível ao cálcio (do inglês, <i>Calcium sensing receptor</i>)
CDKN1B	Inibidor de Cínases dependentes de ciclinas 1B (do inglês, <i>Cyclin dependent Kinases inhibitor 1B</i>)
CMT	Carcinoma medular da tireóide
C-terminal	Extremidade da cadeia polipeptídica cujo último resíduo de aminoácido apresenta livre a função ácido carboxílico
ddNTP	Didesoxinucleótido
del	Delecção (do inglês, <i>deletion</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Trisfosfato de desoxinucleótido
EDTA	Etilenodiaminatetracetato
FHH	Hipercalcémia e hipocalciúria familiar (do inglês, <i>Familial Hypocalciuria hypercalcemia</i>)
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
G	Resíduo de nucleótido contendo como base a guanina
g	Gramma
g	Unidade de campo gravítico ($9,81 \text{ m.s}^{-1}$), usada como unidade de força centrífuga.
HPTP	Hiperparatireoidismo primário
HPT-JT	Síndrome hereditária de hiperparatireoidismo e tumores nos maxilares (do inglês, <i>Hyperparathyroidism – jaw tumor</i>)
HRPT2	<i>Hyperparathyroidism 2</i>

Hiperparatireoidismo Primário: Caracterização Molecular e Biomarcadores

inv	Inversão (do ingles, <i>inversion</i>)
kb	Kilobp (1000bp)
kDa	kiloDalton (1kDa = 1000Da)
L	Litro
LOH	Perda de heterozigotia (do inglês, <i>Loss of heterozygosity</i>)
M	Molar
MDE	<i>Mutation Detection Enhancment</i>
MEN1	Neoplasias endócrinas múltiplas de tipo 1 (do inglês, <i>Multiple endocrine neoplasia type 1</i>)
MEN2	Neoplasias endócrinas múltiplas de tipo 2 (do inglês, <i>Multiple endocrine neoplasia type 2</i>)
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
MLPA	<i>Multiplex ligation dependent probe amplification</i>
mM	Milimolar
MRI	Imagem de ressonância magnética (do inglês, <i>Magnetic ressonance imaging</i>)
NSHPT	Hiperparatireoidismo neonatal severo (do inglês, <i>Neonatal severe Hyperparathyroidism</i>)
OMIM	Hereditariedade mendeliana no Homem <i>online</i> (do inglês, <i>Online Mendelian inheritance in Man</i>)
p	Braço curto do cromossoma
PCR	Reacção em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PRAD1	<i>Parathyroid adenomatousis 1</i>
PTH	Parathormona (do inglês, <i>Parathyroid Hormone</i>)
q	Braço longo do cromossoma
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>

Hiperparatireoidismo Primário: Caracterização Molecular e Biomarcadores

RET	Rearranjado durante a transfecção (do inglês, <i>Rearranged during Transfection</i>)
rpm	Rotações por minutos
SSCP	<i>Single-Strand conformation polymorphism</i>
T	Resíduo de nucleótido contendo como base a timina
TAMRA	6-carboxitetrametil-rodamina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato-EDTA
U	Unidade de actividade enzimática
V	Volt
wt	Forma não mutada de um gene ou proteína (do inglês, <i>wild type</i>)
% (p/v)	Percentagem expressa em peso por volume
% (v/v)	Percentagem expressa em volume por volume
°C	Grau centígrado
µg	Micrograma
µL	Microlitro

Resumo

O hiperparatireoidismo primário (HPTP) é uma doença endócrina comum caracterizada por uma produção autónoma excessiva de hormona paratireoideia (PTH) pelas glândulas paratireoideias. Esta endocrinopatia pode ter origem num adenoma, hiperplasia, ou carcinoma. O HPTP surge com maior frequência na forma esporádica, no entanto, cerca de 10% dos doentes apresentam uma forma familiar.

Os mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento da forma esporádica do HPTP permanecem pouco esclarecidos, contudo, alterações no gene *MEN1* e na expressão da proteína Ciclina D1 são frequentemente observadas.

O proto-oncogene Ciclina D1 está envolvido na neoplasia paratireoideia através de rearranjos que levam assim à sobre expressão desta proteína, a Ciclina D1, especificamente nas células da paratireoide.

O objectivo do presente trabalho foi efectuar a caracterização molecular de trinta casos de HPTP aparentemente esporádicos e tentar desenvolver uma estratégia para a detecção do rearranjo inv (11) (p15;q13).

A análise dos genes envolvidos nas formas familiares desta patologia (*MEN1*, *RET* e *CDKN1B*) evidenciou a presença de uma mutação germinativa no gene *MEN1*, excluindo então origem esporádica deste caso.

A análise dos tumores paratireoideus revelou a presença de duas mutações somáticas no exão 2 do gene *MEN1*, mostrando que mutações no gene *MEN1* contribuem para o desenvolvimento de formas esporádicas de HPTP. Também no gene *MEN1* verificamos a presença de deleções em 11 dos 25 (42%) casos em estudo, o que reforça a importância deste gene no desenvolvimento desta neoplasia.

O estudo da expressão da proteína Ciclina D1 e da proteína p27 por imunohistoquímica sugere a presença de alterações a nível da regulação proteica. A análise da proteína Ciclina D1 por western blot não revelou a presença de alterações a nível de peso molecular.

O presente trabalho permitiu a caracterização molecular de uma população de trinta indivíduos com HPTP, bem como a análise da proteína Ciclina D1 sobre expressa, apontada como um potencial biomarcador desta patologia.

Palavras-chave: Hiperparatireoidismo primário; Paratireóides; *MEN1*; Rearranjo genético; Ciclina D1

Abstract

Primary hyperparathyroidism (PHPT) is a common endocrine disorder characterized by an excessive autonomous production and release of parathyroid hormone (PTH) by the parathyroid glands. This endocrinopathy may result from the development of an adenoma, hyperplasia or carcinoma. Most of the HPTP cases occur sporadically, however, approximately 10% of the patients present a familial form of the disease.

The molecular mechanisms underlying the pathogenesis of sporadic PHPT are incompletely understood although somatic alterations in *MEN1* gene and Cyclin D1 protein expression are frequently observed.

The proto-oncogene Cyclin D1 is implicated in parathyroid neoplasia by its rearrangements, leading to an overexpression of Cyclin D1 protein in parathyroid cells.

The aim of the present study was to perform the molecular characterization of thirty cases of apparently sporadic PHPT and try to develop a strategy that enables the detection of inv (11)(p15;q13).

Sequencing analysis of the genes (*MEN1*, *RET* and *CDKN1B*) involved in familial forms revealed a germ line mutation in *MEN1* gene, excluding this case as a sporadic form of PHPT.

The parathyroid tumors analysis revealed the presence of two somatic mutations in exon 2 of *MEN1* gene, confirming that *MEN1* gene mutations contribute to the development of sporadic forms of PHPT. The study of this gene revealed that 11 of the 25 (42%) of the cases harbor allelic deletions, strengthening the role of this gene in the development of this neoplasia.

The immunohistochemical study of Cyclin D1 and p27 proteins, points to possible alteration in protein regulation.

The analysis of Cyclin D1 protein by western blot did not revealed any molecular alterations, at least in protein molecular weight.

The study developed in the present thesis allowed the molecular characterization of thirty cases of PHPT, and also the study of the overexpressed Cyclin D1 protein, a potential biomarker of this pathology.

Key-words: Primary hyperparathyroidism; Parathyroids; *MEN1*; Genetic rearrangement; Cyclin D1

Índice

Agradecimentos	ii
Abreviaturas, símbolos e convenções	iii
Resumo	vi
Abstract	vii
I. INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Sistema Endócrino	1
1.1 Glândulas Paratireóides	1
2. Homeostasia do Cálcio	2
3. Perturbações da regulação da homeostasia do cálcio	3
3.1 Hiperparatireoidismo primário	3
4. Genética molecular da tumorigénese	4
4.1 Proto-oncogenes	4
4.2 Genes supressores tumorais	5
4.3 Genes que controlam a estabilidade do genoma	6
5. Tumorigénese nas glândulas paratireoideias	6
5.1 Gene <i>MEN1</i>	7
5.2 Proteína Ciclina D1	8
5.3 Gene <i>CDKN1B</i>	9
6. As três entidades: Adenoma, Hiperplasia e Carcinoma	10
II. OBJECTIVO DO TRABALHO	13
III. MATERIAL E MÉTODOS	14
1. Recolha do material biológico	14
2. Extracção de DNA de amostras de sangue periférico e tecidos conservados em parafina	14
3. Amplificação do DNA por Polymerase Chain Reaction	16
4. <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>	16
5. Sequenciação automática	17
6. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	18
7. Imunohistoquímica	19
8. Extracção de proteínas de tecidos incluídos em parafina	20
9. SDS-PAGE e Western blotting	21
9.1 SDS-PAGE	21
9.2 Western blotting	21
IV. RESULTADOS	22
1. Pesquisa de mutações na linhagem germinativa	22

Hiperparatireoidismo Primário: Caracterização Molecular e Biomarcadores

1.1 Análise molecular do gene <i>MEN1</i>	22
1.2 Análise molecular do gene <i>RET</i>	22
1.3 Análise molecular do gene <i>CDKN1B</i>	25
2. Pesquisa de mutações na linhagem somática	26
2.1 Análise molecular do gene <i>MEN1</i>	26
2.2 Análise molecular do gene <i>CDKN1B</i>	32
2.3 Alterações na expressão da proteína Ciclina D1	32
2.4 Alterações na expressão da proteína p27	33
2.5 Detecção de alterações moleculares da proteína Ciclina D1	34
V. DISCUSSÃO	35
VI. CONCLUSÃO	47
VII BIBLIOGRAFIA	49
ANEXOS	55

I. INTRODUÇÃO GERAL

1. Sistema Endócrino

Uma das implicações da multicelularidade é que todas as partes de um organismo comuniquem entre si de modo a que a homeostasia seja mantida. A comunicação entre as diferentes regiões de um organismo é essencial para que haja uma resposta adequada a alterações ambientais internas e externas. O sistema endócrino, através da produção e libertação de hormonas é um elemento chave para o estabelecimento e manutenção desta regulação (1).

1.1 Glândulas paratireóides

As glândulas paratireóides são glândulas endócrinas, logo, regulam a actividade de outros órgãos através da produção de uma hormona, a hormona da paratireóide ou paratormona (PTH), lançada directamente no sangue (2,3). As paratireóides estão presentes em cada indivíduo normalmente em número de quatro, mas cerca de 13% dos indivíduos possuem glândulas supranumerárias. Estas glândulas têm origem na endoderme, tendo as glândulas superiores origem na quarta fenda branquial e as inferiores na terceira fenda branquial (2).

As paratireóides estão localizadas simetricamente na zona do pescoço, na face posterior da glândula tireóide. São órgãos de dimensões reduzidas, cerca de 6mm de comprimento, 3 a 4mm de largura e 2mm de altura. Em indivíduos adultos, o peso de cada glândula não deverá exceder 40mg. A nível histológico estas glândulas são constituídas principalmente por dois tipos de células: as principais e as oxifílicas. É também possível observar a presença de tecido adiposo, sendo o conteúdo em adipócitos dependente da idade e constituição física de cada indivíduo (2,4).

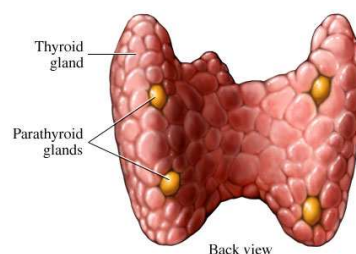


Imagem. 1: Esquema ilustrativo da localização das glândulas paratireóides posteriormente à glândula tireóide. (<http://64.143.176.9/library/healthguide/en-us/images/media/medical/hw/h5550931.jpg>)

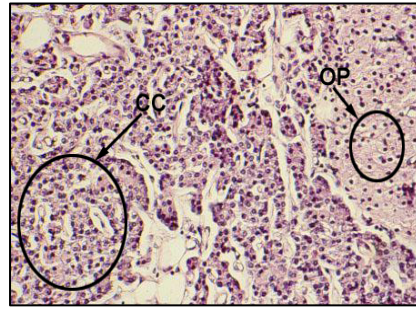


Imagem 2: Componentes celulares das glândulas paratireóides. CC, células principais; OP, células oxifílicas. Coloração HE. 200x

(<http://www.anatomy.uiowa.edu/genhisto/GHWIN/unit10/image/x-63.jpg>)

2. Homeostasia do cálcio

A manutenção da concentração de cálcio ionizado extracelular dentro dos limites considerados normais (1.1 – 1.4mmol/L) é crucial, uma vez que este ião tem uma variedade de funções a nível extra e intracelular. O cálcio desempenha um papel fundamental no controlo da actividade neuromuscular, no processo de coagulação sanguínea, integridade das estruturas ósseas e sinalização celular. A homeostasia do cálcio ionizado circulante é mantida por um complexo mecanismo hormonal, envolvendo o sistema gastrointestinal, ósseo e renal (5,6). A PTH é a principal reguladora deste mecanismo e a sua capacidade de resposta às flutuações deste ião a nível extracelular é mediada pelo receptor sensível ao cálcio (CaSR – *Calcium Sensing Receptor*). A PTH é metabolizada rapidamente pelo fígado e rins sendo o seu tempo médio de vida em circulação cerca de 2 a 5 minutos (3,5).

A regulação dos níveis de cálcio pela PTH ocorre através de um mecanismo de *feedback* negativo, o que significa que, em resposta a baixas concentrações deste ião há um aumento da secreção da PTH promovendo um restabelecimento dos níveis normais de cálcio circulante. A PTH libertada actua a nível ósseo promovendo a libertação do cálcio destas estruturas, a nível renal permitindo a reabsorção deste ião e a síntese da vitamina D activa, ou seja, estimulando a conversão de 25-hidroxivitamina D3 (produzida no fígado) na sua forma activa: 1,25-dihidroxivitamina D3 [1,25(OH)2D3; calcitriol], que, por sua vez leva a um aumento da absorção de cálcio no intestino.

A forma activa da vitamina D e os níveis elevados de cálcio actuam no sentido de regular negativamente a transcrição do gene da PTH e consequentemente a secreção desta hormona (6,7,8).

3. Perturbações da regulação da homeostasia do cálcio.

Estão descritas diversas anomalias relacionadas com as glândulas paratireóides, que podem ir desde anomalias do desenvolvimento relacionadas com o número e localização anatômica das glândulas até ao aparecimento de disfunções relacionadas com a produção e secreção hormonal (10,11).

No presente trabalho será dada ênfase a alterações das glândulas paratireóides, que originam desregulação da produção hormonal, como é o hiperparatireoidismo primário.

3.1 Hiperparatireoidismo primário

O hiperparatireoidismo primário (HPTP) é uma patologia endócrina que se caracteriza pelo aumento da síntese e secreção inapropriada da PTH. Níveis elevados de PTH levam a uma situação de hipercalcémia e os efeitos desta disfunção podem ter consequências ao nível de diferentes órgãos e sistemas, como sejam, ossos, rins, sistema cardiovascular, sistema gastrointestinal e sistema nervoso (8,9).

O HPTP é uma doença endócrina comum, com uma incidência de 25 casos por cada 100 000 indivíduos (7). Existem vários factores considerados de risco, como a idade, sexo e a exposição a irradiação cervical (12).

O HPTP em 80 a 85% dos casos tem origem num adenoma (doença uniglandular) da paratireóide, seguindo-se 15 a 20% dos casos com origem em hiperplasia (doença multiglandular) e mais raramente, em 2 a 5% dos casos, pode ser devido ao desenvolvimento de carcinoma (2,6). A maioria dos indivíduos com HPTP possui a forma esporádica da doença existindo no entanto formas familiares bem caracterizadas que representam cerca de 10% dos casos (7).

As alterações genéticas encontradas nos casos de HPTP resumem-se essencialmente às formas familiares, sabendo-se muito pouco sobre as alterações associadas à forma esporádica da doença.

As alterações moleculares que estão estabelecidas como características de tumores paratireóides esporádicos são: alterações genéticas do gene *MEN1* (20 a 30% dos casos) e sobre expressão da proteína Ciclina D1 (30 a 40% dos casos).

4. Genética molecular da tumorigénese

Actualmente é aceite que as neoplasias são doenças essencialmente genéticas e epigenéticas, o que significa que resultam de mutações em diferentes *loci* cromossómicos e alteração da expressão genética sem alteração da sequência nucleotídica. Estas alterações podem ser herdadas ou adquiridas somaticamente, sendo a tumorigénese um processo que envolve várias etapas (*multistep*) (13).

Estas alterações genéticas e epigenéticas proporcionam às células uma vantagem proliferativa ou de inibição da apoptose, promovendo assim o crescimento. Este modelo tem sido confirmado por diversos estudos sendo o exemplo mais paradigmático o das neoplasias colorectais, que se desenvolvem ao longo de décadas e que parecem requerer pelo menos sete eventos genéticos (14).

Os genes envolvidos na tumorigénese pertencem a classes funcionais distintas e podem ser divididos em: (i) proto-oncogenes, que promovem o crescimento celular; (ii) genes supressores tumorais, que inibem o crescimento celular, e (iii) genes que controlam a estabilidade do genoma (15).

4.1. Proto-oncogenes

Proto-oncogenes são genes normais responsáveis pela codificação de proteínas que regulam o crescimento e diferenciação celular. Alteração da sua estrutura e/ou expressão promove a activação de proto-oncogenes em oncogenes capazes de transformar células e induzir fenótipo neoplásico. Em geral, um oncogene possui uma alteração na sua região reguladora ou codificante, que o leva a adquirir um aumento de função, podendo resultar na desregulação em termos quantitativos do seu produto, na produção de uma proteína constitutivamente activa ou na formação de um produto anómalo (16).

Há três mecanismos genéticos de activação de oncogenes em neoplasias humanas: (i) mutação, (ii) amplificação génica e (iii) rearranjos cromossómicos.

Exemplos de mutações pontuais activantes são as que ocorrem no proto-oncogene *RET* nos casos de MEN2A. A amplificação génica refere-se ao aumento do número de cópias de um determinado gene no genoma de uma célula, o que leva ao aumento de expressão desse mesmo gene, conferindo vantagens a nível de crescimento celular. Exemplos de proto-oncogenes amplificados em tumores são: os genes da família *MYC* e *ERBB*. Cerca de 20 a 30% dos tumores do ovário e da mama revelam amplificação do gene *MYCBP*. Amplificação do gene *ERBB* é observada em cerca de

50% dos casos de glioblastoma, bem como em 20 a 30% dos tumores do ovário e mama (16).

Os rearranjos cromossômicos são frequentemente detectados em tumores hematológicos, mas também em tumores sólidos (17). Os rearranjos cromossômicos podem actuar segundo dois mecanismos: (i) activação da transcrição de proto-oncogenes, ou (ii) criação de genes de fusão. A activação da transcrição, resulta de rearranjos cromossômicos que colocam o proto-oncogene sob o controlo de elementos reguladores específicos do tipo celular em questão. O rearranjo Ciclina D1/PTH (inv(11)(p15;q13)), identificado em patologia neoplásica da paratireóide, é um exemplo de activação de transcrição da proteína Ciclina D1 devido à sua justaposição com a região reguladora do gene *PTH* (18). Os genes de fusão podem ocorrer devido à ocorrência de quebras cromossômicas em *loci* de dois genes diferentes. Os genes de fusão codificam proteínas quiméricas com actividade transformante. Em geral, os genes envolvidos na fusão contribuem para o potencial transformante da oncoproteína quimérica. O *RET/PTC1*, *RET/PTC2* e o *RET/PTC3* são exemplos de genes de fusão observados em casos de carcinoma papilar da tireóide (19).

4.2. Genes supressores tumorais

Os genes supressores tumorais são reguladores negativos do crescimento celular, e a sua inactivação resulta na perda de uma acção inibitória sobre este (16).

O conceito de gene supressor tumoral surgiu em 1971, quando Knudson apresentou uma hipótese (*Knudson's two-hit hypothesis*) para a tumorigénese do retinoblastoma, um tumor maligno com origem nas células da retina.

Segundo Knudson, este tumor maligno ocorre como resultado de dois eventos genéticos, que levam à inactivação de ambas as cópias de um gene supressor tumoral, no caso o gene *RB1* que codifica a proteína Retinoblastoma.

A principal característica deste modelo é que, em formas familiares de cancro, o indivíduo afectado herda um alelo mutado proveniente de um dos progenitores, logo esta alteração genética está presente em todas as células do organismo e, seguidamente, uma alteração somática no tecido alvo inactiva o alelo normal herdado do outro progenitor. Em formas de cancro não hereditárias, as duas mutações inactivantes têm de ocorrer na mesma célula somática (20).

O gene *MEN1* é um exemplo de um gene supressor tumoral envolvido na tumorigénese das paratireóides. O gene *MEN1* codifica uma proteína nuclear designada

Menina e mutações germinativas neste gene estão relacionadas com o desenvolvimento da síndrome MEN1 (21).

4.3 Genes que controlam a estabilidade do genoma

Os genes que codificam proteínas envolvidas na reparação e manutenção da integridade do genoma constituem uma classe de genes, também afectados por mutações inactivantes. Enquanto os genes supressores tumorais como o *RB1* e o *MEN1* evidenciam um papel activo na regulação do crescimento celular e/ou apoptose, os genes que codificam proteínas pertencentes ao sistema de reparação do DNA parecem ter um papel mais passivo no que se refere ao controlo do crescimento, no sentido que não o controlam directamente, mas apenas promovem a integridade dos genes detentores desta função (15).

Deste modo os genes envolvidos na manutenção da integridade do genoma são a terceira classe de genes que, quando alterados, podem estar implicados na tumorigénese.

O gene *MLH1* (*MutL Homolog 1*) está envolvido no sistema de reparação do DNA e foi identificado como sendo um dos genes responsáveis pelo desenvolvimento de cancro colorectal não polipóide (22).

5. Tumorigénese nas glândulas paratireoideias.

Como referido anteriormente, sabe-se muito mais sobre os genes envolvidos em formas familiares de HPTP comparativamente ao que se sabe sobre as formas esporádicas da patologia. Alterações no gene *MEN1* (*Multiple Endocrine Neoplasia type 1*) estão associadas ao HPTP no contexto da síndrome MEN1, tal como alterações no gene *HRPT2* (*Hyperparathyroidism 2*) estão associadas ao HPTP no contexto da síndrome HPT-JT (*Hyperparathyroidism – Jaw tumor*). As formas de HPTP na síndrome MEN2 (*Multiple Endocrine Neoplasia type 2*), na sua variante MEN2A, estão associadas a alterações genéticas do gene *RET* (*REarranged during Transfection*). Mutações homozigóticas ou heterozigóticas do gene *CaSR* (*Calcium Sensing Receptor*) estão na origem de NSHTP (*Neonatal Severe Hyperparathyroidism*) e FHH (*Familial Hypercalcemic Hypercalciuric*), respectivamente (23,24).

Recentemente, foi publicado um estudo descrevendo uma forma de síndrome tipo MEN1, presente em ratinho, designada por MENX. Esta síndrome MENX apresenta a nível fenotípico, semelhanças com as síndromes MEN1 e MEN2, mas ao contrário das síndromes humanas, a MENX é transmitida de forma autossómica

recessiva. Foi feita a análise mutacional dos genes *RET* e *MEN1* verificando-se a ausência de mutações, concluindo-se que, esta síndrome não está associada a mutações destes genes. Em ratinho, a síndrome MENX tem origem em mutações no gene *CDKN1B* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B*) (25). Em humanos, 10 a 20% dos indivíduos com síndrome MEN1 não revelam qualquer alteração genética no *MEN1*. Uma possibilidade será a presença de alterações intrónicas ou na região promotora do gene, ou ainda grandes deleções. Outra possibilidade será o envolvimento de outros genes (26). No estudo referido acima (25) é descrito um doente apresentando um tumor na glândula pituitária e hiperparatireoidismo primário com origem num adenoma das glândulas paratireóides. A sequenciação do gene *MEN1* não revelou a presença de qualquer mutação apesar do fenótipo característico. Mas a análise de toda a região codificante do gene *CDKN1B* revelou a existência de uma mutação germinativa do tipo *nonsense* no codão 76, que origina uma proteína truncada. Como 10 a 20% dos casos fenotipicamente MEN1 não revelam alteração germinativa no gene *MEN1*, foi sugerido que alterações no gene *CDKN1B* poderão ser responsáveis pelo desenvolvimento de uma síndrome designado *MEN1-like syndrome* (25).

Em resumo alterações genéticas associadas às formas familiares de HPTP são relativamente conhecidas, mas as alterações genéticas envolvidas na tumorigénese dos casos esporádicos permanecem pouco esclarecidas. Pela revisão da literatura os genes mais frequentemente envolvidos em formas esporádicas são o gene *MEN1* e o gene que codifica a proteína Ciclina D1 (*CCND1*) (24).

5.1 Gene *MEN1*

O gene supressor tumoral *MEN1* foi identificado em 1997 como sendo o gene responsável pela síndrome MEN1 (27). Para além de estar envolvido numa síndrome familiar, este gene está também implicado no desenvolvimento de tumores esporádicos das glândulas paratireoideias (28).

O gene *MEN1* está localizado no cromossoma 11 (banda 11q13), é constituído por 10 exões (dos quais 9 são codificantes), e codifica uma proteína de 610 aminoácidos denominada Menina.

Os tumores de indivíduos com síndrome MEN1 revelam a presença de uma alteração germinativa acompanhada de uma alteração somática, como perda de heterozigotia (*LOH*) ou mutação pontual, como previsto pelo modelo de Knudson (29).

Apesar da ausência de relação genótipo/fenótipo, os portadores de mutações truncantes nos exões 2, 9, e 10 no gene *MEN1*, parecem evidenciar uma maior incidência de tumores malignos (30).

Cerca de 20% dos tumores paratireoideus esporádicos revelam mutações no gene *MEN1*. Estas mutações somáticas, tal como as germinativas acima referidas, estão dispersas por toda a região codificante. Das mutações descritas 40% são mutações *frameshift*, 29% são mutações *missense*, 18% *nonsense*, 7% ocorrem em locais de *splicing* e 6% são deleções ou inserções *in-frame*. Os tumores esporádicos que possuem mutações somáticas no gene *MEN1* revelam *LOH* no cromossoma 11q13 (29).

O papel desempenhado por esta proteína permanece pouco esclarecido e o facto de não revelar homologia com outras proteínas ou domínios proteicos, dificulta a compreensão da sua função. Estudos de localização subcelular revelaram que a proteína Menina é essencialmente nuclear e estudos de interacção entre proteínas mostram que ela interage com diversas proteínas envolvidas na regulação da transcrição, estabilidade do genoma, divisão e proliferação celular (31).

5.2 Proteína Ciclina D1

Alterações na regulação do ciclo celular representam eventos universais da tumorigénese (32).

Durante o ciclo celular há uma série de pontos de controlo (*checkpoints*) pelos quais a célula tem de passar para que possa progredir. Entre estes, um ponto de controlo na fase G1 (*restriction point*) é fundamental uma vez que, ultrapassado este ponto a célula fica irreversivelmente programada para replicar o seu DNA (32).

A Ciclina D1 é uma proteína nuclear que desempenha um papel fundamental na transição da fase G1 para a fase S de síntese de DNA. Há três tipos de Ciclinas D (D1, D2, e D3) e a Ciclina D1 é a mais bem estudada das três (32).

A Ciclina D1 é um cofactor de Cínases dependentes de Ciclinas (*Cyclin Dependent Kinases-CDK*), em particular as CDK4 e a CDK6, que vão posteriormente fosforilar e inactivar a proteína supressora tumoral Retinoblastoma. Esta fosforilação promove a libertação do factor de transcrição E2F, promovendo assim a progressão do ciclo celular (33).

A proteína Ciclina D1, cuja designação resulta do facto de os seus níveis de expressão variarem em função da fase do ciclo celular, tem um tempo médio de vida inferior a 30 minutos, sendo os níveis muito baixos nas células em interfase (33).

O gene que codifica esta proteína, o *CCND1* (*Cyclin D1*) localizado no cromossoma 11q13, foi inicialmente designado *PRAD1* (*Parathyroid Adenomatosis 1*) uma vez que foi clonado a partir de DNA de um adenoma da paratireóide (33).

Em 1989, Arnold e colaboradores verificaram a existência de um rearranjo cromossómico em adenomas paratireoideus. Este rearranjo (inv(11) (p15;q13)), leva a que a região promotora do gene *PTH* seja colocada adjacente ao gene *CCDN1* levando à sobre-expressão da proteína Ciclina D1 (34). Desde então foram efectuados diversos estudos que revelam sobre-expressão da Ciclina D1 em cerca de 40% dos adenomas paratireoideus, apesar de a maioria dos estudos não demonstrar a presença do rearranjo (35). Elevados níveis de expressão são observados numa altura precoce do desenvolvimento tumoral, o que sugere um papel importante na iniciação tumoral (36).

A confirmação da patogenicidade desta proteína foi obtida através de estudos em ratinhos transgénicos com sobre-expressão de Ciclina D1 nas paratireóides. Estes ratinhos apresentavam glândulas hiperplásicas, com aumento da proliferação celular, que retêm a capacidade de produção hormonal constituindo assim um modelo de hiperparatireoidismo primário e sugerindo que a Ciclina D1 para além de regular a proliferação celular, poderá também regular a produção hormonal (36).

Para além do rearranjo inv (11) (p15;q13) observado nas paratireóides, também se observa a presença de rearranjos que envolvem o gene *CCDN1* em linfomas de células do manto, t (11;14) (q13;q32) (37,38). A Ciclina D1 encontra-se sobre-expressa em vários tumores humanos, na maioria dos casos devido a amplificação génica, como no caso de carcinomas da mama, cabeça e pescoço, colo do útero, bexiga e próstata. O aumento da expressão desta proteína pode dever-se também à activação de vias frequentemente activas na tumorigénese como as vias Wnt e MAPK, que induzem a sua transcrição (33).

5.3 Gene *CDKN1B*

A desregulação do ciclo celular associada a neoplasia pode ocorrer de diversas formas, entre elas por activação de reguladores positivos do ciclo celular e/ou inibição de reguladores negativos.

O gene *CDKN1B* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B*) está localizado no cromossoma 12p13, é constituído por dois exões e codifica uma proteína de 27kDa designada p27.

A proteína p27 é um membro da família de inibidores de cínases dependentes de ciclinas, possuindo assim um papel no controlo do ciclo celular (39). Esta proteína permite a paragem do ciclo celular na fase G1 em resposta a sinais anti-proliferativos, exercendo a sua função obstruindo o domínio de interação das ciclinas e prevenindo a ligação do ATP às CDK. Estes efeitos são mediados pela região N-terminal da proteína p27 (39).

Como os níveis de expressão desta proteína se correlacionam positivamente com a diferenciação celular, a proteína p27 poderá estar envolvida em vias reguladas por sinais mitogénicos e antiproliferativos, logo, a sua perda de função contribui para a tumorigénese (40).

Em tumores malignos da mama, estômago, próstata e pulmão verifica-se que a expressão da p27 está frequentemente reduzida, mas raramente se verifica a presença de mutações (40).

O *CDKN1B* é um gene supressor tumoral e as primeiras evidências surgiram com ratinhos p27^{-/-}. Estes ratinhos desenvolvem espontaneamente adenomas da glândula hipófise e são mais susceptíveis à tumorigénese induzida por agentes carcinogénicos.

Contudo, o *CDKN1B* é um gene supressor tumoral pouco comum porque, ao contrário dos genes supressores tumorais canónicos como o *RB1*, a sua inactivação homozigótica ainda não se encontra descrita, não tendo sido observada em nenhum tumor (41).

Diversos autores formularam explicações para a ausência de mutações no gene *CDKN1B* e referem a existência de formas alternativas de inactivação ou então a existência de alterações pós-transcricionais. A alteração da localização sub celular da proteína e aumento da sua degradação são observados numa variedade de carcinomas. A localização citoplasmática aberrante desta proteína é comum em cancro colorectal e do óvário (41).

6. As três entidades: Adenoma, Hiperplasia e Carcinoma

Como foi referido inicialmente, o HPTP pode resultar de um adenoma (doença uniglandular), hiperplasia (doença multiglandular) ou carcinoma. Adenomas múltiplos são responsáveis por 5 a 10% dos casos de HPTP (24).

Um dos problemas que se coloca na patologia das paratireóides é a distinção entre adenoma, adenoma múltiplo e hiperplasia. Em muitos casos, também a distinção

entre tumor benigno e maligno é problemática. Tendo como base aspectos histológicos, a distinção entre todas estas entidades não é totalmente fiável, uma vez que não existem marcadores inequívocos das diferentes patologias. Muitas vezes o resultado histológico é baseado na observação clínica do número de glândulas alteradas e no caso de carcinoma, em critérios morfológicos (23,24).

O adenoma da paratireóide é normalmente uma entidade solitária, composta maioritariamente por um tipo celular embora, por vezes se verifique uma mistura dos dois tipos celulares na mesma lesão. Este tumor benigno corresponde a um nódulo bem circunscrito, rodeado por uma cápsula fibrosa. As mitoses são raras e geralmente observa-se tecido paratireoideu normal comprimido pelo adenoma, sendo estes aspectos considerados como “característicos de adenoma”. Em contraste com a paratireóide normal, o conteúdo em adipócitos no adenoma é escasso (2,24).

Nos casos de hiperplasia, frequentemente verifica-se uma assimetria do envolvimento glandular com aparente normalidade de uma ou duas glândulas restantes. Microscopicamente, o padrão mais comum é o de hiperplasia de células principais, podendo estar distribuídas num padrão multinodular ou difuso. O conteúdo em adipócitos está também reduzido (24).

O carcinoma da paratireóide é um tumor raro que aparece como uma grande massa (> 3cm) aderente aos tecidos circundantes. O diagnóstico de malignidade refere-se aos casos que revelam invasão dos tecidos adjacentes. Há um conjunto de características histopatológicas que se relacionam com a malignidade do tumor. Exemplos destas características são: elevado número de mitoses, presença de bandas fibrosas intra tumorais, padrão de crescimento trabecular, invasão perineural, angiolinfática e de tecidos adjacentes. O comportamento metastático do tumor nem sempre está evidente, deste modo, o diagnóstico de carcinoma paratireoideu com base nos critérios morfológicos acima descritos pode revelar-se difícil num primeiro contacto (42).

Contudo, o estudo do gene *HRPT2* parece promissor no que diz respeito ao diagnóstico de carcinoma, uma vez que mutações somáticas inactivantes deste gene estão presentes em 70% a 100% dos carcinomas paratireoideus esporádicos (42).

Os avanços da medicina nuclear e das diferentes técnicas de imagiologia médica tiveram um impacto significativo na avaliação dos indivíduos com HPTP. O método de eleição para o tratamento do HPTP é a cirurgia, e a localização pré-operatória das glândulas anómalas revela-se fundamental para o seu sucesso.

Classicamente, o HPTP era diagnosticado quando um indivíduo apresentava sintomas avançados da doença, como litíase renal, osteoporose, fraqueza muscular, entre outros.

Com a introdução de técnicas de análise laboratoriais em 1960s, começou a ser possível diagnosticar indivíduos com HPTP assintomático, aumentando assim a incidência desta patologia (24).

Deste modo, um dos primeiros sinais de HPTP é o aumento dos níveis de cálcio sérico ionizado detectados por exame bioquímico de rotina, e o diagnóstico pode ser feito pela presença dos níveis elevados de cálcio, acompanhado de níveis inapropriadamente elevados de PTH intacta (43).

Assim, para que uma paratireoidectomia seja bem sucedida, as técnicas de imagiologia médica são fundamentais na localização pré-operatória das glândulas hiperfuncionais.

As técnicas de imagiologia mais usadas na pesquisa de glândulas paratireoideais anômalas são a cintilografia, ultrassonografia e, ressonância magnética (MRI), sendo as duas primeiras usadas preferencialmente (6).

A cintilografia é o procedimento de medicina nuclear mais usado para identificar as glândulas paratireoideais responsáveis pelo desenvolvimento de HPTP. O sestamibi é um radiofármaco (metoxi-isobutil-isonitrilo - MIBI) nuclear que está ligado a um isótopo radioactivo, o Tc99m. Este MIBI é absorvido por glândulas hiperfuncionais, uma vez que este composto se concentra nos tecidos com elevado fluxo sanguíneo, elevada taxa metabólica e conteúdo mitocondrial. A sensibilidade desta técnica varia entre os 60% e os 85%. Uma fonte comum de falsos positivos é a presença de nódulos tireoideus, e glândulas paratireoideais de pequenas dimensões levam à existência de falsos negativos (6, 24, 44).

A ultrassonografia é uma técnica não invasiva, de baixo custo, mas com uma sensibilidade que vai dos 22% aos 80%. Usando esta técnica pode ser difícil localizar glândulas retroesofágicas, retrotraqueais, e retroestrenais (6,24).

A MRI pode ser especialmente útil na localização de glândulas ectópicas, mas é uma técnica de elevado custo (6,24).

Assim, a localização das glândulas paratireoideais bem como a distinção entre doença uni ou multiglandular estão muito dependentes da experiência do cirurgião.

Nenhuma das técnicas anteriormente referidas usa marcadores biológicos para detectar estas glândulas, ou para distinguir glândulas normais de glândulas

hiperfuncionais. O desafio da investigação em qualquer patologia é a identificação de marcadores (clínicos, genéticos, séricos, entre outros) que permitam a definição de subgrupos de forma a maximizar as estratégias de tratamento. Estes biomarcadores, se suficientemente específicos, poderão ser usados no desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e de monitorização cirúrgica. Potencialmente estes biomarcadores poderão ainda constituir alvos de novas estratégias terapêuticas dirigidas. Assim, o melhor conhecimento da patologia molecular, com a procura de um marcador molecular específico da doença, pode inclusivé evoluir para novas formas de marcação e diagnóstico pré e pós-operatório das glândulas afectadas, permitindo cirurgias cada vez mais dirigidas e, consequentemente, menos agressivas. Deste modo, o objectivo deste trabalho prende-se com o estudo molecular desta patologia, na tentativa de encontrar marcadores específicos desta patologia, de modo a que consigamos desenvolver um modelo teórico de identificação das glândulas paratireoideias com comportamento anómalo.

II. Objectivo do trabalho

As alterações moleculares subjacentes ao desenvolvimento de HPTP na sua vertente esporádica permanecem pouco conhecidas, não existindo até à data, alterações moleculares identificadas com impacto nas questões clínicas que permanecem por resolver.

O objectivo geral do presente trabalho é verificar a presença de alterações moleculares nos trinta casos de hiperparatireoidismo primário em estudo e, tentar implementar uma metodologia que permita a detecção do rearranjo PTH/Ciclina D1 (inv(11) (p15;q13)) de forma a verificar o seu potencial como biomarcador.

Assim, os objectivos específicos do presente trabalho são:

- 1- Estudo das alterações genéticas germinativas e somáticas dos genes *RET*, *MEN1*, *CDKN1B* em 30 indivíduos com HPTP aparentemente esporádico;
- 2- Avaliação, por imunohistoquímica, da expressão das proteínas Ciclina D1 e p27 em tecido tumoral;
 - 2.1-Extracção de proteínas de material incluído em blocos de parafina, seguido de análise por *Western blotting* da proteína Ciclina D1;
- 3- Detecção do rearranjo Ciclina D1/PTH (inv(11) (p15;q13)) usando a técnica de *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) em núcleos em interfase.

III Material e Métodos

1. Recolha do material biológico

A partir de uma base de dados existente no Hospital Pedro Hispano, referente ao período entre Janeiro de 1994 e Dezembro de 2006, foi efectuada a revisão retrospectiva da casuística de doentes tratados por HPTP no Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Pedro Hispano.

Foi elaborado o desenho do estudo, em colaboração com uma cirurgiã deste hospital (Eva Barbosa). O estudo foi apresentado ao Conselho de Administração e Comissão de Ética do referido hospital tendo sido aprovado pelas referidas entidades em 2007. Todos os doentes incluídos no estudo assinaram um consentimento informado (Documento em Anexos: Anexo I).

Foi autorizada a abertura de um período de consulta, com a denominação específica de “Hiperparatireoidismo Primário”. O período de consultas teve início em Janeiro de 2007 e término no final de Abril do mesmo ano. Amostras de sangue periférico e de tecidos tumorais conservados em parafina foram obtidas no Hospital Pedro Hispano.

2. Extracção de DNA de amostras de sangue periférico e tecidos conservados em parafinas

Para a extracção de DNA a partir de leucócitos usou-se o método de precipitação salina descrito por Miller e colaboradores em 1988, com algumas alterações (45).

Este método inicia-se com a lise dos eritrócitos sanguíneos através de uma solução hipotónica, AKE 1x (155mM de NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 1mM de EDTA a pH 7.4), seguindo-se a remoção dos mesmos. Seguidamente, as membranas celulares são rompidas pela adição de 200 μL de SDS 20% (p/v). Nesta fase foi também usada a enzima proteínase K que devido à sua elevada capacidade proteolítica evita a contaminação proteica no DNA, usaram-se 40 μL desta enzima a uma concentração de 20mg/mL. O pH da solução foi mantido estável (básico) usando-se 4mL de SE (75nM de NaCl, 25nM de EDTA). Esta solução foi incubada a 55°C durante a noite.

O passo seguinte foi a adição de 1mL de NaCl 6M previamente aquecido a 55°C e 5mL de clorofórmio, seguidamente esta mistura foi sujeita a uma agitação constante durante 30 minutos à temperatura ambiente. O NaCl tem como principal função a

neutralização das cargas eléctricas do DNA tornando assim, esta molécula pouco solúvel em água. O clorofórmio como solvente orgânico, solubiliza componentes indesejáveis (como lípidos) e desnatura proteínas.

Após uma centrifugação (4°C, 2500rpm, 10min) obtêm-se duas fases, rejeitando-se a fase inferior (proteínas, lípidos e restos celulares). Por fim precipita-se, com 5mL de isopropanol, o DNA está presente na fase superior.

Seguidamente à extracção procedeu-se à lavagem do DNA com 1mL de etanol 70% (v/v), uma vez que este remove sais e moléculas orgânicas pequenas, promovendo também a sua desidratação. No final, o DNA foi ressuspensão em TE (Tris-HCL 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0).

Os tecidos recolhidos durante um processo cirúrgico são por rotina fixados em formaldeído e embebidos em parafina. Este tipo de preservação das amostras possibilita a delimitação das áreas de tecido normal e tecido tumoral. Após selecção nas respectivas lâminas das áreas de interesse, realizaram-se 3 cortes de 5µm.

Todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente, excepto quando especificado o contrário.

Antes de se iniciar a extracção do DNA removeu-se a parafina dos tecidos através da incubação dos cortes com *Clear Rite 3* (Thermo Scientific) e promoveu-se a sua hidratação em etanol 98% (v/v).

Para a extracção de DNA a partir de tecidos parafinados usou-se o *kit Puregene* (Gentra Systems) seguindo as instruções do fabricante. Para promover a proteólise dos elementos citoplasmáticos e a remoção de histonas, adicionou-se 300µL de *Cell Lysis Solution* e 2,5µL de proteínase K (20mg/mL), a incubação ocorreu a 55°C durante a noite.

A precipitação proteica ocorreu através da adição de 100 µL de *Protein Precipitation Solution*.

Após uma centrifugação o *pellet* de proteínas é desprezado e, o DNA que está presente no sobrenadante é precipitado em 300µL de isopropanol. Para aumentar a eficiência da precipitação usou-se glicogénio (20mg/mL). Após centrifugação (16 000g, 5minutos), o excesso de sais foi removido através da lavagem do DNA em etanol 70% (v/v).

No final o DNA foi eluído em 30 µL de TE e armazenado a 4°C.

3. Amplificação do DNA por *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

A técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis em 1985 e consiste na amplificação enzimática exponencial de fragmentos de moléculas de DNA, *in vitro* (46).

Neste trabalho, usou-se um volume final de 25µL para as reacções de PCR, com a seguinte composição: 100ng de DNA, 0,24µM *primer forward* e de *primer reverse*, 1x solução *buffer* de PCR (Promega), 0,2mM dNTPs (Bioron), 2,5mM MgCl₂ (Promega), 0,02units/µL de *Taq* DNA polimerase (Promega) e água desionizada para perfazer o volume final. Para cada reacção ou conjunto de reacções, realizou-se sempre um controlo negativo, que consistia na mistura reaccional anterior, mas sem adição de DNA e sujeito às mesmas condições de reacção.

As reacções foram sujeitas a uma desnaturação inicial do DNA, durante 5min a 95°C, seguindo-se 35 a 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo de amplificação compreendia uma desnaturação do DNA a 95°C durante 30 segundos, hibridização dos *primers* à temperatura de emparelhamento (ver Anexos: Anexos II: Tabelas 1, 2, 3) durante 30 segundos e polimerização das novas cadeias a 72°C durante 1 minuto. Após os ciclos de amplificação, efectua-se uma extensão final a 72°C, durante 10 minutos.

A avaliação da eficiência das reacções de PCR foi feita através da aplicação de 5µL do produto de PCR em gel de agarose 2% (p/v) com *Gel Star* (Cambrex) e observado num transiluminador.

Técnicas para a detecção de alterações génicas

4. *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP).

Esta técnica foi desenvolvida por Orita e colaboradores, em 1989, sendo uma técnica muito usada para *screening* mutacional (47).

A técnica baseia-se no facto de cadeias simples de DNA formarem uma estrutura tridimensional determinada pelo emparelhamento das bases que a constituem, bem como no estabelecimento de ligações intramoleculares. Uma alteração na sequência nucleotídica origina uma reestruturação da molécula, levando a alterações na estrutura tridimensional e consequente alteração do padrão de migração electroforético.

A técnica de SSCP foi realizada num sistema vertical da BIO-RAD que por sua vez se encontrava ligado a uma fonte de alimentação eléctrica.

A mistura de gel incluiu uma solução de MDE (*Mutation Detection Enhancement*, Cambrex), TBE 10x (Tris-base, ácido bórico, EDTA 0.5M), APS (amónio persulfato) a 10% (p/v), TEMED (N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine) e água desionizada de modo a perfazer um volume final de 21,7mL.

Para o SSCP, usou-se 5µL de produtos de PCR que foram diluídos na proporção 1:1 com *Loading Buffer* desnaturante (95% de formamida, 0,25% de azul bromofenol e 0,25% de xilenocianol), seguindo-se uma desnaturação térmica de 9 minutos a 98°C, no final deste processo, as amostras foram colocadas numa placa de arrefecimento durante 5 minutos.

A separação das cadeias de DNA ocorreu em gel de MDE não desnaturante de concentração variável, dependendo do fragmento (ver Anexos: Anexos II: Tabela 4) e sob uma diferença de potencial constante de 180V, durante 16 horas.

Os produtos de PCR/SSCP foram visualizados por coloração com nitrato de prata.

5. Sequenciação automática

As amostras foram agrupadas de acordo com o seu padrão de migração em SSCP, sendo sequenciada uma amostra representativa de cada um dos grupos formados.

A sequenciação automática baseia-se na técnica desenvolvida por Sanger e colaboradores em 1977 (48). Nesta reacção, a síntese de DNA ocorre na presença de precursores nucleotídicos normais (dNTPs) e de análogos, didesoxinucleótidos (ddNTPs), que não possuem o grupo hidroxilo do carbono 3'. Estes ddNTPs podem ser incorporados pela DNA polimerase através do seu grupo fosfato na posição 5', contudo a ausência do grupo hidroxilo leva ao não estabelecimento de uma ligação fosfodiéster com o dNTP seguinte, terminando assim a extensão da cadeia.

Assim, os produtos da reacção são uma série de cadeias oligonucleotídicas em que o tamanho é determinado pelo *primer* usado para iniciar a síntese de DNA e o local onde a sequência termina prematuramente.

Na sequenciação automática usam-se marcadores fluorescentes de cores diferentes para cada um dos quatro ddNTPs, que são excitados a diferentes comprimentos de onda.

Depois de feita a análise por um *software* específico, estes comprimentos de onda são "lidos" como picos com diferente coloração que correspondem à sequência nucleotídica do fragmento em análise.

Para a reacção de sequenciação foi usado o protocolo para o *kit* Big Dye® Terminator v3.1 cycle sequencing (Perkin Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA).

A reacção de sequenciação foi elaborada para um volume final de 10µL. Para cada amostra usaram-se 0,6µL de *Big Dye*, 3,4µL de *Sequence Buffer*, 0,3µL (0,3µM) do *primer forward* e 3µL de produto de PCR purificado. Este volume foi submetido a 1 ciclo de 94°C durante 30 segundos, 35 ciclos de 94°C durante 10 segundos, 10 segundos à temperatura de emparelhamento dos *primers*, 2 minutos a 60°C e no final 1 ciclo de 60°C durante 10 minutos.

Os produtos de PCR com os ddNTPs incorporados foram precipitados usando colunas de Sephadex G-50 (Amersham Biosciences).

Os 10µL de produto de sequenciação foram ressuspensos em 15µL de formamida e sujeitos a uma electroforese capilar usando o sequenciador ABI prism 3100 Genetic Analyser (Perkin – Elmer). Usando a versão 3.7 do programa Sequencing Analysis (Applied Biosystems, EUA) o sinal de fluorescência detectado foi convertido num electroferograma que representa a sequência de DNA analisada.

6. Multiplex Ligation - dependent Probe Amplification (MLPA)

A técnica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) é uma técnica que tem como base o princípio da técnica de PCR e é usada na detecção de anomalias genéticas como aneuploidia, deleções, e duplicações (49).

Esta técnica divide-se em quatro etapas: a desnaturação do DNA, a hibridação das sondas, reacção de ligação e a reacção de PCR.

Durante o primeiro passo, o DNA é desnaturado para que, seguidamente ocorra a hibridação das sondas. Cada sonda consiste numa sequência de oligonucleótidos complementar da sequência alvo onde estão ligados um par de *primers*. As sondas vão ligar-se às regiões alvo do DNA e apenas quando as duas sondas hibridizam em locais adjacentes é que podem ser ligadas durante a reacção de ligação. Como apenas as sondas que se encontram ligadas é que vão sofrer amplificação exponencial durante a reacção de PCR, a quantidade de produto de ligação de uma determinada sonda é uma medida do número de sequências alvo numa determinada amostra.

No final da reacção de MLPA, os produtos de amplificação são separados por electroforese capilar usando o ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin – Elmer) e o

software 310 GeneScan 3.1.2. transforma os sinais de fluorescência em electroferogramas.

Os dados obtidos no 310 GeneScan são sujeitos a análise por um software disponível na *Internet- MRC Coffalyser MLPA-DAT*.

O kit de MLPA usado neste trabalho foi o SALSA MLPA KIT P017-B1 MEN1 (MRC Holland, Amsterdam, the Netherlands) e todos os passos descritos anteriormente foram efectuados segundo as instruções fornecidas pelo fabricante. Após o término da reacção de MLPA, 1 μ L do produto final foi misturado com 0.6 μ L de TAMRA 500 (Applied Biosystems) e 14.4 μ L de formamida desionizada.

Como a análise dos resultados do MLPA se baseia em alteração da intensidade de sinais de uma ou mais sondas, foram usadas três amostras de referências, como recomendado pelo fabricante, provenientes de doadores de sangue.

Deteccção de alterações na expressão proteica

7. Imunohistoquímica

A detecção por imunohistoquímica consiste na ligação de um anticorpo primário não conjugado, ao seu antígeno (proteína em estudo) nas células do tecido. Na técnica usa-se também um anticorpo secundário biotinilado, que se irá ligar ao anticorpo primário. Seguidamente, a adição de um cromogénio permite a visualização da proteína em estudo (50). Os cortes de 2 μ m foram desparafinados e seguidamente hidratados. A recuperação antigénica foi efectuada usando uma solução de citrato 2M pH6, a 100°C durante 30 minutos. Uma vez que o método de detecção tira partido da acção da enzima peroxidase, foi necessário realizar o bloqueio da peroxidase presente nos tecidos. Para o bloqueio da peroxidase endógena usou-se uma solução de peróxido de hidrogénio a 3% (v/v) em metanol. Para evitar ligações inespecíficas com imunoglobulinas endógenas foi feito o bloqueio do tecido usando uma solução de bloqueio (Ultra V Block da Lab Vision Corporation) durante 10 minutos. Os anticorpos primários diluídos (ver Anexos: Anexos II: Tabela 5) numa solução de diluição (Large Volume Ultra Ab Diluent da Lab Vision Corporation) foram incubados nas secções durante um tempo determinado, em função do anticorpo. Seguidamente, o anticorpo secundário biotinilado (Biotinylated Goat Anti-Polivalent da Lab Vision Corporation) foi incubado com os cortes durante 10 minutos. Após este período de incubação, o complexo streptavidina – peroxidase

(Streptavidin Peroxidase da Lab Vision Corporation) foi adicionado e deixado a incubar durante 10 minutos

Para finalizar, os cortes foram incubados com a solução de DAB, que consiste no cromogéneo DAB (Diaminobenzidina) diluído no diluente de DAB (40 μ L/mL) (UltraVision Detection System da Lab Vision Corporation), durante 10 minutos. Os cortes foram lavados em água corrente, seguindo-se a coloração nuclear com hematoxilina de Mayer.

As lâminas foram observadas ao microscópio e numa ampliação de 400x realizou-se a contagem de células marcadas. Para a análise da expressão da Ciclina D1, considerou-se sobre expressão desta proteína quando mais de 10% das células apresentavam marcação nuclear. No caso da análise da expressão da proteína p27, os casos que apresentaram mais de 5% dos núcleos marcados foram classificados como positivos para a expressão da proteína.

8. Extracção de proteínas de tecidos incluídos em parafinas

A extracção de proteínas do material embebido em parafina tem como princípio a reversão das ligações estabelecidas durante a fixação dos tecidos em formaldeído (51).

Para este fim, usamos o *kit* Qproteome FFPE Tissue (Qiagen) e as amostras foram processadas segundo as instruções do fabricante, apenas com ligeiras alterações.

Foram efectuados três cortes de 10 μ m de cada amostra tumoral. Os cortes foram desparafinados e hidratados em *Clear Rite* e etanol, respectivamente.

Seguidamente, apenas o tecido correspondente à região tumoral foi dissecado.

Após a dissecção destas áreas adicionou-se cerca de 100 μ L de *Extraction Buffer* (o volume a adicionar varia com a quantidade de tecido disponível) e as amostras foram incubadas a 100°C durante 2 horas.

No final das 2 horas, as amostras foram colocadas durante 1 minuto a 4°C, seguindo-se uma centrifugação a 10 000g durante 15 minutos. O sobrenadante, que contém as proteínas extraídas foi retirado e armazenado a -20°C.

Outro método utilizado para a extracção de proteínas de material parafinado foi a utilização de uma solução de *RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) buffer* (25mM Tris-HCl pH7,6; 150mM NaCl; NP40 1%; SDS 2%) no lugar no *kit* acima referido, seguindo o mesmo protocolo.

9. Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) e Western blotting

9.1 SDS-PAGE

O objectivo do SDS-PAGE é separar proteínas de acordo com o seu tamanho (52). O extracto proteico a ser analisado é primeiro desnaturado com o detergente aniónico SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) a 98°C durante 5min, o que leva à perda da estrutura tridimensional da proteína, ao mesmo tempo este detergente aniónico atribui carga negativa às proteínas proporcionalmente à sua massa. Seguidamente, as proteínas foram sujeitas a um processo electroforético em gel de acrilamida (BIO-RAD) a 12% (v/v), durante o qual se separaram de acordo com o seu tamanho.

9.2 Western blotting

O Western blotting é uma técnica que permite a detecção de proteínas específicas, através do uso de anticorpos (52). Após a separação das proteínas no gel de acrilamida, realizou-se a sua transferência para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), utilizando para isso um sistema de transferência (BIO-RAD). A eficiência da transferência foi verificada através da coloração reversível com Ponceau S.

A membrana foi bloqueada com uma solução de leite em pó 5% (p/v) em PBS 1x Tween20 0,02% (v/v) (PBS-T) com o objectivo de minimizar as ligações inespecíficas dos anticorpos.

Seguidamente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário específico para a proteína que se pretende detectar (ver Anexos: Anexos II: Tabela 6), durante um período de tempo específico para cada anticorpo. As membranas são lavadas três vezes durante 10 minutos após a remoção do anticorpo primário e em seguida realiza-se a incubação com o anticorpo secundário, que se irá ligar ao anticorpo primário. Este anticorpo secundário tem ligado a si a enzima peroxidase, que cataliza uma reacção de quimioluminescência. A adição de uma solução de ECL (GE Healthcare) permite que haja a emissão de luz. A luz emitida é proporcional à quantidade de proteína presente e a excitação da película fotográfica (GE Healthcare), que é colocada sobre a membrana permite visualizar a proteína de interesse.

IV. Resultados

1. Pesquisa de mutações na linhagem germinativa.

1.1 Análise molecular do gene *MEN1*

Do gene *MEN1* (OMIM 131100) foram analisados os exões do 2 ao 10.

A análise dos resultados obtidos por SSCP por sequenciação automática permitiram detectar a presença de uma mutação germinativa, bem como a presença de uma variante polimórfica.

A mutação germinativa consiste numa deleção de 4bp (ACAG) com início no nucleótido 628 (exão 3). Prevê-se que esta mutação *frameshift* (c.628_631delACAG) conduza à codificação de uma proteína truncada, por dar origem a um codão de terminação prematuro, no codão 222.

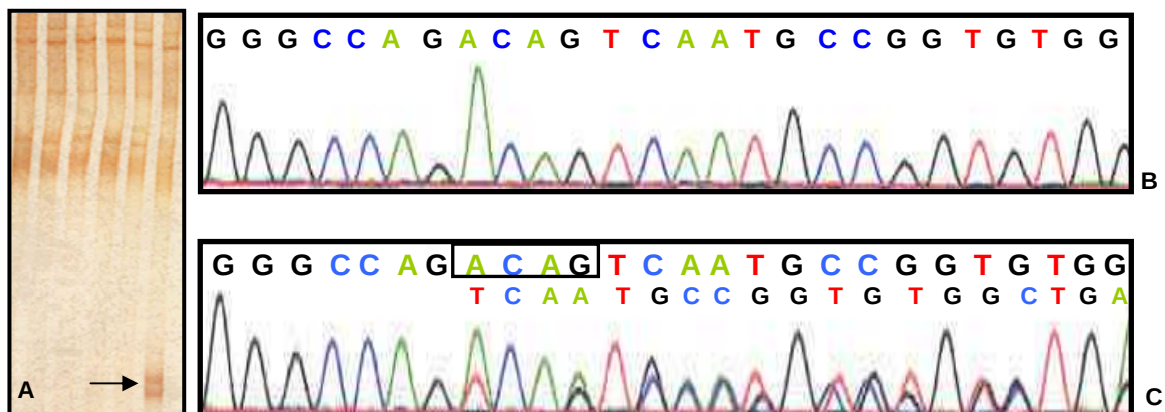


Imagem 3:A- Padrão de SSCP obtido em gel de MDE 0,8% para exão 3 do gene, no qual se pode observar um padrão de migração diferente (seta). **B** - sequenciação de uma amostra com padrão de SSCP normal; **C**- Sequenciação da amostra com padrão de SSCP anormal revelou a presença de uma deleção de 4bp (ACAG).

A previsão da alteração a nível proteico foi feita utilizando *software* apropriado *ExPASy Proteomics Server* (www.expasy.ch).

Sequência <i>wt</i>	GGC	CAG	ACA	GTC	AAT	GCC	...	TAC
Sequência <i>mut</i>	GGC	CAG	TCA	ATG	CCG	GGT	TGA	
Codão número	208	209	210	211	212	213 ...	222	
Amino ácido (<i>wt</i>)	Gly	Gln	Thr	Val	Asn	Ala	Tyr	
Amino ácido (<i>mut</i>)	Gly	Gln	Ser	Met	Pro	Gly	STOP	

Imagem 4: Esquema ilustrativo da alteração resultante da deleção de 4bp a partir do nucleótido 628.

Esta mutação dá origem a uma proteína truncada, pois origina o aparecimento de um codão de terminação no codão 222. *Wt*: Wild type; *Mut*: Mutated.

A variante polimórfica observada consiste na transição de uma citosina para uma timina (GAC → GAT) no codão 418 do gene. Esta variação representa uma alteração sinónima, a D418D (rs2071313), visto que ambos os codões codificam para um ácido aspártico.

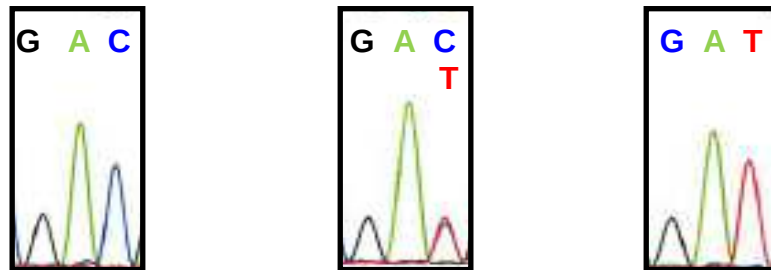


Imagem 5: Resultados da sequenciação automática do exão 9 de gene *MEN1*. Ilustração das três variantes genóticas para o polimorfismo D418D.

As frequências genóticas referentes a esta variação polimórfica são: CC 0,30 ; CT 0,57 e TT 0,13. Na população em estudo, esta variante está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p=0,294$). As frequências genóticas na população Portuguesa são: CC 0,29; CT 0,51 e TT 0,20.

1.2 Análise molecular do gene *RET*

Do gene *RET* (OMIM 164761) foram analisados os exões 10, 11, 13, 14, 15 e 16 uma vez que é neste exões que estão localizados os *hot spots* mutacionais.

Os resultados foram negativos para mutações em toda a população em estudo.

Verificou-se a presença de variações polimórficas nos exões 11, 13 e 14.

No exão 11 verificou-se a transição de uma guanina para uma adenina (GGT → AGT) no codão 691. Prevê-se que esta alteração conduza à codificação de um resíduo de serina (Ser/S) no lugar de uma glicina (Gly/G), G691S (rs1799939).

As frequências genotípicas encontradas são: GG 0,80; GA 0,17 e AA 0,03. As frequências descritas para a população Europeia são: GG de 0,652; GA 0,304 e AA 0,043. A variante polimórfica em estudo está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p=0,326$).

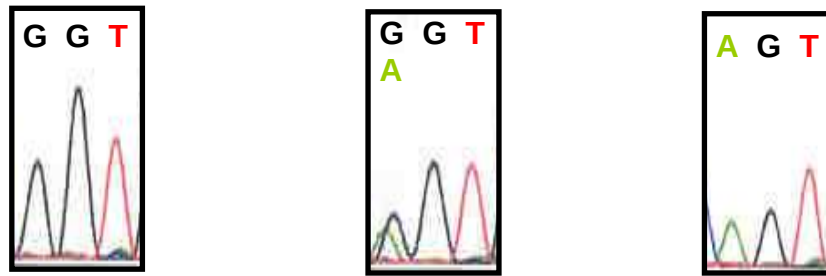


Imagem 6: Resultados da sequenciação automática para o exão 11. Os electroferogramas ilustram as três variantes genotípicas para do polimorfismo G691S.

No exão 13 verificou-se a transição de uma timina para uma guanina (CTT → CTG) no codão 769. A modificação da base azotada conduz a uma alteração sinónima, ou seja, ambos os codões codificam para uma leucina (Leu/L), L769L (rs1800861).

As frequências genotípicas encontradas são: TT 0,40; TG 0,57 e GG 0,03 e a população está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p=0,201$). As frequências genotípicas descritas para esta variante polimórfica, na população Europeia são: 0,614 TT; 0,343 TG e 0,043 GG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=RET>).

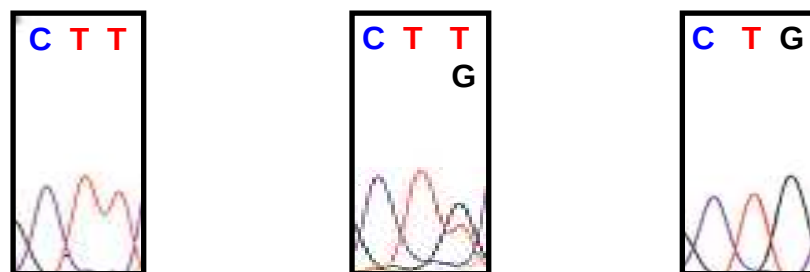


Imagem 7: Resultados da sequenciação automática do exão 13 do gene *RET*. Os electroferogramas ilustram as três variantes genotípicas do polimorfismo L769L.

No exão 14 verificou-se a transição de uma citosina para uma timina (AGC → AGT) no codão 836, S836S (rs1800862). Esta alteração nucleotídica conduz a uma alteração sinónima, pois ambos os codões codificam um resíduo de serina (Ser/S) .

As frequências genótípicas presentes na população em estudo são CC 0,90 , CT 0,10 e TT 0,00. Este polimorfismo está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p=1,00$).

As frequências genótípicas na população Portuguesa são: 0,96 CC, 0,04 CT e 0,00 TT.

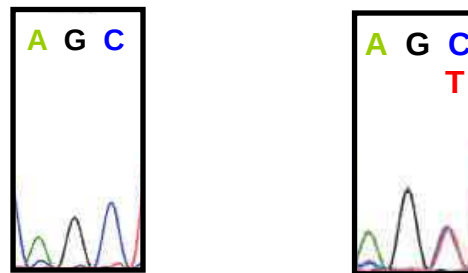


Imagem 8: Resultados obtidos por sequenciação automática para o polimorfismo S836S do gene *RET*, ilustrando as duas variantes genótípicas encontradas na população em estudo.

1.3 Análise molecular do gene *CDKN1B*.

A análise do gene *CDKN1B* foi feita por sequenciação directa dos seus dois exões. Não se verificou a presença de mutações, apenas uma alteração polimórfica no exão 1. A alteração presente no exão 1 consiste na transição de uma timina para uma guanina (GTC → GGC) no codão 109. Esta alteração nucleotídica promove a substituição de um resíduo de valina (Val/V) por um resíduo de glicina (Gly/G), V109G (rs2066827).

As frequências genótípicas encontradas na população em estudo são: TT 0,80; TG 0,17 e GG 0,03. Esta variante polimórfica está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p=0,326$).

As frequências genótípicas descritas para a população Europeia são: TT 0,610; GT 0,373 e GG 0,017.

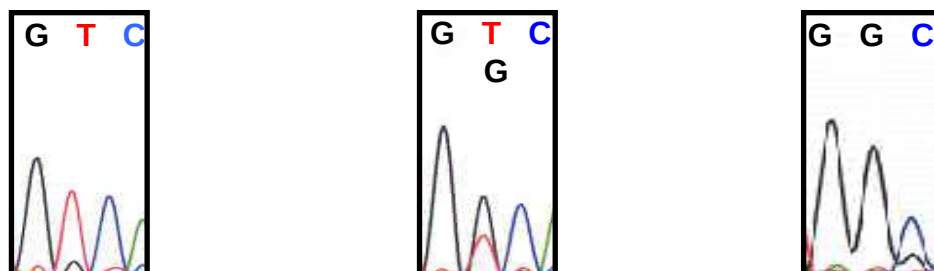


Imagem 9: Resultados obtidos por sequenciação do exão 1 do gene *CDKN1B*. As imagens ilustram as três variantes genótípicas encontradas na população em estudo.

Tabela 1: Tabela resumo das alterações germinativas nos genes *MEN1*, *RET* e *CDKN1B* (n=30).

Gene & Exão	Nucleótido/Codão	Alteração genética & Substituição aminoacídica	Tipo de alteração genética	Frequências genotípicas	Equilíbrio Hardy Weinberg
<i>MEN1</i> Exão 3	628/210	c. 628_631delACAG	Mutação <i>frameshift</i>	0,03	NA
<i>MEN1</i> Exão 9	1254/418	GAC→GAT D418D	Polimorfismo sinónimo	CC = 0,30 CT = 0,57 TT = 0,13	p=0,293
<i>RET</i> Exão 11	2081/691	GGT→AGT G691S	Polimorfismo não-sinónimo	GG = 0,80 GA = 0,17 AA = 0,03	p=0,326
<i>RET</i> Exão 13	2307/769	CTT→CTG L769L	Polimorfismo sinónimo	TT = 0,40 TG = 0,57 GG = 0,03	p=0,201
<i>RET</i> Exão 14	2693/836	AGC→AGT S836S	Polimorfismo sinónimo	CC = 0,90 CT = 0,10	p=1,000
<i>CDKN1B</i> Exão 1	326/109	GTC→GGC V109G	Polimorfismo não-sinónimo	TT = 0,80 TG = 0,17 GG = 0,03	p=0,326

Nota: Os polimorfismos e as mutações estão numerados em relação ao cDNA, onde o nucleótido +1 corresponde ao A do ATG do codão de iniciação.

NA : Não Avaliado.

2. Pesquisa de alterações na linhagem somática

2.1 Alterações moleculares no gene *MEN1*

Os resultados da análise de alterações somáticas estão restritos a 25 dos 30 indivíduos estudados anteriormente, devido à impossibilidade de obter material histológico em 5 casos.

A análise por SSCP e a sequenciação dos exões 2 a 10 do gene *MEN1* levou à identificação de duas mutações somáticas no exão 2, uma delas ainda não descrita na literatura.

Uma das mutações é uma deleção de 49bp, com início no nucleótido 115, codão 39 (c.115_163del49bp). Prevê-se que esta mutação *frameshift* origine uma proteína truncada pelo aparecimento de um codão de terminação (codão *Stop*) prematuro, no codão 102.

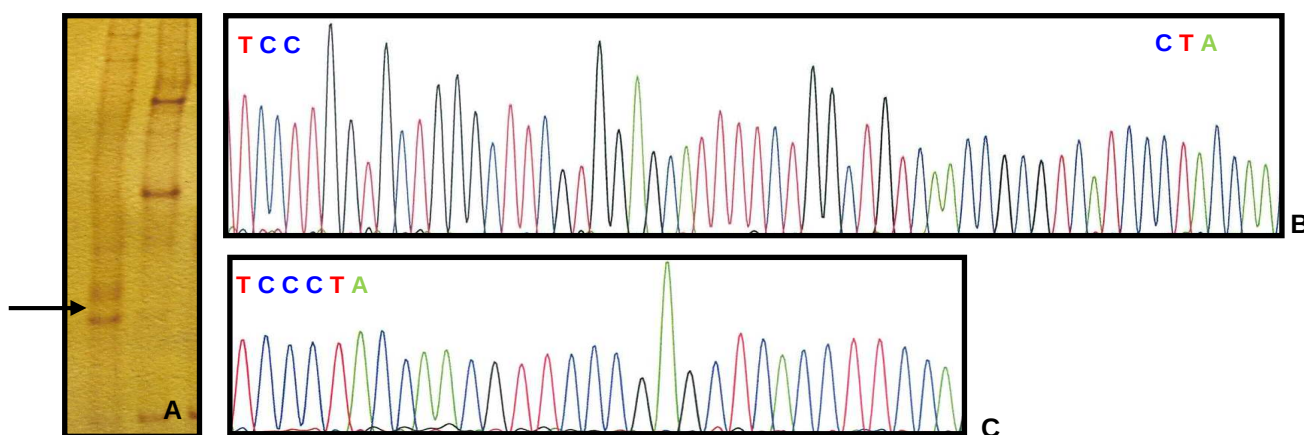


Imagem 10: As imagens ilustram a deleção de 49bp com início no nucleótido 115 (exão 2). A- Padrão de SSCP correspondente à mutação (seta). Os electroferogramas revelam em B a sequência normal e em C a existência de uma deleção, que ocorre entre os nucleotídeos 115 e 163.

Sequência wt	CTC	CTT	TCC	TTG	GTG	...CCT	ACC	...GAC
Sequência mut	CTC	CTT	TCC	CTA	CCA	ACG	TTC	TGA
Codão número	36	37	38	39	40	...	55	56 ... 102
Amino ácido (wt)	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Pro	Thr	Asp
Amino ácido (mut)	Leu	Leu	Ser	Leu	Pro	Thr	Phe	STOP

Imagem 11: Esta imagem ilustra as alterações resultantes da deleção de 49bp no exão 2 do gene *MEN1* a nível proteico. Prevê-se que esta mutação origine uma proteína truncada, devido ao aparecimento de um codão de terminação prematuro no codão 102. (A leitura da sequência reinicia no codão 55 após a deleção).

Wt: Wild type; Mut: Mutated.

Uma vez que esta alteração foi encontrada em hemizigotia, suspeitou-se que o outro alelo (o alelo normal) teria sido delectado, ou seja, estaríamos na presença de perda de heterozigotia (*LOH*).

Para verificar esta hipótese foi utilizada a técnica de MLPA que permite verificar eventuais perdas de material cromossómico na região ocupada pelo gene *MEN1*, na região 11q13.

Assim, comparando a amostra que apresenta a deleção com os casos controlo (sem alteração) verifica-se a presença de diferenças entre os electroferogramas (ver imagem 12). A comparação entre o resultado obtido na linhagem somática (DNA

tumoral) e o correspondente da linhagem germinativa (DNA de sangue periférico do doente), aponta para a ocorrência de dois eventos genéticos na linhagem somática (delecção de 49bp verificada por sequenciação e *LOH*) (ver imagem 12 c)).

Os resultados do MLPA foram analisados pelo programa *Coffalyser MLPA data analysis software*, que fornece informação relativamente às porções do gene que foram perdidas.

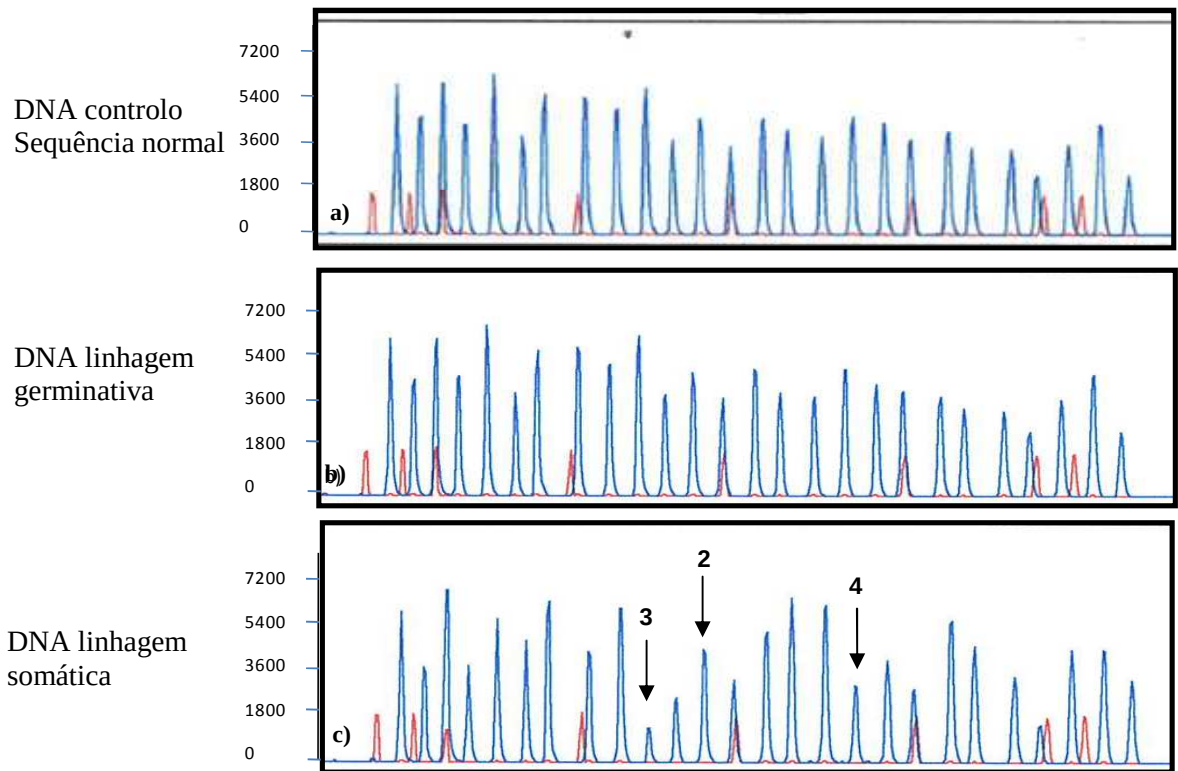


Imagem 12: Esta imagem ilustra os resultados de MLPA obtidos para o caso que evidencia a delecção de 49bp em hemizigotia. **a)** Controlo negativo do MLPA (caso com sequência normal); **b)** Electroferograma correspondente à análise do DNA da linhagem germinativa por MLPA do caso com a delecção somática de 49bp; **c)** Electroferograma correspondente à análise da linhagem somática do caso portador da delecção de 49bp. As regiões que sofreram delecção estão apontadas com uma seta e os números indicam os exões delectados ().↓

A outra mutação encontrada neste gene é uma delecção de 4bp (GTCT) com início no nucleótido 249 (c.249_252delGTCT), prevê-se que esta mutação conduza ao aparecimento de uma proteína truncada, pois origina um codão de terminação prematuro, no codão 117.

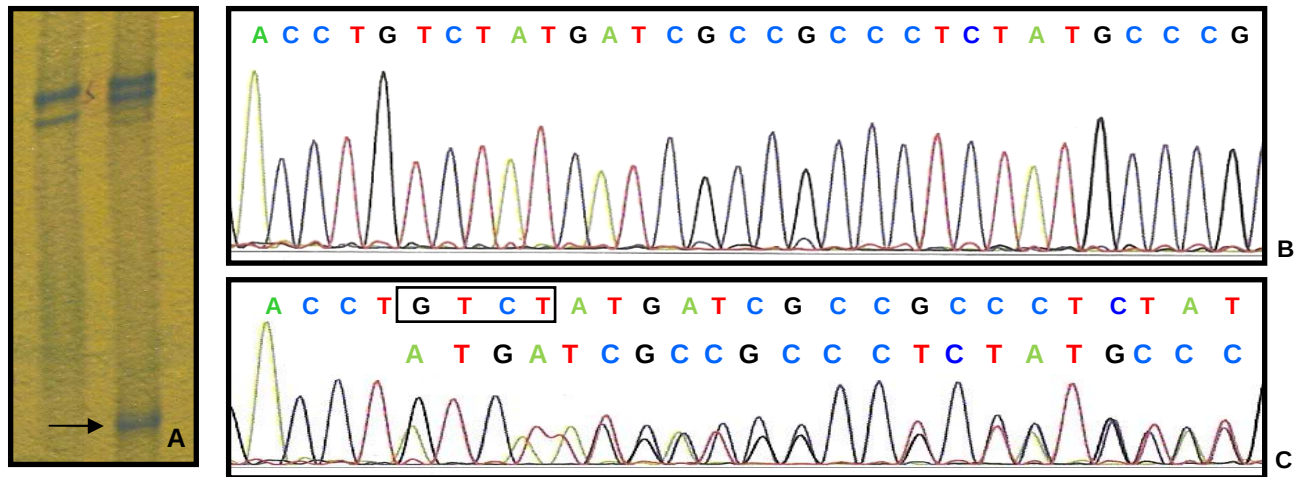


Imagem 13: A-Padrão de SSCP relativo à deleção de 4bp (GTCT) no codão 83 no exão 2, B- electroferograma da sequência normal; C- electroferograma da sequência com deleção de 4 bp.

O software *ExPASy Proteomics Server* (www.expasy.ch) permitiu, mais uma vez, prever qual o efeito a nível proteico desta mutação, sendo de esperar o aparecimento de um codão de terminação prematuro, na posição 117.

Sequência <i>wt</i>	GCC	GAC	CTG	TCT	ATC	ATC...CTG
Sequência <i>mut</i>	GCC	GAC	CTA	TCA	TCG	CCG TGA
Codão número	81	82	83	84	85	86 ... 117
Aminoácido (<i>wt</i>)	Ala	Asp	Leu	Ser	Ile	Ile Leu
Aminoácido (<i>mut</i>)	Ala	Asp	Leu	Ser	Leu	Pro STOP

Imagem 14: Esta imagem ilustra os efeitos da deleção de 4bp a partir do nucleótido 249. Esta deleção de 4bp dá origem ao aparecimento de um codão *stop* prematuro, originando uma proteína truncada.

A análise somática (n=25) do polimorfismo D418D (rs2071313) no gene *MEN1* permitiu verificar as seguintes frequências genotípicas CC 0,37; CT 0,41 e TT 0,22.

A comparação entre os resultados obtidos na linhagem germinativa e somática permitiram verificar que quatro indivíduos heterozigóticos na linhagem germinativa (CT), apresentaram um perfil hemizigóticos (T ou C) na linhagem somática, o que é sugestivo de perda de heterozigotia (*LOH*).

Destes quatro indivíduos genotipicamente CT, três apresentaram apenas o alelo T e o restante apenas o alelo C na linhagem somática.

Estes resultados foram posteriormente confirmados por MLPA (Imagem 15). Verificou-se em 3 destes casos perda de material genético correspondente ao exão 9. O restante caso mostrou perda de vários exões incluindo o exão 9.

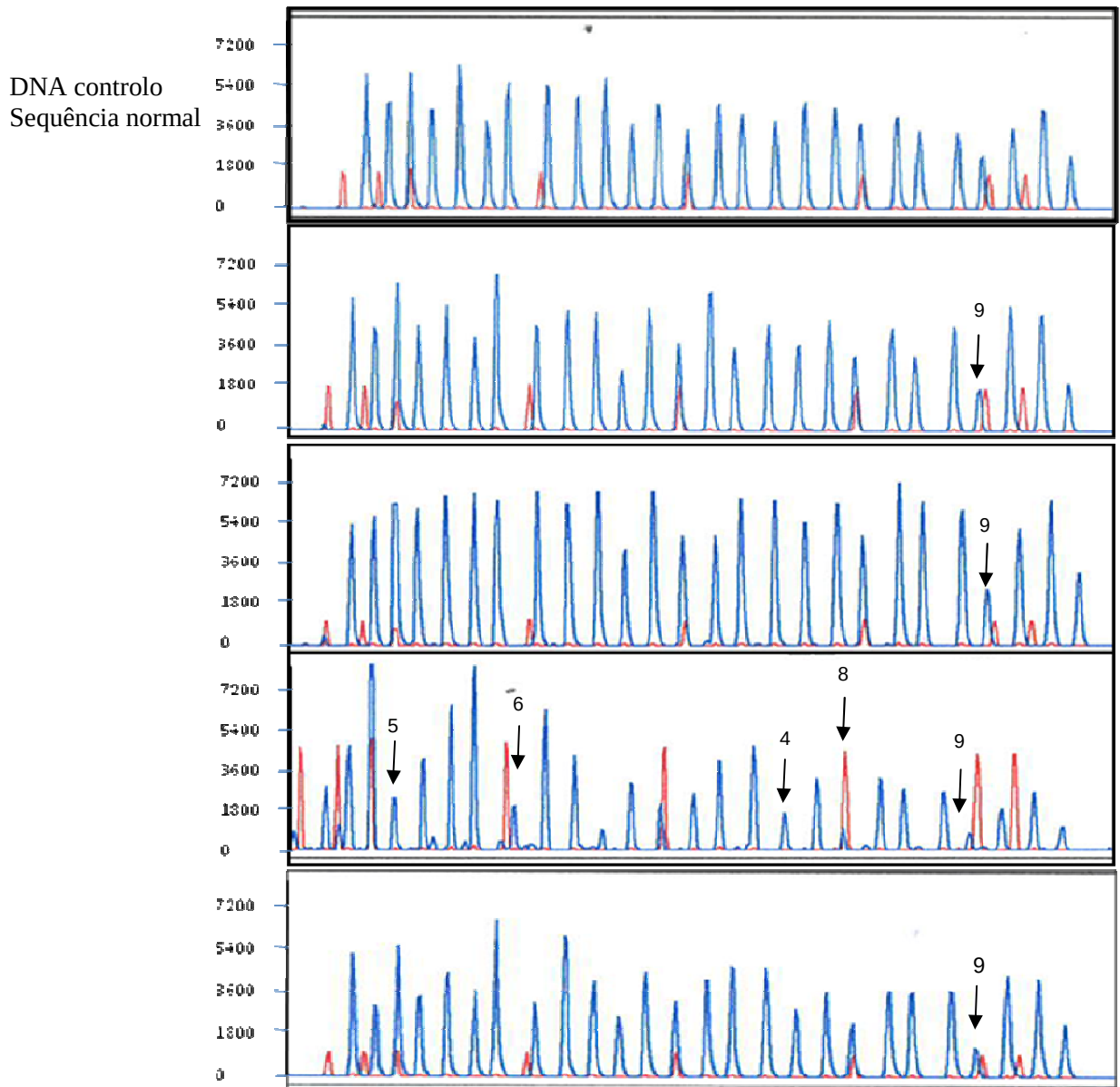


Imagem 15: Esta imagem representa os resultados obtidos por MLPA para os casos que revelaram *LOH* para o polimorfismo D418D no gene *MEN1*. (As setas apontam para as regiões detectadas pela técnica como estando perdidas).

Os restantes casos foram também sujeitos a análise por MLPA, uma vez que poderiam ter sofrido perda de material cromossômico, não tendo sido esta evidenciada pela sequenciação, o que poderá ocorrer nos casos homozigóticos para a variante

D418D, bem como para casos que apresentem deleções fora da região desta variante polimórfica. Deste modo, foi possível verificar a existência de deleções em mais 5 casos.

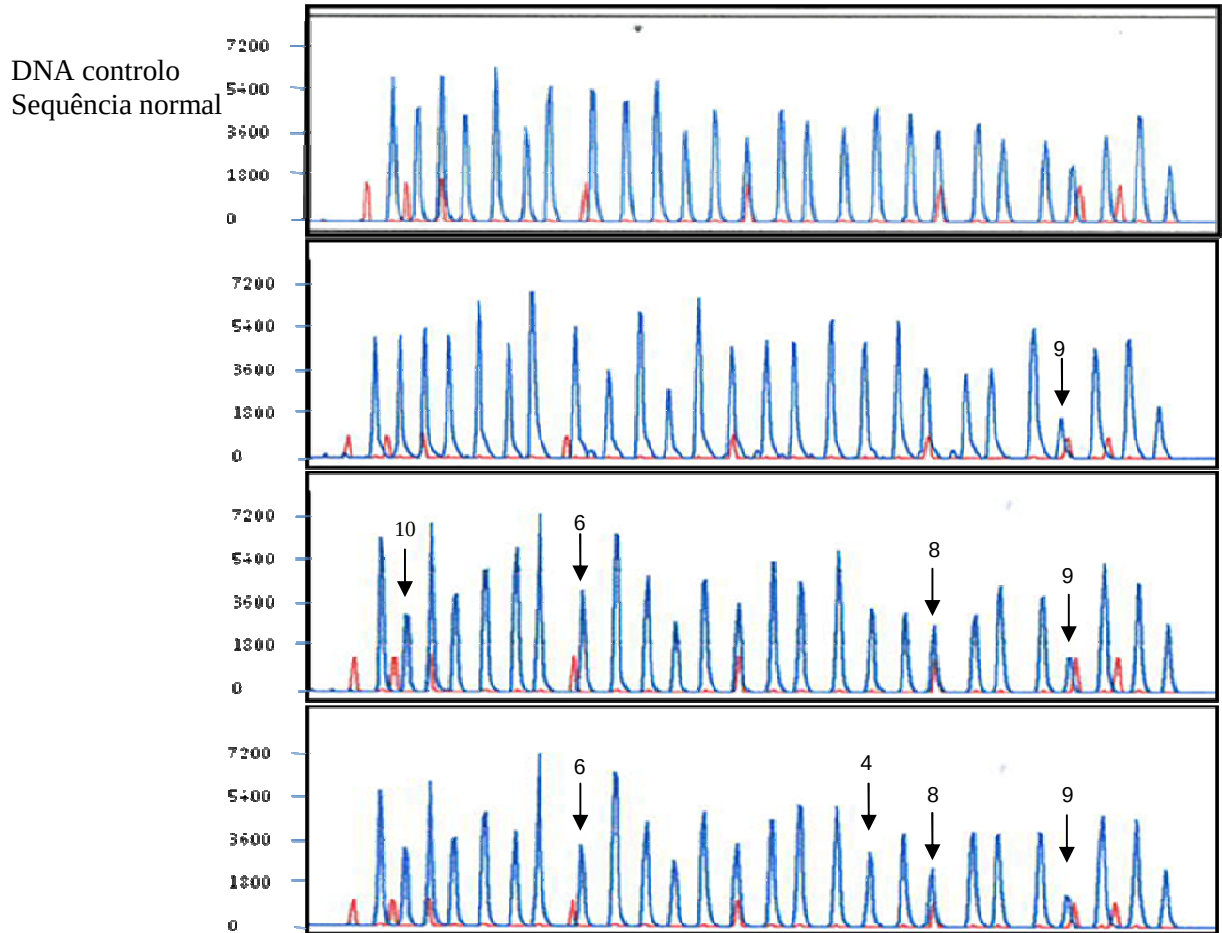


Imagem 16: Esta imagem apresenta três exemplos dos resultados obtidos por MLPA em casos em que a análise do polimorfismo D418D se revelou não informativa para a evidência de *LOH*. (As setas apontam para as regiões detectadas pela técnica como estando perdidas).

2.2 Alterações moleculares no gene *CDKN1B*.

Foi feita a pesquisa de alterações somáticas no gene *CDKN1B* também por sequenciação, dos exões constituintes deste gene (exão 1 e 2).

Não se verificou a presença de qualquer alteração genética, excepto a presença da variante polimórfica V109G.

As frequências genotípicas são as mesmas que as encontradas na linhagem germinativa.

Tabela 2: Tabela resumo das alterações somáticas (n=25).

Gene & Exão	Nucleótido/Codão	Alteração genética	Tipo de alteração genética	Frequências
<i>MEN1</i> Exão 2	115/39	c. 115_163del49bp	Mutação <i>frameshift</i>	0,04
<i>MEN1</i> Exão 2	249/83	c. 249_252delGTCT	Mutação <i>frameshift</i>	0,04
<i>MEN1</i>			<i>LOH</i>	0,40

Nota: os polimorfismos e as mutações estão numerados em relação ao cDNA, onde o nucleótido +1 corresponde ao A do ATG do codão de iniciação.

2.3 Alterações na expressão da proteína Ciclina D1.

O estudo por imunohistoquímica da proteína Ciclina D1 revelou sobre expressão desta proteína em 4 dos 25 (16,0%) casos estudados, usando um *cut-off* positivo de 10%.

Os restantes casos foram considerados negativos.

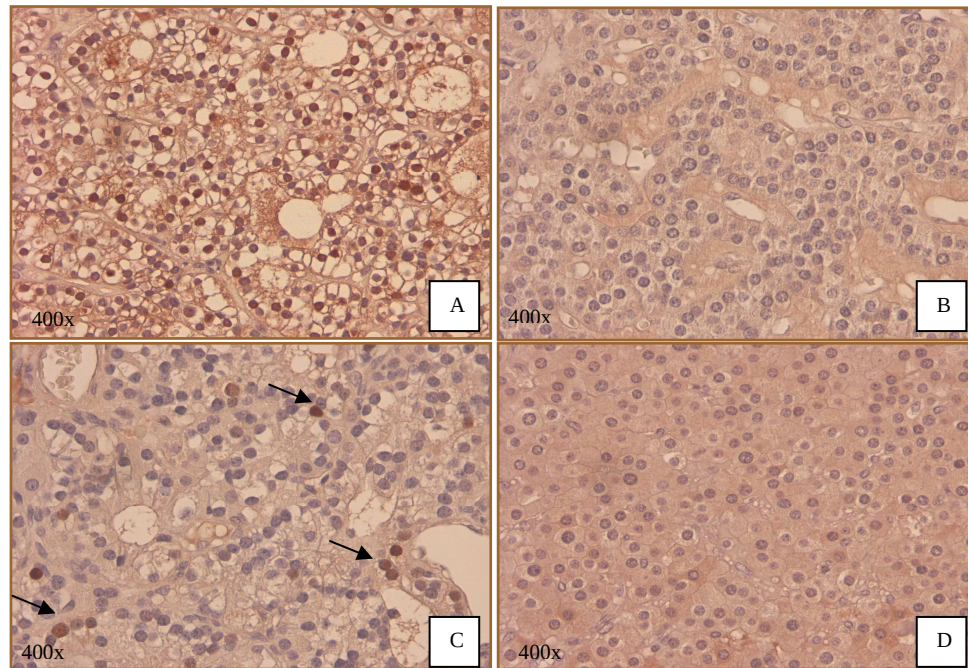


Imagem 17: Exemplos dos resultados de imunohistoquímica obtidos para a Ciclina D1.

A – caso classificado como positivo para a expressão da Ciclina D1, em que 33,3% dos núcleos das células tumorais se encontravam marcados; **B** e **D** - representam casos negativos para a expressão da proteína; **C** – representa um caso positivo, mas com uma percentagem de 19,7% de núcleos marcados (setas). (Ampliação de 400x).

Tabela 3: Tabela resumo dos resultados obtidos na imunohistoquímica para a Ciclina D1.

	Negativos	Positivos
Nº de casos n (%)	21 (84,0%)	4 (16,0%)
% de células marcadas	0 -5%	20 - 35%

2.4. Alterações na expressão da proteína p27.

Dos 25 casos em estudo, todos (100%) revelaram expressão nuclear da proteína p27 e destes 25 casos, 9 (36%) evidenciavam também expressão citoplasmática da proteína.

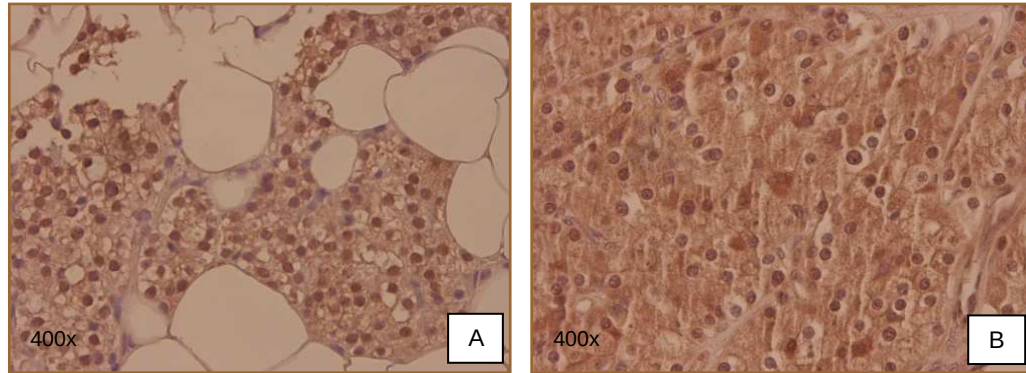


Imagem 18: Exemplos de resultados de imunohistoquímica obtidos para a proteína p27. A – caso classificado como positivo para a marcação nuclear; B – caso classificado como positivo para a marcação nuclear e citoplasmática. (Ampliação de 400x).

3. Detecção de alterações moleculares da proteína Ciclina D1.

Partindo dos 4 casos que revelam sobre expressão da proteína Ciclina D1, realizou-se a extracção de proteínas do material tumoral incluído em parafina, com o objectivo de comparar o peso molecular da proteína nativa com o peso molecular da proteína sobre expressa.

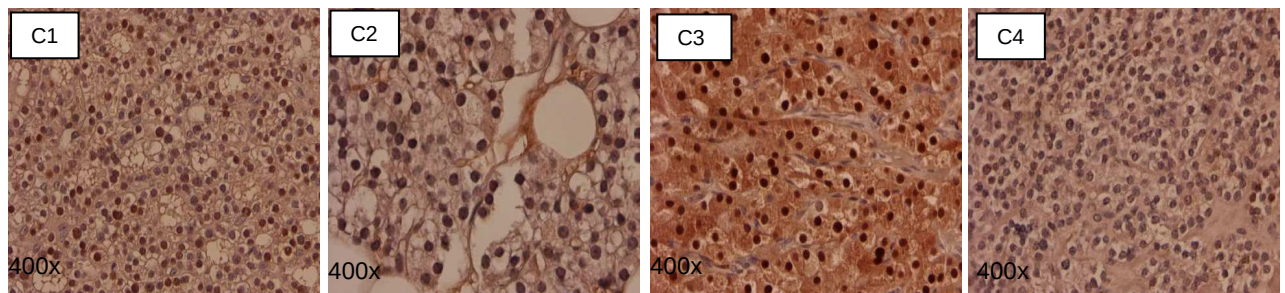


Imagem 19: Imagens de imunohistoquímica ilustrativas dos quatro casos com sobre expressão da proteína Ciclina D1.

Após a análise por *Western blot* verificamos a presença da proteína Ciclina D1 de peso molecular igual ao da proteína nativa (wt), 34kDa.

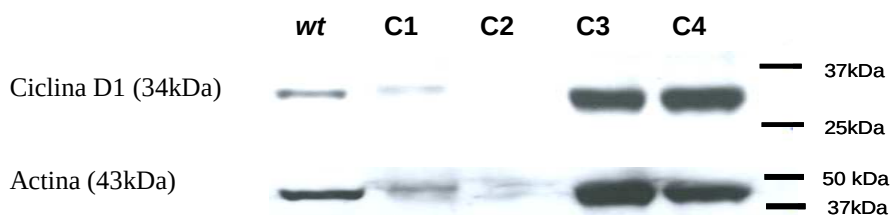


Imagem 20: *Western blot* para a Ciclina D1, nos casos que revelaram sobre expressão.

V. DISCUSSÃO

O hiperparatireoidismo primário (HPTP) é a principal causa de hipercalcemia, podendo ocorrer na sua forma esporádica ou associada a síndromes tumorais hereditários. Nas formas familiares são conhecidos os genes responsáveis pelo respectivo fenótipo, mas os mecanismos moleculares envolvidos na forma esporádica da patologia permanecem pouco conhecidos (23).

A população incluída neste estudo foi constituída por 30 doentes com HPTP aparentemente esporádico, seleccionados de uma base de dados com 80 doentes seguidos no Hospital Pedro Hispano.

Na primeira fase do presente trabalho foi feito o rastreio de três formas familiares de HPTP de forma a excluir a origem familiar dos casos de HPTP em estudo: a síndrome MEN1, a MEN2A e a síndrome MEN1-like syndrome. Outros síndromes com manifestação familiar de HPTP como, FHH, NSHPT e HPT-JT não foram incluídos no estudo já que a história familiar e avaliação clínica não apontavam para a presença de nenhuma destas outras formas.

Na série estudada, foi feita a pesquisa de alterações genéticas de toda a região codificante do gene *MEN1*, ou seja do exão 2 ao 10, tendo-se verificado a presença de uma mutação germinativa num dos doentes.

A mutação germinativa encontrada corresponde a uma deleção de 4bp (ACAG) com início no nucleótido 628 (c.628_631delACAG). Esta mutação está presente em heterozigotia e é uma mutação *frameshift* uma vez que altera a grelha de leitura da sequência nucleotídica, originando um codão de terminação prematuro no codão 222. A nível proteico deverá resultar na codificação de uma proteína truncada, ou seja, não funcional. Cerca de 75% das mutações descritas no *MEN1* resultam numa proteína Menina truncada, levando a perda de função (53,54).

A presença desta mutação indica que este indivíduo é portador de uma forma familiar de HPTP, a síndrome MEN1, e não de uma forma esporádica. A mutação (c.628_631delACAG) encontrada neste indivíduo já se encontra descrita na literatura em famílias com síndrome MEN1, sendo a sua frequência de 2,5% (29, 53).

Apesar de pouco provável, não podemos excluir de todo a existência de outras alterações germinativas na série em estudo. Em 10 e 20% das famílias com fenótipo clínico de síndrome MEN1, não são detectadas mutações germinativas neste gene (55). A não detecção de alterações nas sequências exónicas poderá dever-se à localização de

mutações em regiões reguladoras ou regiões não traduzidas do gene. A patologia observada poderá ainda resultar de grandes deleções germinativas no gene *MEN1*, não detectáveis por sequenciação directa, como já foi observado em famílias portuguesas (56), ou então, de alterações moleculares noutros genes ainda não identificados.

O diagnóstico de *MEN1* num doente, tem implicações importantes, uma vez que os parentes em primeiro grau têm um risco de 50% de herdar o alelo mutado, e desenvolver a doença devido à sua elevada penetrância.

Se, por um lado, a identificação de uma alteração genética germinativa pode auxiliar na detecção e tratamento precoce de algumas patologias associadas, por outro lado, o rastreio clínico e bioquímico de tumores endócrinos pode ser suspenso em familiares não portadores da mutação no gene *MEN1* (57). Por este motivo, realizamos o teste genético a um descendente deste indivíduo, que se veio a revelar positivo (resultados não apresentados).

Diversos estudos permitem afirmar a não existência de correlação genótipo - fenótipo consistente para os casos de *MEN1*. Verificou-se que gémeos monozigóticos com mutação no *MEN1* podem apresentar fenótipos diferentes e que famílias com manifestações clínicas muito semelhantes não possuem o mesmo tipo de mutações (58). Isto sugere que poderá verificar-se alteração de expressão de uma determinada mutação dependendo do fundo genético do indivíduo, por exemplo através da acção de genes modificadores (genes que afectam a expressão fenotípica de outro gene) (59).

No gene *MEN1* observamos ainda a presença de uma variante polimórfica (GAC → GAT) no codão 418 e que consiste numa variação sinónima (D418D).

Pela consulta de bases de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) verificamos tratar-se de uma variante polimórfica já descrita, presente em mais de 1% da população.

As frequências por nós obtidas não variam significativamente das observadas na população controlo estudada por outros autores (60).

A variante D418D está descrita na literatura como um polimorfismo muito frequente na população, sem qualquer efeito na função da proteína (61). Alguns autores referem que esta variante polimórfica poderá ser um potencial marcador de HPTP esporádico (60), mas na nossa série não encontramos uma relação estatisticamente significativa entre a presença deste polimorfismo e HPTP.

Uma outra síndrome familiar onde o HPTP é um componente é, como já foi referido, a síndrome *MEN2*, concretamente a variante *MEN2A*. Mutações activantes no

gene *RET* estão directamente relacionadas com o desenvolvimento desta síndrome. A síndrome MEN2A é a forma mais comum de MEN2 e caracteriza-se pela presença de carcinoma medular da tireóide (CMT), feocromocitoma e/ou tumores paratireoideus. Em indivíduos com MEN2A a frequência de CMT é de 90%, de feocromocitoma 40-50%, e tumores paratireoideus 10-20%. O CMT é geralmente a primeira manifestação de MEN2A (62).

Ao contrário do que se verifica na síndrome MEN1, na síndrome MEN2 verifica-se a existência de uma correlação genótipo-fenótipo. Isto significa que há uma associação clara entre as mutações no gene *RET* (genótipo), a idade de aparecimento da patologia, a agressividade, e a presença de outras neoplasias, como o feocromocitoma e hiperparatireoidismo primário (fenótipo) (63). Apesar de se poder verificar alguma sobreposição entre as mutações e o subtipo de MEN2, 85% dos indivíduos com MEN2A tem mutação no codão 634 (exão11). Mutações nos codões 609, 611, 618 e 620 estão presentes nos restantes 10 a 15% dos casos. O HPTP está associado a mutações no codão 634, e em particular com a mutação C634R (64,65).

Apesar de o HPTP ser um componente raro da síndrome, o CMT encontra-se associado a HPTP em 15 a 25% dos casos de MEN2A (66).

A população em estudo não revelou a presença de mutações germinativas no gene *RET*, o que fortalece a hipótese de estarmos na presença de casos de HPTP esporádicos.

A análise deste gene evidenciou, no entanto, a presença de variantes polimórficas no exão 11 (G691S), 13 (L769L), e 14 (S836S).

O polimorfismo G691S (rs1799939), localizado no exão 11 está presente na população em estudo em frequências genótípicas semelhantes às descritas para a população Europeia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Trata-se de um polimorfismo não sinónimo ou seja uma variação alélica de um gene que, por definição, não altera a funcionalidade da proteína codificada, apesar de originar alterações na sequência aminoacídica (67). Esta alteração está bem descrita em estudos de MEN2, principalmente em casos de CMT (67,68) tendo alguns autores verificado uma maior frequência deste polimorfismo, G619S, em indivíduos com CMT do que na população controlo (23.3% vs. 12.5%). Estes mesmos autores referem que, apesar deste polimorfismo estar presente na população “normal”, a sua elevada frequência em indivíduos com CMT sugere que esta variante genética poderá ter um papel na

patogénese, bem como na predisposição para o desenvolvimento de CMT esporádico. O polimorfismo G691S determina uma substituição aminoacídica, o que poderia conferir ao receptor uma estrutura conformacional e electroquímica diferente, levando a uma actividade funcional diferente. Por outro lado a frequência com que ele é encontrado em indivíduos saudáveis torna difícil demonstrar a relação entre o polimorfismo e o desenvolvimento de CMT (69). Este aspecto permanece pouco esclarecido (67).

No exão 13 verificou-se a existência de um polimorfismo no codão 769 (rs1800861) que dá origem a uma mutação silenciosa, não há troca de aminoácido (L769L). Este polimorfismo está presente na população em estudo com as frequências genotípicas indicadas na tabela 1 (secção III: Resultados). Diversos estudos tentaram verificar a existência de relação entre esta variante polimórfica e o risco de desenvolver CMT.

Winch e colaboradores descreveram que este polimorfismo ocorria principalmente em indivíduos com CMT esporádico diagnosticado em idades precoces (36%<30 anos vs 15%>30 anos) (70). Estes autores sugerem que este polimorfismo poderá ter um papel modulador na apresentação fenotípica do CMT, em indivíduos com predisposição (71). Em contraste, Elisei e colaboradores não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas de indivíduos com CMT e indivíduos normais (67).

Por fim, o polimorfismo no exão 14, codão 836 (rs1800862) dá origem também a uma variação sinónima, em que o resíduo de serina é mantido. Tal como os polimorfismos anteriormente referidos, as frequências genotípicas podem ser consultadas na tabela 1 (secção III: Resultados). De novo, alguns estudos referem uma maior frequência deste polimorfismo em indivíduos com CMT do que em indivíduos controlo (72,73). Contudo, torna-se difícil explicar como é que uma variante que não leva a alteração aminoacídica origina activação oncogénica de um gene.

Apesar de o polimorfismo não afectar a capacidade de ligação DNA – proteína, a estabilidade da transcrição ou o *splicing* do RNA, há autores que propõem que a presença do polimorfismo pode causar instabilidade na sequência nucleotídica que está a jusante do exão 15, dando origem a uma mutação a nível somático (72). Em 1999, Gimm e seus colaboradores verificaram a importância da variante S836S do exão 14 e chamaram a atenção para a maior frequência desta variante em indivíduos com CMT

esporádico provenientes da Alemanha e Estados Unidos da América, comparativamente aos controlos da mesma área geográfica (9% vs 3.6%; $p=0,03$). A hipótese por eles postulada era que a variante S836S levaria à criação ou facilitação de um local de *splicing*, que daria origem a uma nova proteína (72).

Nenhum destes polimorfismos do gene *RET* foi associado com o risco de doença da paratireóide e os nossos resultados não são conclusivos dado o limitado número de casos estudados.

O estudo do gene *CDKN1B* neste trabalho deve-se, como já foi referido, ao trabalho publicado por Pellegata e colaboradores em 2006 (25). Neste trabalho, os autores referem a presença de uma mutação germinativa *nonsense* no codão 76 (c.G692A) do gene *CDKN1B* num indivíduo fenotipicamente MEN1 (apresenta acromegalia devido a tumor na pituitária e hiperparatireoidismo primário), mas que revelava ausência de mutações no gene *MEN1*. Estes mesmos autores verificaram a existência de uma síndrome de neoplasia endócrina múltipla em ratinho (MENX), em que o gene responsável é o *CDKN1B* (25).

Também Georgitsi e colaboradores verificaram a presença de uma mutação germinativa no *CDKN1B* num indivíduo fenotipicamente MEN1, sem mutação no gene *MEN1*. A mutação descrita por estes autores corresponde a uma duplicação de 19bp no exão 1.

A nível proteico, esta duplicação origina uma proteína truncada, devido ao aparecimento de um codão de terminação prematuro. A proteína resultante tem menos 69 aminoácidos que a proteína nativa (74).

Com base nestes achados, foi proposta a designação de um novo tipo de neoplasia endócrina múltipla, MEN4, sendo esta nova síndrome ainda um pouco controversa devido ao pequeno número de casos identificados.

Tendo isto em conta, foi feita a pesquisa de mutações no gene *CDKN1B* na série em estudo. Verificamos a ausência de mutações, mas a presença de uma variante polimórfica no codão 109, V109G. Este polimorfismo está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e as frequências genotípicas estão descritas na tabela 1 (secção III: Resultados). Neste gene estão descritos vinte e um polimorfismos, destes vinte e um, onze têm uma frequência baixa ($< 5\%$) e os restantes nove ocorrem na região não codificante do gene. Apenas este polimorfismo no codão 109 origina substituição de aminoácido (41). Kibel e colaboradores verificaram a associação entre homens com

genótipo TT e o risco aumentado de desenvolver carcinoma da próstata (*odds ratio*=1,95; 95% *confidence interval*= 1,09 – 3,47) (75).

Autores referem que este polimorfismo poderá ter algum efeito na degradação da proteína *in vivo* (76) e outros que esta alteração *missense* poderá alterar a interação entre o *CDKN1B* e o seu regulador negativo, o p38^{jab1}, uma vez que está situado na zona de interação entre ambos (77).

Uma vez estudados alguns dos genes de susceptibilidade ao HPTP familiar, seguiu-se a análise das alterações genéticas a nível tumoral.

A análise somática dos tumores paratireoideus permitiu verificar a presença de duas mutações no gene *MEN1*: c.115_163del49bp e c.249_252delGTCT. Nenhuma destas mutações estava presente na linhagem germinativa, confirmando tratar-se de mutações somáticas.

Como já foi referido inicialmente, uma vez que a proteína Menina não revela homologia com motivos proteicos conhecidos até à data, é difícil prever a sua acção como um gene supressor tumoral. Nos últimos anos têm surgido evidências de que esta proteína poderá ter um papel vital na transcrição genética, proliferação celular, apoptose, e estabilidade do genoma (21).

As mutações encontradas são deleções, o que é consistente com o facto de se tratar de um gene supressor tumoral, e prevê-se que originem uma proteína truncada, e por isso, não funcional.

As mutações afectam um dos três sinais de localização nuclear (SLN) pelo que a proteína truncada resultante, se for expressa, poderá ter perdido pelo menos um dos seus SLN (78).

A primeira mutação encontrada é uma deleção de 49bp. Esta deleção não se encontra descrita na literatura e está presente em hemizigotia. Este aspecto confirma o modelo *two-hit* de Knudson para genes supressores tumorais, mutação de um alelo e perda do alelo normal.

A segunda mutação encontrada, c.249_252delGTCT está descrita na literatura como sendo uma mutação muito frequente na linhagem germinativa (com uma frequência de 4,5%) (29), apesar de aqui ocorrer na linhagem somática, é de notar que este caso não revela a existência de *LOH*. Este facto sugere a ocorrência de alterações epigenéticas que poderão levar ao silenciamento do alelo nativo, como por exemplo

metilação. Este aspecto foi verificado por Cavallari e colaboradores que observaram a presença de metilação nas ilhas CpG da região promotora do gene *MEN1*, em adenocarcinomas do ducto pancreático (79).

Uchino e colaboradores, na série por eles estudada de HPTP com mutação somática no *MEN1* mas sem evidência de *LOH*, sugerem que a presença de células normais poderá obscurecer a presença de *LOH* (80).

Estão descritas mutações do *MEN1* em cerca de 13-26% dos tumores paratireoideus esporádicos e tal como acontece na linhagem germinativa, as mutações estão espalhadas ao longo de toda a região codificante do gene, não havendo nenhum *hot spot* mutacional descrito. Cerca de 40% das mutações são deleções ou inserções *frameshift*, 29% das mutações são *missense*, 18% *nonsense*, 7% ocorrem em locais de *splicing*, e 6% são deleções ou inserções *in frame* (29).

A comparação entre a localização das mutações somáticas e germinativas revelam uma maior frequência de mutações somáticas no exão 2 (39% (somáticas) vs 23% (germinativas); $P < 0,001$). Apesar da pequena série por nós estudada, verificámos a presença de deleções somáticas localizadas no exão 2, embora num pequeno número de tumores, 2 em 25 (8%). As restantes amostras não revelaram, por sequenciação, mutações no *MEN1*, o que indica que poderão existir outras alterações somáticas responsáveis pela tumorigénese paratireoideia (9).

De facto, observámos que casos heterozigóticos na linhagem germinativa para a variante D418D, apresentavam um genótipo hemizigóticos na linhagem somática o que sugere *LOH*. Os casos com um genótipo homozigóticos (CC ou TT) não permitem, numa primeira análise, verificar a existência ou não de *LOH*, sendo considerados casos não informativos para *LOH*.

Por este motivo utilizamos uma abordagem alternativa para detecção de deleções somáticas, a técnica de MLPA.

Através da técnica de MLPA verificamos a presença de deleções em 40% (10/25) dos casos estudados.

Farnebo e colaboradores verificaram a presença de *LOH* em 29% dos tumores da paratireóide estudados (13/45), destes tumores com *LOH*, 6 (46%) tinham mutação no *MEN1*. Os casos positivos para *LOH*, mas que não revelam mutação no *MEN1* podem conter mutações em regiões não codificantes do gene, podem ter sofrido inactivação por metilação, ou então poderá existir outro gene supressor tumoral a desempenhar um papel na tumorigénese paratireoideia (80,81).

A outra alteração somática frequentemente observada em tumores paratireoideus é a sobre expressão da proteína Ciclina D1 (82).

A Ciclina D1 é uma proteína reguladora do ciclo celular cujos níveis de expressão se encontram frequentemente alterados numa variedade de tumores. O aumento da expressão da Ciclina D1 é uma característica de diversos tumores humanos, com implicações a nível de diagnóstico e prognóstico (83).

No presente estudo, a sobre expressão da Ciclina D1 verificou-se em 4 de 25 casos estudados (16%). Este valor ficou abaixo do referenciado na literatura, que aponta para sobre expressão desta proteína em 20-40% dos adenomas. Nenhum dos casos com sobre expressão revelava mutação no gene *MEN1*, sendo a expressão da Ciclina D1 em casos com mutação somática do gene *MEN1* observada em menos de 2% das células.

Theillaumas e colaboradores verificaram a existência de uma correlação negativa entre a expressão da proteína Menina e a expressão da Ciclina D1. Estes autores, usando a tecnologia de *antisenseRNA* numa linha celular de intestino delgado (IEC-17), verificaram que reduzindo os níveis da proteína Menina, há aumento da taxa de proliferação, aumento dos níveis da proteína Ciclina D1, e transformação tumorigénica destas células (84).

Não se encontram descritas mutações no gene que codifica a Ciclina D1 (*CCND1*), o que indica que a sobre expressão desta proteína, por si só, constitui um factor dominante na tumorigénese (85), uma vez que a expressão desta proteína raramente (<6% das células) está presente em tecido paratireoideu normal (86).

Como já foi referido na parte introdutória, em 1989 Arnold e colaboradores verificaram a presença de um rearranjo genético que envolvia o locus do gene *PTH* e o locus do gene *CCND1* (34).

Este rearranjo inv (11)(p15;q13) coloca o gene *CCND1* sujeito à regulação da região promotora do gene *PTH*, dando origem à sobre expressão da Ciclina D1 (18). O alelo da *PTH* que participa no rearranjo é, aparentemente, não funcional. O alelo não mutado representa a fonte de mRNA da *PTH* nas células tumorais (87).

Também Arnald e colaboradores referem a existência de 2 casos positivos para a presença do rearranjo, num total de 42 adenomas. Até à data não é conhecida com exactidão a percentagem de tumores da paratireóide que apresentam este rearranjo, dada a inexistência de metodologias apropriada para a sua detecção. O método usado para a detecção do rearranjo nos trabalhos publicados foi o *Southern blot*. No entanto, a

detecção do rearranjo por *Southern blot* oferece algumas limitações, por um lado a sensibilidade da técnica depende do número de enzimas de restrição usadas e dos seus locais de corte, por outro é necessário utilizar tecido fresco e uma quantidade apreciável de DNA para o estudo.

O baixo número de casos portadores do rearranjo, comparativamente ao número de casos que revelam sobre expressão da Ciclina D1 levanta a hipótese da existência de outras alterações genéticas que levam a um aumento da expressão desta proteína.

Diversos autores verificaram amplificação génica do *CCND1* em cerca de 30% (31 em 103) dos tumores da cabeça e pescoço, 11% (4 em 36) dos tumores da mama e, em 23% (28 em 122) dos casos de carcinoma das células escamosas do esófago (88).

Recentemente, verificou-se a existência de uma relação entre duas variantes polimórficas do gene *CCND1* (A870G e C1722G) e a expressão da respectiva proteína, que poderá resultar da criação de locais de *splicing* alternativo. O *splicing* alternativo dá origem a uma variante (ciclina D1b) que forma um complexo activo com a entidade Cdk4, mas perde o C-terminal da proteína que contém o resíduo treonina, onde ocorre a fosforilação necessária à exportação nuclear e subsequente degradação citoplasmática (89).

No presente trabalho verificamos também a expressão da proteína p27 por imunohistoquímica, uma vez que não foram encontradas alterações genéticas germinativas e somáticas, outros mecanismos poderiam dar origem a alteração da expressão proteica. Todos os casos analisados evidenciaram marcação nuclear, mas dos 25 casos em estudo, 9 (36%) evidenciam marcação citoplasmática.

A proteína p27 é essencialmente uma proteína nuclear, com a função de regular a progressão do ciclo celular, na passagem da fase G1 para S. Esta proteína liga-se aos complexos Ciclina D/CDK4 e Ciclina E/CDK2, exercendo diferentes funções. A ligação da p27 com o complexo Ciclina D/CDK4 não inibe a sua actividade cínase, a sua função é contribuir para a estabilidade do complexo formado. Por outro lado, a interacção da p27 com os complexos Ciclina E/CDK2 inactiva a sua capacidade cínase que é essencial para a progressão do ciclo celular (90).

Estudos realizados em linfomas de células do manto verificam que os casos que apresentam sobre expressão da Ciclina D1, também apresentam elevados níveis de p27.

O que os autores sugerem é que elevados níveis de Ciclina D1, bem como a presença da translocação t (11;14) que origina sobre expressão desta proteína, altera o

balanço entre os níveis da proteína p27 no seu estado livre ou complexado, o que irá favorecer a forma complexada inactiva, contribuindo deste modo para a tumorigénese (90). Nos casos em estudo não se verifica nenhuma relação entre os níveis de Ciclina D1 e p27. Os casos que revelam sobre expressão da proteína Ciclina D1 revelam níveis de expressão da proteína p27 comparáveis ao tecido paratireoideu normal.

Assim, seria relevante aumentar o número de casos estudados, bem como realizar a análise imunohistoquímica usando outro anticorpo primário anti-p27. Diversos autores verificaram que usando dois anticorpos diferentes, os resultados da imunohistoquímica para o p27 eram semelhantes, mas não idênticos (90).

Em alguns modelos verifica-se que a deficiência em p27 está associada à tumorigénese esporádica em humanos (39). Diversos autores referem que tumores da mama e do colón têm baixos níveis de expressão desta proteína, o que se associa com aumento da agressividade tumoral e fraco prognóstico (91, 92).

Estudos recentes sugerem que a falha na regulação da proteína p27 tem repercussões que vão para além da inibição dos complexos ciclina-cdk e modulação da proliferação.

Por outro lado, há estudos que indicam que os níveis desta proteína em tumores nem sempre se correlacionam com a taxa proliferativa desses mesmos tumores, o que poderá ser indicativo de outra acção para além da regulação do ciclo celular.

Diversos estudos começaram a tentar caracterizar a função da proteína p27, independente do seu papel na regulação dos complexos ciclina-cdk. Estas novas funções incluem regulação da actina a nível do citoesqueleto, e migração celular através da modulação da actividade da RhoA (*Ras homolog gene family member A*), que é uma GTPase que controla proteínas do citoesqueleto (39).

A análise da proteína Ciclina D1 por *Western blot* permitiu verificar que nos casos em que a proteína se encontra sobre expressa, a proteína presente tem o mesmo peso molecular da proteína nativa.

Como referido na parte introdutória deste trabalho, podemos verificar dois grandes efeitos resultantes de rearranjos genéticos: um deles é o aparecimento de uma proteína quimérica que resulta da fusão de genes diferentes, outro será a regulação de um determinado gene, por uma região promotora que não a sua. Também como foi referido anteriormente, sabe-se que em cerca de 5% dos adenomas paratireoideus a sobre expressão da Ciclina D1 resulta de uma inversão pericêntrica que coloca o gene

CCND1 sujeito à regulação da região promotora do gene *PTH* (9). Até à data, este rearranjo não se encontra descrito por técnicas citogenéticas, tendo sido apenas detectado por *Southern blot*. A caracterização de adenomas portadores desta inversão pericêntrica permitiu verificar que o ponto de quebra parece ocorrer entre 1 a 15kb acima do exão 1 do gene *CCND1*, deixando os exões e a região promotora deste gene intactos. Esta inversão leva à justaposição da região promotora, bem como do exão 1 não codificante do *PTH*, com os exões do gene *CCND1* (93).

Apesar do estudo anteriormente referido não revelar alterações ao nível do cDNA, tentamos verificar se a eventual presença do rearranjo resultaria numa proteína quimérica (93).

Os resultados obtidos não revelam a presença de alterações a nível proteico, ou seja, a proteína sobre expressa nos casos em estudo, tem o mesmo peso molecular que a proteína nativa, 34kDa.

Nos 4 casos que revelam sobre expressão da Ciclina D1 não sabemos se esta alterações foi provocada pelo rearranjo genético, inv (11)(p15;q13), ou outra alteração, pois como foi referido anteriormente, a Ciclina D1 está sobre expressa numa variedade de tumores devido a ocorrência de por exemplo, amplificação genética.

Caso se tivesse verificado a presença de uma proteína com peso molecular diferente de 34kDa poderíamos extrapolar que estaríamos na presença de uma proteína quimérica com origem no rearranjo genético.

A não detecção de uma proteína quimérica poderá resultar da ausência de rearranjo genético, nos casos estudo, ou então, se o rearranjo estiver presente origina uma proteína com o mesmo peso molecular que a proteína nativa.

Esta parte do trabalho representa uma primeira aborgem no sentido de detectar a inversão pericêntrica, pois poderia permitir a aplicação desta técnica na detecção de outros tipos de rearranjos, como por exemplo os rearranjos RET/PTC característicos de carcinoma papilar da tireóide, em material tumoral embebido em parafina (19).

Há exemplos de rearranjos genéticos que resultam em proteínas de fusão, que caracterizam determinados tipos tumorais, como por exemplo, o rearranjo BCR/ABL e o já referido RET/PTC (19, 94).

O RET/PTC representa as alterações genéticas mais frequentemente encontradas em casos de carcinoma papilar da tireóide (19).

Nesta fase do trabalho, o que se pretendia era tentar estabelecer um método alternativo de detecção da inv (11)(p15;q13) para verificar a eventual existência de

relação entre este evento genético e alguma característica tumoral, como por exemplo, a presença de “características de adenoma”.

A não detecção de alterações proteicas observáveis por *Western blot*, torna imperativa a optimização de técnicas citogenéticas (como a *Fluorescence in situ hybridization - FISH*) para a detecção do rearranjo Ciclina D1/PTH ou outras anomalias genéticas.

O melhor conhecimento da patologia molecular pode permitir verificar se realmente hiperplasia, adenoma, e adenomas múltiplos são ou não a mesma entidade, e ver se as diferenças morfológicas reflectem as diferenças moleculares.

A relevância da detecção de alvos específicos prende-se com o facto de assim facilitar o desenvolvimento de modelos teóricos de localização destas glândulas.

O trabalho desenvolvido permitiu verificar e também confirmar o envolvimento do gene *MEN1* e da proteína Ciclina D1 na tumorigénese paratireoideia, mas os dados obtidos são insuficientes para a validação destas entidades como biomarcadores.

Verificamos alterações genéticas no *MEN1* em 48% dos casos, o que evidencia um forte envolvimento deste gene na patologia em estudo. As alterações encontradas vão desde pequenas a grandes deleções, o que torna a análise deste gene morosa e dispendiosa. Por outro lado, a maioria das alterações genéticas observadas originam uma proteína truncada, o que poderia constituir um alvo de marcação. A limitação prende-se com o facto de não se saber se estas formas truncadas chegam a ser transcritas, devido à acção de mecanismos celulares que controlam a expressão de proteínas truncadas, ou com sequência errónea. Por outro lado, a ausência desta proteína ou a presença de uma forma truncada poderá representar um potencial marcador de neoplasia paratireoideia.

O estudo da Ciclina D1 não revelou alterações a nível da estrutura proteica, mas uma abordagem citogenética poderá revelar-se mais informativa.

Para encontrar um alvo utilizável no diagnóstico/prognóstico da neoplasia paratireoideia, seria necessário estabelecer o padrão de expressão génica das várias formas desta patologia, o que poderia permitir o aparecimento de alvos candidatos.

Será também importante a utilização de técnicas, como técnicas de imunocitoquímica e *tissue microarrays (TMA)*, uma vez que permitem a ligação de anticorpos específicos aos antígenos alvo, bem como a análise de um elevado número de amostras em simultâneo permitindo um estudo mais profundo e completo destas

glândulas, levando assim ao desenvolvimento de uma abordagem mais direccionada no que respeita a marcação específica destas glândulas.

VI. Conclusão

Neste trabalho, procedeu-se à caracterização molecular de uma população portuguesa com hiperparatireoidismo primário (HPTP) aparentemente esporádico. No total foram submetidos a análise genética da linha germinativa 30 indivíduos tendo sido possível realizar a caracterização molecular tumoral em 25 casos.

O estudo molecular permitiu a detecção de uma mutação germinativa (c. 628_631delACAG) no gene *MEN1*, presente num indivíduo. A presença desta mutação permitiu concluir que este caso não apresenta uma forma esporádica de HPTP, mas sim uma forma familiar, a síndrome MEN1.

A pesquisa de alterações nos genes *RET* e *CDKN1B* permitiu verificar a presença de variantes polimórficas (G691S, L769L, S863S, e V109G) não tendo sido detectada a presença de mutações. A ausência de mutações indica que nenhum dos casos em estudo é portador da síndrome MEN2 ou MEN1 – *like syndrome*.

O estudo na linhagem somática permitiu verificar a presença de duas mutações somáticas no gene *MEN1* (c. 115_163del49bp, e c.249_252delGTCT). A mutação c.115_163del49bp estava presente em hemizigotia, o que indica inactivação do alelo normal por *LOH*. Este aspecto é concordante com o facto de se tratar de um gene supressor tumoral, com um papel na tumorigénese paratireoideia.

A análise do gene *MEN1* por MLPA permitiu verificar perda de material cromossómico em 10 de 25 (40%) dos casos em estudo. Estes dados confirmam que o gene *MEN1*, para além de estar envolvido numa forma familiar de HPTP, desempenha também um papel no desenvolvimento da forma esporádica da patologia.

O estudo da expressão da proteína Ciclina D1 por imunohistoquímica revelou que 4 em 25 (16%) casos possuíam marcação nuclear em 20 a 30% das células tumorais, o que indica a presença de alterações moleculares que envolvem a Ciclina D1 e confirma o seu envolvimento nestas neoplasias.

A análise da proteína Ciclina D1, por *Western blot*, permitiu verificar que a proteína sobre expressa apresenta o mesmo peso molecular que a proteína nativa, o que

poderá indicar que o mecanismo subjacente à alteração da expressão desta proteína, não confere alterações estruturais proteicas.

A análise imunohistoquímica da proteína p27 revela expressão nuclear em todos os casos em estudo, e expressão citoplasmática em 9 dos 25 (36%) dos casos, o que poderá sugerir uma falha na regulação da proteína, bem como a capacidade de esta proteína desempenhar funções a nível citoplasmático.

Em suma, o estudo desenvolvido na presente tese permitiu uma melhor compreensão dos aspectos genéticos e moleculares associados ao desenvolvimento de tumores paratireoideus esporádicos. Revelou também a necessidade de optimização de técnicas citogenéticas que permitam verificar a presença de alterações genéticas envolvidas na expressão da proteína Ciclina D1.

Bibliografia

1. Hiller-Sturmhöfel, S. & Bartke, A. The Endocrine System - an overview. *Alcohol Health & Research World* **22**, 153-164 (1998).
2. Kovacs, K. & Asa, S.L. Functional Endocrine Pathology. (Blackwell Scientific Publications, 1991).
3. Mihai, R. & Farndon, J.R. Parathyroid disease and calcium metabolism *British Journal of Anaesthesia* **85**, 29-43 (2000).
4. Junqueira, L. & Carneiro, J. *Histologia Básica* (Guanabara Koogan, 2004).
5. Hendy, G.N. Molecular Mechanisms of Primary Hyperparathyroidism *Endocrine and Metabolic Disorders* **1**, 297-305 (2000).
6. Suliburk, J.W. & Perrier, N.D. Primary Hyperparathyroidism *Oncologist* **12**, 644- 653 (2007).
7. Taniegra, E.D. Hyperparathyroidism. *American Family Physician* **69**, 333-339 (2004).
8. Norman, A.W. & Hurwitz, S. The role of vitamin D endocrine system in avian bone biology. *the Journal of Nutrition* **123**(1993).
9. Miedlich, S., Krohn, K. & Pashke, R. Update on genetic and clinical aspects of primary hyperparathyroidism. *Clinical Endocrinology* **59**, 539-554 (2003).
10. Townsend, C.M., Beuachamp, R.D., Evers, B.M. & Mattox, K.L. *Sabiston Textbook of Surgery*, (Elsevier, 2004).
11. Elaraj, D.M. & Clark, O.H. Current status and treatment of primary hyperparathyroidism . *The Permanent Journal* **12**, 32-37 (2008).
12. Ippolito G, P.F., Sebag F, Henry JF. Long-term follow-up after parathyroidectomy for radiation-induced hyperparathyroidism. *Surgery* **142**, 819-822 (2007).
13. Mcphee, S.J. & Ganong, W.F. *Pathophysiology of the disease: an introduction to clinical medicine.*, (McGraw-Hill Companies, 2003).
14. Volgestein, B. & Kinzler, K.W. The multistep nature of cancer. *Trends in genetics* **9**, 138-141 (1993).
15. Dahl, C., Ralfkiaer, U. & Guldberg, P. *Methods for Detection Subtle Mutations in Cancer Genomes*, (Critical Reviews in Oncogenesis, 2006).
16. Kufe, B.J., Hait, Hong, Pollock, Weichselbaum, Holland, and Frei *Cancer Medicine* (BC Decker Inc, London, 2006).
17. Morris, D.S., Tomlins, S.A., Montie, J.E. & Chinnaiyan, A.M. The discovery and application of gene fusions in prostate cancer. *British Journal of Urology International* **102**, 276-282 (2008).
18. Krebs, L.J. & Arnold, A. Molecular Basis of Hyperparathyroidism and Potential Targets for Drugs Development. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine and Metabolic Disorders* **2**, 167-179 (2002).
19. Dong Wook Kim, *et al.* RET/PTC (rearranged in transformation/papillary thyroid carcinomas) tyrosine kinase phosphorylates and activates phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1): an alternative phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway to activate PDK1. *Molecular Endocrinology* **17**, 1382-1394 (2003).
20. Knudson, J.A.G. Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **68**, 820-823 (1971).
21. Yang, Y. & Hua, X. In search of tumor suppressing function of menin. Review. *Molecular and Cellular Endocrinology* **265**, 34-41 (2007).
22. Papadopoulos N, *et al.* Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* **263**, 1625-1629 (1994).
23. Westin, G., Björklund, P. & Akeström, G. Molecular Genetics of Parathyroid Disease *World Journal of Surgery* **33**, 2224-2233 (2009).

24. DeLellis, R.A., Mazzaglia, P. & Mangray, S. Primary Hyperparathyroidism. A current Perspective. *Arch Pathol Lab Med* **132**, 1251-1261 (2008).
25. Natalia S. Pellegata, *et al.* Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **13**, 15558-15563 (2006).
26. Igreja S, C.H., Akker SA, Gueorguiev M, Popovic V, Damjanovic S, Burman P, Wass JA, Quinton R, Grossman AB, Korbonits M. 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. *Clinical Endocrinology* **70**, 259-264 (2009).
27. Lemmens I, M.J., Van de Ven WJ, Kas K, Zhang CX, Giraud S, Wautot V, Buisson N, De Witte K, Salandre J, Lenoir G, Calender A, Parente F, Quincey D, Courseaux A, Carle GF, Gaudray P, De Wit MJ, Lips CJ, Höppener JW, Khodaei S, Grant AL, Weber G, Kytölä S, Thakker RV, *et al.* Construction of a 1.2-Mb sequence-ready contig of chromosome 11q13 encompassing the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. *Human Molecular Genetics* **6**, 1177-1183 (1997).
28. Heppner C, K.M., Agarwal SK, Debelenko LV, Emmert-Buck MR, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Skarulis MC, Doppman JL, Alexander RH, Kim YS, Saggat SK, Lubensky IA, Zhuang Z, Liotta LA, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ. Somatic mutations of the MEN1 gene in parathyroid tumors. *Nature Genetics* **16**, 375-378 (1997).
29. Lemos, M.C. & Thakker, V. Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1): Analysis of 1336 Mutations Reported in the First Decade Following Identification of the Gene. *Human Mutations* **29**, 22-32 (2008).
30. Waldmann J, F.V., Habbe N, Bartsch DK, Slater EP, Kann PH, Rothmund M, Langer P. Screening of patients with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1): a critical analysis of its value. *World Journal of Surgery* **33**, 1208-1218 (2009).
31. Tsukada T, N.Y., Ohkura N. MEN1 gene and its mutations: Basic and clinical implications. *Cancer Science* **100**, 209-215 (2008).
32. Chung, D.C. Cyclin D1 in human neuroendocrine: tumorigenesis. *Annals of the New York Academy of Science* **1014**, 209-217 (2004).
33. Donnellan, R. & Chetty, R. Cyclin D1 and human neoplasia. *Molecular Pathology* **51**, 1-7 (1998).
34. Arnold A, K.H., Gaz RD, Eddy RL, Fukushima Y, Byers MG, Shows TB, Kronenberg HM. Molecular cloning and chromosomal mapping of DNA rearranged with the parathyroid hormone gene in a parathyroid adenoma. *The Journal of Clinical Investigation* **83**, 2034-2040 (1989).
35. Hsi ED, Z.L., Yang WI, Arnold A. Cyclin D1/PRAD1 expression in parathyroid adenomas: an immunohistochemical study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81**, 1736-1739 (1996).
36. Mallya SM, G.J., Wild YK, Kifor O, Costa-Guda J, Saucier K, Brown EM, Arnold A. Abnormal parathyroid cell proliferation precedes biochemical abnormalities in a mouse model of primary hyperparathyroidism. *Molecular Endocrinology* **19**, 2603-2609 (2005).
37. K., S., *et al.* Molecular analysis of bcl-1/IgH junctional sequences in mantle cell lymphoma : potential mechanism of the t(11;14) chromosomal translocation. *British journal of haematology* **105**, 190-197 (1999).
38. Roman, K., *et al.* Mantle cell lymphoma: improved diagnostics using a combined approach of immunohistochemistry and identification of t(11;14)(q13;q32) by polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization. *Virchows Archiv* **442**, 538-547 (2003).

39. Besson A, H.H., Cicero S, Donovan SL, Gurian-West M, Johnson D, Clurman BE, Dyer MA, Roberts JM. Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes and Development* **21**, 1731-1746 (2007).
40. Li G, S.E., Wang LE, Chamberlain RM, Spitz MR, El-Naggar AK, Hong WK, Wei Q. Association between the V109G polymorphism of the p27 gene and the risk and progression of oral squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* **10**, 3996-4002 (2004).
41. Philipp-Staheli J, P.S., Kemp CJ. p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Experimental Cell Research* **264**, 148-168 (2001).
42. Marcocci C, C.F., Rubin MR, Silverberg SJ, Pinchera A, Bilezikian JP. Parathyroid carcinoma. *Journal of Bone and Mineral Research* **23**, 1869-1879 (2008).
43. Kukora, J.S. & Zeiger, M.A. The American Association of Clinical Endocrinologists and the American Association of Endocrine Surgeons Positions Statement on the Diagnosis and Management of Primary Hyperparathyroidism. . *Endocr Pract* **11**, 49-54 (2005).
44. Carlier T, O.A., Mirallié E, Seret A, Daumy I, Leux C, Bodet-Milin C, Kraeber-Bodéré F, Ansquer C. 99mTc-MIBI pinhole SPECT in primary hyperparathyroidism: comparison with conventional SPECT, planar scintigraphy and ultrasonography. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **35**, 637-643 (2008).
45. Miller SA, D.D., Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* **16**, 1215 (1998).
46. Mullis K, F.F., Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Cold Spring Harbor Symposia in Quantitative Biology* **51**, 263-273 (1986).
47. Orita M, I.H., Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **86**, 2766-2770 (1989).
48. Sanger F, N.S., Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467 (1977).
49. Schouten JP, M.C., Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research* **30**, 57-70 (2002).
50. Key, M. *Immunohistochemical Staining Methods* (DAKO, California, 2006).
51. Shi SR, L.C., Balgley BM, Lee C, Taylor CR. Protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections: quality evaluation by mass spectrometry. *The Journal of histochemistry and cytochemistry* **54**, 739-743 (2006).
52. Bradd, S.J. & Dunn, M. *Analysis of Membrane Proteins by Western blotting and Enhanced Chemiluminescence.*, (Human Press, 1993).
53. Teh BT, K.S., Farnebo F, Bergman L, Wong FK, Weber G, Hayward N, Larsson C, Skogseid B, Beckers A, Phelan C, Edwards M, Epstein M, Alford F, Hurley D, Grimmond S, Silins G, Walters M, Stewart C, Cardinal J, Khodaei S, Parente F, Tranebjaerg L, Jorde R, Salmela P, et al. Mutation analysis of the MEN1 gene in multiple endocrine neoplasia type 1, familial acromegaly and familial isolated hyperparathyroidism. *The Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83**, 2621-2626 (1998).
54. Pannett AA, T.R. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocrine Related CANcer* **6**, 449-473 (1999).
55. Guo SS, S.M. Molecular and genetic mechanisms of tumorigenesis in multiple endocrine neoplasia type-1. *Molecular Endocrinology* **15**, 1653-1664 (2001).

56. Cavaco BM, D.R., Bacelar MC, Cardoso H, Barros L, Gomes L, Ruas MM, Agapito A, Garrão A, Pannett AA, Silva JL, Sobrinho LG, Thakker RV, Leite V. Mutational analysis of Portuguese families with multiple endocrine neoplasia type 1 reveals large germline deletions. *Clinical Endocrinology* **56**, 465-473 (2002).
57. Asgharian B, T.M., Gibril F, Entsuah LK, Serrano J, Jensen RT. Cutaneous tumors in patients with multiple endocrine neoplasm type 1 (MEN1) and gastrinomas: prospective study of frequency and development of criteria with high sensitivity and specificity for MEN1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**, 5328-5336 (2004).
58. Namihira H, S.M., Miyauchi A, Ohye H, Matsubara S, Bhuiyan MM, Murao K, Ameno S, Ameno K, Ijiri I, Takahara J. Different phenotypes of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) in monozygotic twins found in a Japanese MEN1 family with MEN1 gene mutation. *Endocrine Journal* **47**, 37-43 (2000).
59. Teh BT, Z.J., Kytölä S, Skogseid B, Trotter J, Choplin H, Twigg S, Farnebo F, Giraud S, Cameron D, Robinson B, Calender A, Larsson C, Salmela P. Thymic carcinoids in multiple endocrine neoplasia type 1. *Annals of Surgery* **228**, 99-105 (1998).
60. Correa P, L.E., Rastad J, Åkerström G, Westin G, Carling T. Multiple endocrine neoplasia type 1 polymorphism D418D is associated with sporadic primary hyperparathyroidism. *Surgery* **132**, 450-455 (2002).
61. Peppas M, B.E., Kamakari S, Pikounis V, Peros G, Koutsodontis G, Metaxa-Mariatou V, Economopoulos T, Raptis SA, Hadjidakis D. Novel germline mutations of the MEN1 gene in Greek families with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clinical Endocrinology* **70**, 75-81 (2009).
62. Spiegel, A. Focus on hereditary endocrine neoplasia. *Cancer Cell* **6**, 327-332 (2004).
63. Toledo SP, d.S.M., Toledo Rde A, Lourenço DM Jr. Impact of RET proto-oncogene analysis on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics* **61**, 59-70 (2006).
64. Raue F, F.-R.K. Multiple endocrine neoplasia type 2: 2007 update. *Hormone Research* **68**, 101-104 (2007).
65. Kouvaraki MA, S.S., Perrier ND, Cote GJ, Gagel RF, Hoff AO, Sherman SI, Lee JE, Evans DB. RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid* **15**, 531-544 (2005).
66. Schuffenecker I, V.-M.M., Brohet R, Goldgar D, Conte-Devolx B, Leclerc L, Chabre O, Boneu A, Caron J, Houdent C, Modigliani E, Rohmer V, Schlumberger M, Eng C, Guillausseau PJ, Lenoir GM. Risk and penetrance of primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 2A families with mutations at codon 634 of the RET proto-oncogene. Groupe D'etude des Tumeurs à Calcitonine. *The Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83**, 487-491 (1998).
67. Elisei R, C.B., Romei C, Bottici V, Sculli M, Lari R, Barale R, Pacini F, Pinchera A. RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *The Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**, 3579-3584 (2004).
68. Santoro M, C.F., Melillo RM, Fusco A. Dysfunction of the RET receptor in human cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 2954-2964 (2004).
69. Baumgartner-Parzer SM, L.R., Wagner L, Heinze G, Niederle B, Kaserer K, Waldhäusl W, Vierhapper H. Polymorphisms in exon 13 and intron 14 of the RET protooncogene: genetic modifiers of medullary thyroid carcinoma? *The Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90**, 6232-6236 (2005).
70. Wiench M, W.Z., Gubala E, Wloch J, Lisowska K, Krassowski J, Sciegłinska D, Fiszer-Kierzkowska A, Lange D, Kula D, Zeman M, Roskosz J, Kukulska A, Krawczyk Z, Jarzab B.

- Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *Journal of Clinical Oncology* **19**, 1374-1380 (2001).
71. Rocha AP, M.P., Maia AL, Maciel LM. Genetic polymorphisms: implications in the pathogenesis of medullary thyroid carcinoma. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* **51**, 723-730 (2007).
72. Gimm O, N.D., Marsh DJ, Dahia PL, Hoang-Vu C, Raue F, Hinze R, Dralle H, Eng C. Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. *Oncogene* **18**, 1369-1373 (1999).
73. Ruiz A, A.G., Fernández RM, Eng C, Marcos I, Borrego S. Germline sequence variant S836S in the RET proto-oncogene is associated with low level predisposition to sporadic medullary thyroid carcinoma in the Spanish population. *Clinical Endocrinology* **55**, 399-402 (2001).
74. Georgitsi M, R.A., Karhu A, van der Luit RB, Aalfs CM, Sane T, Vierimaa O, Mäkinen MJ, Tuppurainen K, Paschke R, Gimm O, Koch CA, Gündogdu S, Lucassen A, Tischkowitz M, Izatt L, Aylwin S, Bano G, Hodgson S, De Menis E, Launonen V, Vahteristo P, Aaltonen LA. Germline CDKN1B/p27Kip1 mutation in multiple endocrine neoplasia. *The Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **92**, 3321-3325 (2007).
75. Kibel AS, S.B., Belani J, Oh J, Webster R, Brophy-Ebbers M, Guo C, Catalona WJ, Picus J, Goodfellow PJ. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Research* **63**, 2033-2036 (2003).
76. Cavé H, M.E., Devaux I, Grandchamp B. Identification of a polymorphism in the coding region of the p27Kip1 gene. *Annales de Génétique* **38**, 108 (1995).
77. Caballero OL, R.V., Patturajan M, Meerzaman D, Guo MZ, Engles J, Yochem R, Ratovitski E, Sidransky D, Jen J. Interaction and colocalization of PGP9.5 with JAB1 and p27(Kip1). *Oncogene* **21**, 3003-3010 (2002).
78. La P, D.A., Hou Z, Silva AC, Schnepf RW, Hua X. Tumor suppressor menin: the essential role of nuclear localization signal domains in coordinating gene expression. *Oncogene* **25**, 3537-3546 (2006).
79. Cavallari I, S.-B.M., Rende F, Martines A, Fogar P, Basso D, Vella MD, Pedrazzoli S, Herman JG, Chieco-Bianchi L, Esposito G, Ciminale V, D'Agostino DM. Decreased expression and promoter methylation of the menin tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* **133**, 350-364 (2009).
80. Uchino S, N.S., Sato M, Yamashita H, Yamashita H, Watanabe S, Murakami T, Toda M, Ohshima A, Futata T, Mizukoshi T, Koike E, Takatsu K, Terao K, Wakiya S, Nagatomo M, Adachi M. Screening of the Men1 gene and discovery of germ-line and somatic mutations in apparently sporadic parathyroid tumors. *Cancer Research* **60**, 5553-5557 (2000).
81. Farnebo F, T.B., Kytölä S, Svensson A, Phelan C, Sandelin K, Thompson NW, Höög A, Weber G, Farnebo LO, Larsson C. Alterations of the MEN1 gene in sporadic parathyroid tumors. *The Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83**, 2627-2630 (1998).
82. Hsi ED, Z.L., Yang WI, Arnold A. Cyclin D1/PRAD1 expression in parathyroid adenomas: an immunohistochemical study. *The Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81**, 1736-1739 (1996).
83. Quon H, L.F., Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head and Neck* **23**, 147-159 (2001).
84. Theillaumas A, B.M., Couderc C, Poncet G, Bazzi W, Bernard C, Cordier-Bussat M, Scoazec JY, Roche C. Relation between menin expression and NF-kappaB activity in an intestinal cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology* **291**, 109-115 (2008).
85. Hosokawa Y, T.T., Tahara H, Smith AP, Arnold A. Absence of cyclin D1/PRAD1 point mutations in human breast cancers and parathyroid adenomas and identification of a new cyclin D1 gene polymorphism. *Cancer Letters* **93**, 165-170 (1995).

86. Vasef MA, B.R., Sturm M, Bromley C, Robinson RA. Expression of cyclin D1 in parathyroid carcinomas, adenomas, and hyperplasias: a paraffin immunohistochemical study. *Modern Pathology* **12**, 412-416 (1999).
87. Imanishi Y, H.Y., Yoshimoto K, Schipani E, Mallya S, Papanikolaou A, Kifor O, Tokura T, Sablosky M, Ledgard F, Gronowicz G, Wang TC, Schmidt EV, Hall C, Brown EM, Bronson R, Arnold A. Primary hyperparathyroidism caused by parathyroid-targeted overexpression of cyclin D1 in transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation* **107**, 1093-1102 (2001).
88. Kim JK, D.J. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *Journal of Cellular Physiology* **220**, 292-296 (2009).
89. Sathyan KM, N.K., Abraham T, Kannan S. CCND1 polymorphisms (A870G and C1722G) modulate its protein expression and survival in oral carcinoma. *Oral Oncology* **44**, 689-697 (2008).
90. Quintanilla-Martinez L, D.-H.T., Fend F, Calzada-Wack J, Sorbara L, Campo E, Jaffe ES, Raffeld M. Sequestration of p27Kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphoma (MCL): implications for pathogenesis. *Blood* **101**, 3181-3187 (2003).
91. Catzavelos C, B.N., Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nature Medicine* **3**, 227-230 (1997).
92. Loda M, C.B., Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Medicine* **3**, 231-234 (1997).
93. John P. Bilezikian, R.M., Michael A. Levine. *The Parathyroids: Basic and Clinical Concepts.*, (Academic Press, California, 2001).
94. Lim TH, T.S., Lim P, Lim AS. The incidence and patterns of BCR/ABL rearrangements in chronic myeloid leukaemia (CML) using fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Ann Acad Med Singapore* **34**, 533-538 (2005).

ANEXOS

Anexo I

CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____, consinto que os meus dados clínicos sejam consultados e utilizados na investigação que me foi explicado(a) sobre hiperparatireoidismo primário, bem como o seu uso em publicações científicas desde que respeitando o meu anonimato.

Também consinto que me seja colhido sangue para investigação molecular nesta área, pelo que qualquer alteração detectada durante o seu estudo me será comunicada pelos responsáveis do mesmo.

Matosinhos, ____ de _____ de _____

Imagem 1: Imagem ilustrativa do Consentimento Informado.

Anexo II

Tabela 1: Descrição dos pares de *primers* usados para a amplificação das regiões alvo do gene *RET*.

Exão	Temperatura de emparelhamento (°C)	Tamanho do produto de PCR (bp)	Sequência dos primers (5'→3')
10	65°C	165	F: AGGCTGAGTGGGCTACGTCT R: GTTGAGACCTCTGTGGGGCT
11	65°C	273	F: TGGCGGTGCCAAGCCTCACA R: AGGGCAGGGGATCTTCCCTG
13	65°C	118	F: TTTGCAACCTGCTCTGTGCT R: TCACCCTGCAGCTGGCCTTA
14	65°C	258	F: TGGAAGACCCAAGCTGCCTGA R: TGGCTGGGTGCAGACCCATAT
15	65°C	168	F: ATGGCCTGACGACTCGTGCT R: ATGGTGCACCTGGATCCCT
16	60°C	155	F: AGGGATAGGGCCTGGCCTT R: TAACCTCCACCCCAAGAG

Tabela 2: Descrição dos pares de *primers* usados para a amplificação das regiões alvo de gene *CDKN1B*.

Exão	Temperatura de emparelhamento (°C)	Tamanho do produto PCR (bp)	Sequência de primers(5'→3')
1	62°C	515	F: TTGTTTTTTTGAGAGTGCAGAGAGA R: ACATTCTATGTTTGGGAAAGGGT
2	62°C	223	F: AACTTCTGCCAGCCATTGTTTTTT R: AGTAAGATCAGGTATCGTGAGGT

Tabela 3: Descrição dos pares de *primers* usados para a amplificação das regiões alvo do gene *MEN1*

Exão	Temperatura de emparelhamento (°C)	Tamanho do produto PCR (bp)	Sequência dos primers (5'→3')
2.1	60°C	223	F: GGGCGGGTGGAACCTTAG R: AAGGAAAGGAGCACCAGGTC
2.2	60°C	182	F: CCCAGAAGACGCTGTTC R: GCTGGGCTGGAAGGTGAG
2.3	60°C	196	F: GTGGAGCATTTTCTGGCTGT R: CTCGAGGATAGAGGGACAGG
2.4	60°C	226	F: TGGCCGACCTGTCTATCATC R: CCACCTACTGGGCTCCAAC

Hiperparatireoidismo Primário: Caracterização Molecular e Biomarcadores

3.1	60°C	167	F: CCTTTCCCATGTTAAAGCA R: ACACTACCCAGGCATGATCC
3.2	60°C	191	F: GTCTCCGGGATGTCCACCT R: TACAGTATGAAGGGGACAAGG
4.1	60°C	152	F: ATTCCCTGAAGCAGGCACAG R: GTCAATGGAAGGGTTGATGG
4.2	60°C	159	F: ATCATACATGCGCTGTGACC R: CAAGTCAAGTCTGGCCTAGC
5	60°C	102	F: CCTGTTCCGTGGCTCATAAC R: CTGGCCACTTCCCTCTACTG
6	60°C	167	F: GGTGGCAGCCTGAATTATGA R: CAGCCACTGTTAGGGTCTCC
7.1	60°C	116	F: AGGATCCTCTGCCTCACCTC R: ACATTGCGGTTGCGACAGT
7.2	60°C	151	F: ACATTGCGGTTGCGACAGT R: ACAGGCTGCAGGCCCTAGTA
8.1	60°C	192	F: GATGGTGAGACCCCTTCAGA R: CCTTTCACCTGGCTTTGCT
8.2	55°C	156	F: GACGAGGAGATCTACAAGGAGTT R: GTGGGAGGCTGGACACAG
9.1	60°C	155	F: CCCTCTGCTAAGGGGTGAGT R: GACTGCCCTCCTCCCATT
9.2	60°C	157	F: ACCTGCTGCGATTCTACGAC R: ACCACCTGTAGTGCCCAGAC
10.1	55°C	158	F: CTTTGCTCTCACCTTGCTCT R: GCTCCTCTGGCTTGGACTC
10.2	55°C	178	F: CGCATAGTGAGCCGAGAGG R: GGGGTCCTGACACTGCAC
10.3	60°C	177	F: AGAAGCCAGCACTGGACAAG R: TCTGGAAAGTGAGCACTGGA
10.4	60°C	150	F: CAGCACCCACAGCATCAC R: TCATCTGCACTTGCGACTGT
10.5	55°C	158	F: GTGGCCACCAAGATCAACTC R: GGTCCGAAGTCCCCAGTAGT

Tabela 4: Condições de SSCP usadas no estudo dos genes *RET* e *MEN1*.

Concentração do gel de MDE (%(v/v))	Temperatura de corrida	Gene <i>RET</i> (exões)	Gene <i>MEN1</i> (exões)
0,8%	20°C	10 13 14	2.1 – 10.5
	8°C	-	
0,6%	20°C	15 16	
	8°C	11	

Tabela 5: Listagem dos anticorpos usados em imunohistoquímica

Anticorpo	Diluição	Tempo de incubação
Anti-Ciclina D1 (Neomarkers (SP4))	1:100	30 minutos
Anti-p27 (Santa Cruz)	1:250	O.N.

Tabela 6: Listagem de anticorpos primários usados em *Western blot*.

Anticorpo primário	Diluição	Período de incubação	Hospedeiro	Peso molecular (kDa)
Anti - Ciclina D1 (Neomarkers (SP4))	1:500	O. N.	Coelho	34
Anti-Actina (Santa Cruz)	1:2000	1 hora	Cabra	44

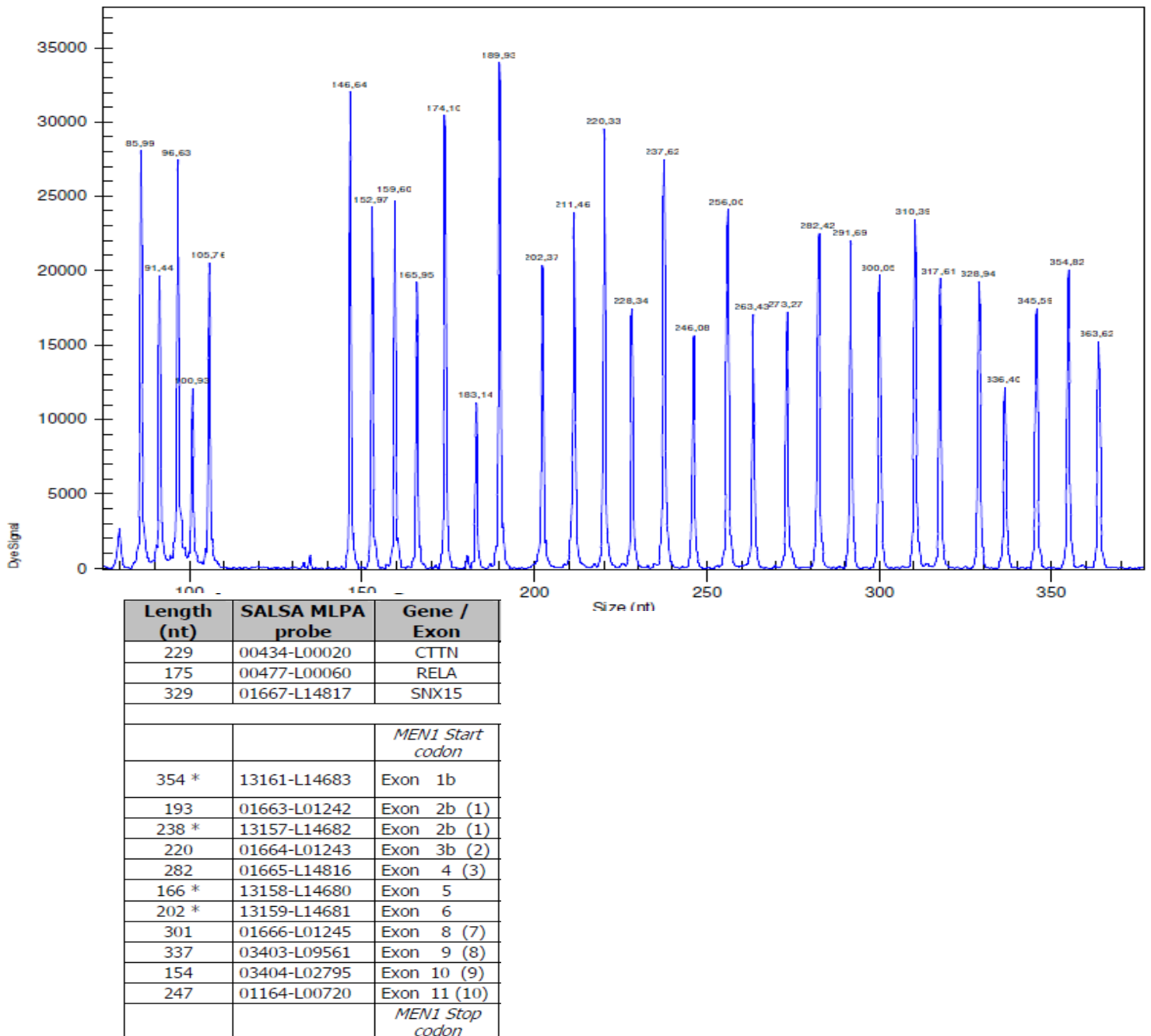


Imagem 2: Estas imagens ilustram o exemplo de uma electroforese capilar de uma amostra de DNA controlo analisada com o kit SALSA MLPA P017-B1 MEN1 lot 0109, e a respectiva tabela que indica a correspondência entre os tamanhos (nt) e os respectivos exões (adaptado de <http://www.mrc-holland.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDF\E\t9bmuxqlhe/Lgqfk8Hkjuss|&ProductOID=2ECCR/VCBSs|>)