Betsaida Urtremari

Padronização e aplicação de painel baseado em sequenciamento paralelo em larga escala direcionado ao diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título
de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientador: Dr. Delmar Muniz Lourenço Junior

São Paulo
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Urtremari, Betsaida

Padronização e aplicação de painel baseado em sequenciamento paralelo em larga escala direcionado ao diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1 / Betsaida Urtremari. -- São Paulo, 2019.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientador: Delmar Muniz Lourenço Junior.

Descritores: 1.Endocrinologia 2.Genética
3.Sequenciamento paralelo em larga escala 4.Doenças genéticas 5.Neoplasia endócrina múltipla tipo 1
6.Biologia molecular

USP/FM/DBD-310/19

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo cuidado constante, vivenciado em cada momento até aqui, e sem o qual nada disso seria possível, a Ele toda honra.

À minha mãe, pelo apoio e amor incondicional, pela dedicação, exemplo, carinho e paciência.

Ao meu irmão por toda uma vida compartilhada, pelas risadas, por ser meu melhor amigo, por toda proteção e amor comigo.

Aos meus familiares pelo amor e cuidado por mim.

Aos amigos que tornam meus dias mais leves.

Ao meu orientador Dr. Delmar Muniz Lourenço Jr, por ser um exemplo de generosidade, profissionalismo e amor por vidas que tanto me ensinou e inspirou.

EPÍGRAFE

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin”

AGRADECIMENTOS

Agradeço em Primeiro Lugar a Deus , que me deu a vida e com sua infinita misericórdia e amor me ajudou a chegar até aqui.

Conforme vivemos vamos agregando experiências, bagagens, pessoas... algumas sem muita importância, outras especiais. Assim defino o grupo de profissionais da Unidade de Endocrinologia, que transformaram-se em grandes amigos. Gostaria de agradecer cada um pelos momentos divididos que jamais serão esquecidos. E a cada um por se importar comigo e compartilhar a vida no dia a dia

À minha mãe, Sirley de Moraes Pereira , que por muitas vezes foi pai e mãe. Ouviu meus desabafos com paciência, aprendeu a me entender pelo olhar. Foi meu ombro em momentos difíceis e a maior incentivadora dos meus sonhos. Riu comigo, chorou comigo, puxou minha orelha quando necessário. A ela toda minha admiração e amor.

Ao meu irmão Filipe, Urtremari por ser meu melhor amigo e me amar incondicionalmente ,e que por mais que ele seja razão enquanto eu coração, sempre teve a paciência necessária pra me ajudar a não pirar nas hora mais difíceis. Por todas as risadas que me arrancou, por todo o carinho com que sempre me tratou.

A minha família, que por mais maluca que seja sempre foi unida e amorosa. Obrigada por serem meu esteio.

À minha prima Elisangela Quedas, que não só me ama como mãe, mas talvez seja a pessoa que mais convivi nesses últimos anos. Obrigada pelas risadas, pelas comidas (sim ela cozinha demais) e pelas broncas. Desculpa por te enlouquecer em alguns momentos, esteja certa de que eu amo você.

. Ao Dr. Delmar Muniz Lourenço Jr, meu carinho,minha gratidão, admiração e respeito pela oportunidade da orientação e de desenvolver este trabalho. Muito obrigada pelo privilégio de ser sua orientanda, e por toda a paciência que teve comigo ao longo desses anos.

Ao Dr Alexander A. de Lima Jorge, por ter me recebido no Lim 25, que tem sido uma extensão da minha própria casa, e estar sempre disposto a ajudar.

Aos profissionais do Hospital das clínicas- Faculdade de medicina da USP, em especial aos funcionários em especial a Eliete Helena, Geni Rodrigues, Graça Cavalcanti e Valdirene, através de seu convívio agradável, permitindo a conclusão deste trabalho da forma mais tranquila possível.

Aos amigos Michelle Buscarilli e Lucas Santana, por todo apoio, alegria e convívio agradável e pela amizade que levarei comigo. Por todos os almoços divertidos ou tensos, dos quais eu nunca esquecerei. À Michele por ser meu oposto, portanto equilíbrio em muitos momentos. Ao Lucas por ser uma versão de mim em tantos outros e por me compreender como ninguém. A vocês minha mais profunda gratidão e sincera amizade.

Aos aprimorandos Flávio e Paloma por torcerem sempre por mim e me ajudarem em tudo que foi possível. Ao aluno Miguel Arcanjo, pela mesma razão.

Ao amigo, Rafael Arrabaça de Carvalho, por todo conhecimento compartilhado, por toda ajuda sempre muito bem vinda, ainda que por vezes de longe, obrigada.

À Cida, secretária da Pós graduação, que por vezes salvou minha vida.

A todos os pacientes e familiares pela sua compreensão, por acreditar em nosso trabalho em prol da evolução científica, sobrepondo suas aflições tornando assim, este estudo possível.

À FAPESP, pelo apoio financeiro e científico.

A todos os amigos, que compreenderam bastantes vezes minhas ausências, obrigada pelo incentivo, carinho, amizade verdadeira, vocês fazem parte da concretização deste trabalho.

A todos, de forma geral, os meus imensos e infindáveis agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO

1 Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1.....	15
1.1 Aspectos Clínicos.....	15
1.2 Aspectos Moleculares	18
1.3 Rastreamento gênico e clínico	22
2 Sequenciamento Sanger e Paralelo em Larga escala.....	23
3 Revisão Circunstanciada.....	24
5 Objetivos.....	32
6 Materiais e Métodos.....	33
6.1 Extração de DNA.....	33
6.2 Amplificação para Sequenciamento Sanger.....	34
6.3 Amplificação para Sequenciamento Paralelo em Larga escala.....	34
6.4 Sequenciamento de Paralelo em Larga escala.....	35
6.5 Bioinformática.....	37
6.6 Sequenciamento automático tradicional (Sanger).....	39
6.7 Multiplex ligation-dependent probe Amplification (MLPA).....	40
7 Resultados	41
8- Discussão	51
9- Considerações finais.....	55

REFERÊNCIAS

ANEXOS

Lista de Figuras

Figura 1: Mecanismo normal de Ação da MENIN, em comparação com o que acontece em Indivíduos com MEN1 (extraído de Agarwal, 2012)	19
Figura 2: Mecanismo de tumorigênese em MEN1 (extraído de Marx, 98).....	20
Figura 3: Interação de p27e MENIN.....	21
Figura 4: Genes recentemente associados a MEN1(p15, p18 e p21)e sua interação no controle da proliferação celular.....	22
Figura 5: Confirmação da Variante em Frameshift (IGV) c.1546_1547insC (R516Pfs) no gene <i>MEN1</i> em paciente com apresentação clínica típica de MEN1.....	43
Figura 6: Confirmação da Variante em Frameshift (método de Sanger) c.1546_1547insC; R516Pfs no gene <i>MEN1</i> em paciente com apresentação clínica típica de MEN1.....	44
Figura 7. Confirmação da variante “ <i>missense</i> ” c.203C>T (p.A68V) identificada no IGV após sequenciamento.....	45
Figura 8. Confirmação da variante “ <i>missense</i> ” c.203C>T (p.A68V) (método de Sanger)	46
Figura 9. Foto de gel de agarose, evidenciando a amplificação de amostras do gene <i>AIP</i>	47
Figura 10. Foto de gel de agarose, evidenciando a amplificação de amostras dos genes <i>MEN1</i> , <i>CDKN2B/p15</i> , <i>CDKN2C/p18</i> <i>CDKN1A/p21</i> , <i>CDKN1B/p27</i>	47
.	
Figura 11: Exemplo de paciente com resultado MLPA negativo.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1. Critérios estabelecidos pelo último Consenso Internacional de MEN1(2012) para indicação de análise genética (gene <i>MEN1</i> e genes relacionados).	26
Tabela 2: Primers desenhados para PCR Long Range.....	34
Tabela3: Protocolo para PCR Long Range(kit Fermentas)	35
Tabela 4: Protocolo para PCR Long Range kiT GOtaq Long PCR (Promega).....	36
Tabela 5. Análise de qualidade da corrida (<i>MEN1</i> , <i>CDKN2B/p15</i> , <i>CDKN1B/p27</i>).....	42
Tabela 6. Variantes Identificadas durante a primeira corrida.....	43
Tabela 7: Análise de qualidade da corrida 2 (<i>MEN1</i> , <i>CDKN2B/p15</i> , <i>CDKN2C/P18</i> ; <i>CDKN1A/P21</i> , <i>CDKN1B/p27e AIP</i>).....	48
Tabela 8: Análise de qualidade da corrida 2 (<i>MEN1</i> , <i>CDKN2B/p15</i> , <i>CDKN2C/P18</i> ; <i>CDKN1A/P21</i> , <i>CDKN1B/p27e AIP</i>).	48

Lista de Quadros

Quadro 1. Prevalência dos tumores endócrinos e não-endócrinos relacionados à MEN1.....	15
---	----

Resumo

Urtremari B. *Padronização e aplicação de painel baseado em sequenciamento paralelo em larga escala direcionado ao diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1* [dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (MEN1) é uma doença genética, de herança autossômica dominante, caracterizada pelo desenvolvimento de tumores endócrinos que acometem, principalmente, hipófise, paratireoide e pâncreas/duodeno endócrinos. Entretanto, tumores acometendo outras glândulas endócrinas bem como vários outros tecidos não endócrinos têm sido reportados incluindo tumores nas adrenais, em pulmão, timo, entre outros. MEN1 é causada, principalmente, por mutação germinativa no gene *MEN1* (11q13). Subsequentemente, outros genes (*CDKN2B/p15*, *CDKN2C/p18*, *CDKN1A/p21*, *CDKN1B/p27* e *AIP*) foram relacionados à síndrome MEN1 por fenótipos condizentes com MEN1. Consensos internacionais tem sistematicamente sugerido a análise do gene *MEN1* e, mais recentemente, dos genes relacionados a MEN1, em um número crescente de fenótipos que não encontram os critérios clínicos de diagnóstico de MEN1, mas que são suspeitos para esta síndrome. Alguns exemplos destas condições são: hiperparatireoidismo primário (HPT) por adenoma diagnosticado em idade jovem (< 30 anos) ou por hiperplasia independente de idade, HPT recorrente, gastrinomas, tumores endócrinos multifocais do pâncreas, apresentações atípicas de MEN1, entre outras. Entretanto, não se tem observado sistematicamente, na prática clínica, a realização de análise genética destes diversos grupos de pacientes com graus variáveis de risco potencial de MEN1. De fato, análise de mutação germinativa tem sido dirigida, principalmente, para pacientes com diagnóstico clínico de MEN1 familiar clássica. Isto se deve, em parte, pelo desconhecimento de clínicos sobre a indicação de análise genética destes subgrupos de pacientes, pelas limitações (necessidade de sequenciamento de múltiplos genes e ausência de “hot spots” mutacionais) e elevada custo-efetividade do Sequenciamento Sanger (SS) para suportar o diagnóstico genético de MEN1 para todas estas condições na prática clínica. Assim, neste estudo, nós pretendemos incorporar à prática médica um painel genético baseado em sequenciamento paralelo em larga escala que vem sendo validado em nosso Serviço. A padronização de análise por NGS direcionada ao gene *MEN1* resultou em elevada acurácia na detecção de mutações e em melhor custo-efetividade com capacidade potencial para substituir o SS. Os objetivos do presente estudo são: 1) padronizar técnica de sequenciamento gênico capaz de proporcionar a análise genética completa e integrada de todos os genes relacionados a MEN1 conhecidos (genes *MEN1*, *CDKN2B/p15*, *CDKN2C/p18*, *CDKN1A/p21*, *CDKN1B/p27*, *Kip1* e *AIP*) permitindo tanto a avaliação de casos com MEN1 familiar como de todos os casos com MEN1 ou condições clínicas associadas a MEN1 (MEN1 esporádica, casos atípicos ou suspeitos de MEN1 e indivíduos com tumores MEN1-relacionados aparentemente esporádicos); 2) propiciar, pela avaliação genética completa, o aprimoramento do aconselhamento genético destas diferentes populações. Foram analisados, inicialmente, pelo menos 40 pacientes com fenótipo de MEN1 esporádica ou com suspeita clínica de MEN1; 20 pacientes com tumores neuroendócrinos pancreáticos aparentemente esporádicos e/ou multifocais, 20 pacientes com HPT primário por idade

jovem ou por hiperplasia ou por recorrência.. Em etapa inicial do presente projeto foi necessária a otimização da amplificação de “*long range PCR*” para todos genes MEN1-relacionados com nova enzima em decorrência de descontinuação do uso de enzima anterior que já havia sido otimizada previamente em nosso Serviço. Também, um painel por sequenciamento paralelo em larga escala foi conduzido para análise de 25 pacientes com MEN1 esporádica e variantes patogênicas/potencialmente patogênicas foram identificadas no gene *MEN1* em 2 pacientes. Posteriormente mais 39 pacientes foram submetidos a sequenciamento e nenhuma alteração patogênica foi encontrada.

Descritores: Endocrinologia; Genética; Sequenciamento paralelo em larga escala; Doenças genéticas; Neoplasia endócrina múltipla tipo 1; Biologia molecular

Summary

Urtremari B. *Standardization and application of a panel based on large scale parallel sequencing directed to the genetic diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 1* [dissertation] São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) is a genetic disease of autosomal dominant inheritance, characterized by the development of endocrine tumors that mainly affect pituitary, parathyroid and endocrine pancreas/duodenum. However, tumors affecting other endocrine glands as well as several other non-endocrine tissues have been reported, including tumors in the adrenal, lung, thymus, among others. MEN1 is mainly caused by germline mutation in the *MEN1* gene (11q13). Subsequently, other genes (*CDKN2B*/p15, *CDKN2C*/p18, *CDKN1A* /p21, *CDKN1B*/p27 and *AIP*) were related to MEN1 syndrome by MEN1-like phenotypes. International consensus has systematically suggested the analysis of the *MEN1* gene and, more recently, of the MEN1-related genes to a growing number of phenotypes that do not meet the clinical criteria for diagnosis of MEN1, but which are suspect for this syndrome. Some examples of these conditions are: primary hyperparathyroidism (HPT) for adenoma diagnosed at young age (<30 years) or by age-independent parathyroid hyperplasia, recurrent HPT, gastrinomas, multifocal pancreatic endocrine tumors, atypical MEN1 presentations, among others. However, it has not been systematically observed, in clinical practice, the genetic analysis of these different groups of patients with varying degrees of potential risk of MEN1. In fact, germline mutation analysis has been directed, mainly, to patients with clinical diagnosis of classic familial MEN1. This is due in part to the lack of clinical knowledge about the indication of genetic analysis of these subgroups of patients, limitations (need for sequencing of multiple genes and absence of mutational *hot spots*) and high cost-effectiveness of Sanger Sequencing (SS) to support the genetic diagnosis of MEN1 for all these conditions in clinical practice. Thus, in this study, we intend to incorporate at the medical practice a genetic panel based

large scale parallel sequencing that has been validated in our Service. The standardization

large scale parallel sequencing analysis directed to the *MEN1* gene resulted in high accuracy in the detection of mutations and in better cost-effectiveness with potential capacity to replace the SS. The objectives of the present study are: 1) standardize gene sequencing technique capable of providing complete and integrated genetic analysis of all known MEN1-related genes (*MEN1*, *CDKN2B* / p15, *CDKN2C* / p18, *CDKN1A* / p21, *CDKN1B* / p27Kip1 and *AIP* genes) allowing for the evaluation of both familial MEN1 cases as of all MEN1 cases or MEN1-associated clinical conditions (sporadic MEN1, atypical or suspected MEN1 cases, and individuals with apparently sporadic MEN1-related tumors); 2) provide, through the complete genetic evaluation, the improvement of genetic counseling of these different populations. The achievement of these objectives has the potential to improve and expand the genetic diagnosis of MEN1 in our country, to define better the subgroups of patients that benefit from the genetic panel as well as to improve and modify the clinical management, treatment and genetic counseling of these different subgroups in potential risk for MEN1. At least 40 patients with sporadic MEN1 phenotype or with clinical suspicion of MEN1 will be initially analyzed; 20 patients with apparently

sporadic and/or multifocal pancreatic neuroendocrine tumors, 20 young patients with primary HPT or with parathyroid hyperplasia or recurrent HPT. In the initial stage of the present project, the optimization of the long range PCR amplification for all MEN1-related genes with a new enzyme was necessary due to the discontinuation of production for the enzyme that had been previously optimized in our Service. Also, a panel by NGS was conducted for analysis of 25 patients with sporadic MEN1 and pathogenic/potentially pathogenic variants were identified in the *MEN1* gene in 2 patients. Subsequently 39 more patients underwent sequencing and no pathogenic changes were found.

Descriptors: Endocrinology; Genetics; Large-scale parallel sequencing; Genetic diseases; Multiple endocrine neoplasia type 1; Molecular biology.

Introdução

1.Neoplasia endócrina múltipla Tipo 1

1.1 Aspectos Clínicos

Padrão de herança, variabilidade fenotípica e penetrância

A neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (MEN1) é uma doença genética rara (1:30.000) com padrão de herança autossômica dominante causada, principalmente, por variantes alélicas patogênicas germinativas no gene *MEN1* que predisõem ao desenvolvimento de diversas neoplasias ao longo da vida(1)(2)

MEN1 é considerada uma síndrome genética que apresenta susceptibilidade elevada para o desenvolvimento de mais de 20-30 tipos diferentes de tumores que se originam de diversos tipos de tecidos e órgãos tanto endócrinos como não endócrinos, com comportamento biológico que pode variar de hiperplasia e adenomas até neoplasias malignas tanto bem diferenciadas e de evolução clínica indolente como pouco diferenciadas e de evolução agressiva.(1)(3)

Este cenário revela a acentuada variabilidade fenotípica em MEN1 que, pelas diferentes formas de apresentação clínica, pode dificultar o diagnóstico desta síndrome.

A penetrância da doença nos portadores de variante patogênica é relacionada a idade sendo já elevada ao final da 2ª década de vida quando cerca de 50-60% dos pacientes já se apresenta com pelo menos um dos tumores MEN1-relacionados e é quase completa na faixa etária entre 50 e 60 anos de idade. Embora seja crescente com a idade, a penetrância de cada um dos tumores relacionados à MEN1 é extremamente variável sendo, por exemplo, praticamente completa para tumores de paratireoide, muito elevada para tumores neuroendócrinos pancreáticos não-funcionantes (55-100%) e inferior a 5% para algumas neoplasias muito agressivas como somatostatins, glucagonomas e tumores neuroendócrinos do timo. O **quadro 1** informa a prevalência dos diversos tumores relacionados à MEN1(4)(5)(1)

Quadro 1. Prevalência dos tumores endócrinos e não-endócrinos relacionados à MEN1.

Tumores endócrinos	Tumores não endócrinos
Adenoma de paratireoide (>90-100%)	Lipoma (33%)
Tumores neuroendócrinos pancreático-duodenais (30-80%): <ul style="list-style-type: none">• Gastrinoma (40-75%) *• Pancreáticos não funcionantes *, (55-100%)• Insulinoma (10%)• Outros: Glucagonoma * (<1%), Vipoma * (<1%), Somatostatinoma *, etc (<1%)	Angiofibroma (22-88%) Colagenoma (0-72%)
Tumores carcinóides *: <ul style="list-style-type: none">• Tímico (2%) *• Brônquico (2%) *• Gástrico (10%)	Ependimoma (<1%) Meningeoma (8%)
Tumores da hipófise anterior (15-50%), sendo: <ul style="list-style-type: none">• Prolactinoma (68%)• Co-secretores (9%)• Somatotropinoma (4%)• ACTHoma (4%)• TSHoma (raro)• Não funcionante (14%)	Leiomioma (10%)
Tumores adrenocorticais (20-73%): <ul style="list-style-type: none">• Não funcionantes (>98%)• Funcionantes (<2%): aldosteronoma (<1%), Síndrome de Cushing ACTH-independente (<1%) e carcinoma adrenocortical* (<1%)	
Feocromocitoma (< 1%)	

Baseado em: Brandi (2001), Verges (2002), Marx (2005), Lourenço (2008); Thakker (2012); *, maligno ou potencialmente maligno (>25%).

Diagnóstico

A MEN1 (OMIM #131100) pode ser diagnosticada de acordo com parâmetros clínicos, familiares e genéticos. O diagnóstico clínico de MEN1 é definido quando um paciente se apresenta com tumores em pelo menos duas das três glândulas endócrinas principais relacionadas à doença: paratireoide, hipófise anterior e células endócrinas do pâncreas ou do duodeno

O diagnóstico de MEN1 familiar é estabelecido quando o diagnóstico clínico de MEN1 é confirmado em um paciente (caso-índice) em combinação com o diagnóstico em um parente de primeiro grau que se apresente com pelo menos um dos tumores em um destas três glândulas endócrinas principais. A MEN1 pode ser também de apresentação esporádica quando a história familiar é negativa e não há familiares diagnosticados com a síndrome.

O diagnóstico molecular é estabelecido quando se identifica um indivíduo portador de uma variante alélica patogênica germinativa no gene *MEN1*, independente da clínica apresentada. (5)(1)(6)

Tumores principais relacionados a MEN1

Hiperparatireoidismo primário (HPT)

O HPT é o tumor responsável pela penetrância completa em MEN1 uma vez que se desenvolve em praticamente todos os pacientes. Em geral, se manifesta durante a 2ª e 3ª décadas de vida e, por isso, 20-30 anos mais cedo que a idade geralmente observada com pacientes se apresentando com adenoma de paratireoide esporádico. Pela penetrância completa e início precoce, o HPT é a primeira manifestação clínica em pelo menos 50-75% dos pacientes se configurando na principal porta de entrada para o diagnóstico de MEN1. Entretanto, adenomas de hipófise, insulinomas e gastrinomas podem ser a primeira manifestação clínica em MEN1.

O HPT em MEN1 é resultado de uma hiperplasia assincrônica e assimétrica das glândulas paratireoides que resulta em excesso de paratormônio e, por conseguinte, instalação de hipercalcemia crônica. Muitos pacientes poderão ser assintomáticos por um período prolongado.

Entretanto, complicações de órgãos-alvo como calcinose renal e desmineralização óssea são muito comuns, podem ocorrer precocemente e apresentarem progressão caracterizada, respectivamente, por insuficiência renal e osteoporose acentuada se não tratadas.

É muito importante definir se o HPT é associado ou não a MEN1 uma vez que o manejo clínico e cirúrgico difere daquele definido para HPT esporádico. Assim, a ausência de reconhecimento de MEN1 pode resultar em procedimento cirúrgico inadequado com persistência e/ou recorrência precoce do HPT. (1)(7)(4)

Adenomas de Hipófise

Os adenomas de hipófise apresentam prevalências variáveis em MEN1, sendo que todos os tipos de adenomas já foram descritos associados à síndrome. Dentre eles, os mais frequentes são os secretores de prolactina, os adenomas não secretores e os com secreção combinada de prolactina e hormônio de crescimento. É reconhecido que os adenomas hipofisários em MEN1 geralmente são diagnosticados ao redor dos 30-50 anos de idade como ocorre em relação aos adenomas esporádicos. Por outro lado, há uma maior prevalência de macroadenomas, incluindo adenomas agressivos e refratários ao tratamento medicamentoso, além de maior frequência de adenomas duplos, cosecretores e plurihormonais nos pacientes com MEN1 em comparação aos casos esporádicos. O tratamento de adenomas de hipófise associados a MEN1 não difere, por sua vez, daquele preconizado para adenomas esporádicos(1)(4)(7)

Tumores Neuroendócrinos duodeno-pancreáticos

Há vários tipos de tumores neuroendócrinos gastroenteropancreáticos em MEN1 sendo que os tumores secretores mais prevalentes são os gastrinomas e os insulinomas. Os gastrinomas se manifestam, principalmente, pela ocorrência de úlceras gastroduodenais recorrentes e por diarreia crônica desencadeadas pela hipersecreção ácida gástrica gerada pela produção excessiva de gastrina pelo tumor. Como gastrinomas em MEN1 são frequentemente múltiplos e de localização duodenal, o seu tratamento diverge daquele preconizado para gastrinomas esporádicos que são representados por tumores pancreáticos solitários. Assim, o tratamento em MEN1 é principalmente medicamentoso pelo objetivo de assegurar o controle da secreção ácida gástrica já que há baixas taxas de cura alcançadas com procedimentos cirúrgicos. Por outro lado, a cirurgia é a primeira opção em casos com gastrinoma esporádico. O tratamento cirúrgico de gastrinomas em MEN1 é recomendado quando há falência do tratamento medicamentoso ou quando os tumores são maiores do que 2,5 cm devido ao risco mais elevado de transformação maligna(1)(7)(6)

Ao contrário dos gastrinomas, os insulinomas são tumores pancreáticos predominantemente benignos. O tratamento é cirúrgico uma vez que a hipoglicemia resultante da hipersecreção de insulina pelo tumor é potencialmente ameaçadora à vida.

Os tumores pancreáticos não secretores são os mais prevalentes em MEN1, apresentam elevada malignidade quando são maiores de 2-3 cm e, por isso, são os principais responsáveis pela mortalidade relacionada a MEN1. Pela elevada frequência,

a associação destes tumores com tumores funcionantes é muito comum dificultando a localização, por vezes, do insulinoma. Pela ocorrência frequente de tumores múltiplos, a cirurgia realizada no tratamento tanto de tumores pancreáticos não secretores como de insulinomas é, geralmente, mais extensa que a preconizada para casos com tumores esporádicos. Novamente, peculiaridades do tratamento reforçam a importância de se definir se o tumor a ser tratado é ou não associado a MEN1.(1)(7)

1.2 Aspectos moleculares

O gene *MEN1*, responsável pela maioria dos casos com fenótipo MEN1(95%) é um gene supressor de tumor localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q13). Descoberto por dois grupos de pesquisa independentes em 1997, esse gene possui aproximadamente 9Kb que contém 10 éxons. Os exons 3 ao 9 e parte do exons 2 e 10 codificam a MENIN, uma proteína nuclear de 67 Kd, constituída por 610 aminoácidos (8)(9)

A MENIN é uma proteína adaptadora capaz de interagir com várias outras proteínas e participar ativamente de vários processos celulares como: regulação da transcrição gênica, replicação e reparo do DNA e na transdução da sinalização. Também, interage com vários genes envolvidos em processos como apoptose, proliferação celular, reparo do DNA e com genes relacionados a funções metabólicas e endócrinas. A função normal da MENIN é preservar a diferenciação celular por modificação de proteínas (histonas) e a transcrição de genes responsáveis por inibirem a divisão celular .

Uma vez que essa proteína é defeituosa, há uma perda deste controle com a diminuição da expressão de genes inibidores do ciclo celular, tais como SMAD3, TGFβ, p18, p27, hAsh2, caspase 8 e TNFα. Além disso, há aumento da expressão de genes ativadores do ciclo celular como junD e hTERT, levando a uma predisposição à tumorigênese. Em estudos anteriores foi demonstrado que a MENIN é capaz de interagir com mais de 20 proteínas que participam direta ou indiretamente no controle da divisão celular, evidenciando-se entre os mais conhecidos, o fator de transcrição junD, um conhecido inibidor de crescimento celular, e a proteína Smad 3 que é inibidora da via de sinalização de TGFβ.(FIGURA1)

A presença de variante alélica patogênica germinativa em um dos alelos não é suficiente para o desenvolvimento da doença. É, assim, necessário que ocorra um segundo evento genético, uma alteração somática no alelo normal, para que o processo de tumorigênese seja desencadeado. Por essa razão o padrão de herança é dito como

dominante, mas o mecanismo de tumorigênese é dito como recessivo pela necessidade de ocorrer esta segunda alteração em nível tecidual (4) (**FIGURA 2**)

Mais de 1700 mutações germinativas e somáticas foram identificadas no gene *MEN1* desde sua associação com a doença, evidenciando a ausência de “hot spot” mutacional. A grande maioria das mutações é inativadora (“frameshift” ou “

nonsense”) gerando uma proteína truncada que perde função de controle e regulação do ciclo e da proliferação celular(10) (11). Algumas famílias podem ter deleções grandes no gene *MEN1* (10) que não conseguem ser identificadas pelo sequenciamento Sanger e podem ser evidenciadas através da técnica de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) (12). Em um destes estudos foi estimado que em torno de 1% dos casos com fenótipo MEN1 apresenta deleções grandes no gene *MEN1*. (13).

Figura 1: Mecanismo normal de Ação da MENIN, em comparação com o que acontece em Indivíduos com MEN1

FIGURA 2: Mecanismo de tumorigênese em MEN1.

Em 2006 um novo gene foi associado ao fenótipo MEN1, o gene *CDKN1B/p27Kip1* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1b*). Pellegata et al identificaram uma família com MEN1 apresentando uma variante alélica patogênica germinativa no gene *CDKN1B/p27* (14). Posteriormente, alterações nesse gene foram encontradas em outras famílias com MEN1 (15)(3)(16). A associação do fenótipo MEN1 com variante alélica patogênica germinativa no gene *CDKN1B/p27* foi denominada MEN4. Variantes patogênicas germinativas também foram encontradas nos genes *CDKN1A/p21*, *CDKN2B/p15*, *CDKN2C/p18* em 4 famílias não relacionadas com fenótipo MEN1 ou MEN1-like (3). Entretanto, variantes nestes genes inibidores de CDKs, incluindo *CDKN1B/p27*, explicam não mais do que 3-4% dos casos com o fenótipo MEN1 ou estados MEN1-like (associações de tumores MEN1-relacionados suspeitos para MEN1).

O gene *CDKN1B/p27* está localizado no braço curto do cromossomo 12 (12p13) e codifica uma proteína que está diretamente envolvida na regulação do ciclo celular. Estudos funcionais já demonstraram que a MENIN é capaz de controlar a expressão de *CDKN1B/p27* indicando uma via celular comum para a tumorigênese da (17)

Quando o gene *MEN1* está exercendo sua função normal, a proteína codificada é íntegra e forma um complexo com a metiltransferase (MLL) e RNA polimerase II e regula a

transcrição da proteína *p27* por desmetilação de histonas. (17)(18)Consequentemente a atividade dessa e de outras proteínas (*p15*, *p18*, *p21*) inibem o complexo ciclina/CDKs, impedindo a fosforilação de uma outra proteína, Retinoblastoma(Rb). Por sua vez essa última proteína, quando não fosforilada, sequestra o fator de transcrição responsável pela passagem de fase G1 para S (fator E2F) , regulando o ciclo celular(**FIGURA 3**)

FIGURA 3: Interação de *p27* e *MENIN*.

Mais recentemente, um paciente com fenótipo atípico de MEN1 (acromegalia e HPT recorrente) foi identificado com alteração no gene *AIP* (19). Este gene, até então, era relacionado somente com o fenótipo síndrome de adenoma hipofisário isolado familiar (FIPA) (20).

O gene *AIP* codifica uma proteína com o mesmo nome e sua interação com o receptor aril hidrocarbono (AHR), está relacionado com via de degradação de poluentes. Se localiza próximo ao *MEN1*, no braço longo do cromossomo 11(11q13.3)

Também, variantes patogênicas germinativas nos genes *CDKN1A/p21* (localização: 6p21.2), *CDKN2B/p15*(localização: 9p21.3) , *CDKN2C/p18*(localização: 12p11.2) e *CDKN1B/p27* foram reconhecidas em pacientes com adenomas de paratireoide esporádicos revelando que tumores aparentemente esporádicos podem ser, eventualmente, parte de síndromes hereditárias carreando alterações que determinam um aumento do risco de desenvolvimento de tumores ao longo da vida cuja penetrância ainda não pôde ser definida (21)(22) A interação dessas proteínas e envolvimento na regulação da proliferação celular é demonstrada na **FIGURA 4**.

FIGURA4: Genes recentemente associados a MEN1(*p15*, *p18* e *p21*)e sua interação no controle da proliferação celular.

1.3 – Rastreamento gênico e clínico

A descoberta do gene *MEN1* propiciou uma mudança gradual e decisiva no manejo clínico dos pacientes e de seus familiares porque o diagnóstico molecular foi inserido na prática clínica (23). Assim, o diagnóstico molecular dos casos-índices conduziu à identificação dos familiares sob-risco que não eram portadores de variante patogênica no gene *MEN1*, permitindo a exclusão destes pacientes e de seus descendentes da necessidade de rastreamento clínico periódico de tumores relacionados a *MEN1*. Em contrapartida, possibilitou a identificação de pacientes, membros de famílias com *MEN1*, apresentando tumores endócrinos relacionados a *MEN1* esporádicos sem variantes (fenocópias),o que resultou tanto no aperfeiçoamento do aconselhamento genético como

na instituição de um tratamento mais apropriado destes casos. É bem conhecido que critérios de indicação cirúrgica e mesmo procedimentos cirúrgicos podem ser muito diferentes para um mesmo tipo de tumor se o mesmo é classificado como esporádico ou como associado a MEN1(1)(6).

A análise gênica, também, propiciou o reconhecimento dos portadores de variante alélica patogênica germinativa neste gene, tanto sintomáticos como assintomáticos, e a sua incorporação em um programa de rastreamento clínico visando o diagnóstico e tratamento precoces (24). O objetivo principal do rastreamento clínico, laboratorial e radiológico periódico de indivíduos assintomáticos portadores de variantes alélicas patogênicas no gene *MEN1* é diminuir a morbidade e mortalidade relacionada à doença e aumentar a expectativa de vida destes pacientes (25)(6)

2. Sequenciamento gênico Sanger e paralelo em larga escala.

A técnica de sequenciamento gênico, descrita em 1975, determinou o início de uma nova fase da genética, propiciando a identificação da causa molecular para inúmeras doenças (26). Nos últimos 15-20 anos, esta metodologia foi incorporada como teste diagnóstico para várias doenças genéticas. A MEN1 é um bom exemplo da incorporação do sequenciamento genético na prática médica (23)(15)

Apesar da técnica de Sanger ter permitido a introdução do sequenciamento gênico como ferramenta diagnóstica em muitas doenças, sua utilização plena na prática clínica é, por vezes, dificultada por algumas particularidades. Assim, situações associadas com MEN1 e outras síndromes genéticas como a heterogeneidade genética, a falta de regiões “*hot spot*”, necessidade de análise de múltiplos genes e/ou de genes grandes e a necessidade de inclusão de estudos de regiões intrônicas ou regulatórias são exemplos que dificultaram a implantação desta metodologia na rotina diagnóstica. A isto se acrescenta a necessidade de vários “*primers*” para cobertura adequada que encarecem a técnica de sequenciamento e a tornam mais laboriosa. Assim, mais recentemente, novas metodologias de sequenciamento têm sido desenvolvidas com o objetivo de genotipagem mais ampla (27)

O sequenciamento paralelo em larga escala é um exemplo disto, uma vez que permite não somente estender a área de cobertura de um determinado gene como possibilita a cobertura simultânea de outros genes potencialmente relacionados a uma dada doença. Isto é conseguido com maior velocidade de obtenção de informações e menor custo. Painéis de genes avaliados por sequenciamento paralelo em larga escala tem

sido desenvolvidos para diversas doenças hereditárias com a prerrogativa de serem mais vantajosos que o sequenciamento por Sanger. Este tipo de sequenciamento possibilita análises que compreendem uma lista grande de genes ou ainda de exomas e genomas completos (28)(27) Entretanto a ponderação na seleção da técnica ideal a ser empregada para cada situação clínica tem de ser considerada. De fato há situações diversas na prática clínica, nos últimos anos, onde convênios tem liberado a análise de genes para uma doença específica e, pela praticidade, os laboratórios tem optado livremente por fazer uso de técnicas de sequenciamento paralelo em larga escala, como a análise de exomas, ainda que a solicitação médica tenha sido a análise de um único gene.

A estratégia de oferecer painéis mais direcionados, como o que propomos neste estudo, tem a vantagem de sequenciar somente genes reconhecidamente relacionados ao fenótipo dos pacientes.

O intuito desse estudo é incorporar a prática médica um painel genético baseado em sequenciamento paralelo em larga escala. Esse painel inclui o sequenciamento dos genes *MEN1*, *CDKN2B/p15*, *CDKN2C/p18*, *CDKN1A/p21*, *CDKN1B/p27Kipl* e *AIP* e tem o intuito de colaborar com uma análise mais profunda, mais rápida e eficiente de todos os grupos de pacientes com suspeita clínica de MEN1.

3. Revisão circunstanciada.

Em estudo recentemente concluído em nosso Serviço (Proc. FAPESP nº 2013/19810-2; 2013/15388-4; 2015/07625-1) intitulado “Avaliação do método de sequenciamento de nova geração no diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1” foi possível comparar a técnica de Sanger com a de sequenciamento paralelo em larga escala em 76 pacientes com diagnóstico clínico de MEN1. Foi concluído que a técnica pode ser usada como ferramenta eficiente para o diagnóstico de MEN1, com bom custo benefício (29).

Baseado no objetivo primário de padronização e de avaliação da confiabilidade da técnica, foram incluídos, na sua maioria, pacientes com diagnóstico clínico de MEN1 familiar clássica e um número limitado de casos com MEN1 esporádica ou aparentemente esporádica com ou sem mutação germinativa *MEN1* conhecida. Como consequência, demonstramos que a técnica de sequenciamento paralelo em larga escala é custo efetiva para esta população de casos-índices MEN1 analisados o que viabiliza a sua introdução

na prática clínica como ferramenta útil para se estabelecer ou excluir o diagnóstico genético de MEN1

Neste estudo, foram incluídos 49 pacientes com história familiar positiva para MEN1 e 27 casos com apresentação esporádica. Variantes patogênicas, incluindo 13 novas, foram identificadas por NGS na maioria dos casos familiares (84%; 41/49) e em 60% (16/27) dos casos esporádicos. Todas as variantes patogênicas foram identificadas tanto por NGS como por Sanger. Neste estudo, análise de deleções grosseiras foi realizada pela técnica de MLPA nos 19 pacientes *MEN1* negativos sendo que deleções grandes foram identificadas em 3 dos 8 pacientes com MEN1 familiar e em nenhum dos 11 casos esporádicos (30).

Todas as variantes patogênicas foram identificadas tanto por sequenciamento paralelo em larga escala como por Sanger e neste estudo, a análise de grandes deleções foi realizada pela técnica de MLPA

Com resultados positivos viabilizando a incorporação dessa técnica para o diagnóstico clínico de MEN1, o próximo passo destina-se a ampliar essa casuística inicial para todos os grupos de pacientes descritos pelos Guidelines (6), que deveriam ser incorporados e que não são inclusos atualmente na rotina diagnóstica devido a inviabilidade de serem feitos pela metodologia de Sanger.

Além disso, outro passo importante é o de estender a análise molecular para os outros genes relacionados a doença (*CDKN2B/p15*, *CDKN2C/p18*, *CDKN1A/p21*, *CDKN1B/p27* and *AIP*), como sugerido por estes Guidelines. Com este propósito, um primeiro passo, ainda muito preliminar, foi dado com o mesmo projeto de Auxílio-Pesquisa Regular (Proc. FAPESP nº 2013/19810-2; 2013/15388-4; 2015/07625-1) que resultou na análise destes genes em 9 pacientes com MEN1 que eram negativos para variantes patogênicas no gene *MEN1* quando avaliados tanto por sequenciamento paralelo em larga escala como por MLPA. Nesta análise preliminar, nenhuma variante patogênica foi encontrada (30)

Consensos internacionais têm estabelecido quais são os grupos de pacientes com indicação para análise do gene *MEN1* e de genes MEN1-relacionados (**Tabela 1**)(6). Ao longo dos últimos 10 anos vários fenótipos ou condições clínicas suspeitas foram gradualmente sendo incorporadas como indicação de análise genética *MEN1* (**Tabela 1**). Entretanto, estes fenótipos potenciais de MEN1 não têm sido consistentemente avaliados na prática clínica. Isto se deve, em parte, ao desconhecimento destas indicações pelos médicos, pela incerteza do custo-benefício destas análises e pelas dificuldades aqui já

ressaltadas da aplicação da técnica de Sequenciamento Sanger para o diagnóstico de MEN1.

Tabela 1. Critérios estabelecidos pelo último Consenso Internacional de MEN1(2012) para indicação de análise genética (gene *MEN1* e genes relacionados).

Indicações atuais de análise do gene <i>MEN1</i>
Caso-índice com MEN1 (2 ou mais tumores MEN1 principais)
Parentes em 1º grau de caso-índice com mutação <i>MEN1</i> conhecida: assintomáticos ou com MEN1 familiar (pelo menos 1 tumor)
Casos-índices com suspeita clínica de MEN1:
- Hiperplasia de paratireoide independente de idade
- Adenoma de paratireoide (antes dos 30 anos)
- HPT recorrente (independente de idade)
- Gastrinoma (independente de idade)
- Tumor neuroendócrino pancreático múltiplo (independente de idade)
- Presença de dois tumores não clássicos (sem critérios para o diagnóstico clínico): ex, HPT e adenoma adrenal; HPT e Tumor neuroendócrino tímico
HPT familiar isolado
Indicações de análise de genes MEN1-relacionados (<i>CDKIs, AIP, CDC73</i>)
Casos com fenótipo MEN1 ou MEN1-like sem mutação <i>MEN1</i> germinativa detectada por Sequenciamento Sanger ou MLPA

A isto se soma o número crescente de genes relacionados a MEN1 que foram identificados nos últimos anos, dificultando ainda mais a implementação destas recomendações com a técnica de Sequenciamento Sanger.

Assim, na prática clínica, os casos-índices com fenótipo clássico de MEN1 familiar ou MEN1 aparentemente esporádica bem como familiares sob risco, sintomáticos ou assintomáticos, representam os grupos de pacientes que mais frequentemente são oferecidos os testes direcionados ao diagnóstico molecular. Também, pelas razões já aqui ressaltadas a análise genética quase que praticamente é restrita à análise do gene *MEN1* por sequenciamento Sanger.

Neste cenário, todo o enfoque, tanto em nosso laboratório como em outros serviços, parece ter sido direcionado, principalmente, aos casos de MEN1 familiar

clássica onde a possibilidade de achado de uma mutação parece ser superior a 90-95% e ao rastreamento dos familiares sob risco.

Paralelamente, o grupo de pacientes com MEN1 esporádica tem sido avaliado. Entretanto, a prevalência de variantes patogênicas encontradas no gene *MEN1* neste grupo é muito variável (5-60%). Já a avaliação dos outros estados ou condições sugeridas por “*Guidelines*” (Tabela 1) parece se restringir a estudos desenvolvidos em centros universitários. De fato, neste grupo de pacientes é esperada uma prevalência mais baixa de detecção de mutação germinativa *MEN1* se comparada aos casos de MEN1 clássica. Por isso, a relação custo-benefício da análise genética deste grupo de pacientes precisa ser melhor caracterizada.

A aplicação do sequenciamento paralelo em larga escala, otimizada e padronizada em nosso Serviço, tem o potencial de ser estendida e oferecida a todos os pacientes que encontram critérios de análise do gene *MEN1* e de genes relacionados a MEN1. São exemplos destas condições clínicas: MEN1 esporádica, MEN1 atípica (associação/combinção de tumores relacionados a MEN1 menos frequentes), casos suspeitos para MEN1 sem critérios clínicos de diagnóstico e para pacientes com tumores relacionados a MEN1 aparentemente esporádicos (**Tabela 1**).

Como dito previamente, todos os estudos que definiram os pacientes com indicação de análise genética do gene *MEN1* e de genes relacionados a MEN1 foram conduzidos por Sequenciamento Sanger com todas suas limitações e dificuldades (**Tabela 1**).

Medicina baseada em evidências sustenta fortemente a indicação pelo Consenso de diagnóstico genético de MEN1 para os casos-índices com diagnóstico clínico de MEN1 familiar (6). Por isso, este grupo foi inicialmente selecionado para alcançar a padronização da técnica em estudo anterior, como já aqui referido.

No entanto, os critérios usados que culminaram na recomendação por “*Guidelines*” de análise do gene *MEN1* ou de genes relacionados a MEN1 em vários grupos diferentes com suspeita clínica da doença eram muito heterogêneos. Assim, algumas indicações foram baseadas na compilação de trabalhos clínicos e/ou genéticos como, por exemplo, a análise genética de casos jovens com HPT e análise genética conduzida em jovens com adenomas hipofisários (31)(32)

Por outro lado, outras indicações foram definidas baseadas, principalmente, em dados epidemiológicos como é o caso da hiperplasia de paratireoide e gastrinomas (6) ou no racional que tumores multicêntricos são mais prevalentes em doenças hereditárias

como é o caso da indicação de análise do gene *MEN1* em tumores neuroendócrinos (TNEs) pancreáticos multicêntricos (6)

Cabe ressaltar que resultados e conclusões não foram homogêneos indicando a necessidade de outros estudos para definir o valor ou não de submeter estes diferentes grupos de pacientes ao teste de diagnóstico molecular direcionado ao gene *MEN1*. Estes questionamentos são amplificados uma vez que a análise genética dos genes *CDKIs* e *AIP* é recomendada para todos os casos cuja análise do gene *MEN1* foi negativa. A análise de cada um destes genes por Sanger, pelas dificuldades técnicas, inviabiliza a adoção desta recomendação na prática clínica.

Neste projeto atual, nós objetivamos padronizar a extensão, de forma definitiva, da técnica de sequenciamento paralelo em larga escala para todos os seis genes associados ao fenótipo *MEN1*, uma vez que esta estratégia foi preliminarmente aplicada a um número limitado de nove pacientes (30). Nós esperamos que a padronização deste painel com os seis genes associados ao fenótipo *MEN1* possa futuramente agregar valor ao manejo clínico bem como aperfeiçoar o aconselhamento genético.

A padronização de um painel e possibilidade de análise simultânea de todos os genes conhecidos associados ao fenótipo *MEN1* pode viabilizar esta investigação e, futuramente, definir o real valor e mesmo o impacto clínico desta análise genética nestes diferentes grupos.

Com a caracterização genética completa alcançada pelo painel desenhado, nós entendemos que poderá haver uma diferenciação e discriminação mais nítida de casos com ou sem ou mínimo potencial de serem herdados e, conseqüentemente, de transmitirem riscos de desenvolvimento de tumores aos seus descendentes.

De fato, casos *MEN1* esporádicos cuja análise genética é negativa têm sido denominados como fenocópias. Apesar da ausência de história familiar, guidelines tem recomendado sistematicamente que se faça aconselhamento genético de familiares de fenocópia e que seja conduzido um rastreamento clínico, hormonal e radiológico nos familiares sob risco (6). Entretanto, não é conhecido se há de fato benefícios advindos desta estratégia.

Fenocópias podem ser decorrentes, na sua maioria, da ocorrência casual e fortuita de dois tumores esporádicos que se desenvolveram a partir de mecanismos de tumorigênese não relacionados ou, raramente, de mutações em genes *CDKIs*, especialmente *p27*, ou *AIP*. Entretanto, estudos identificando fenocópias quase sempre se

limitam a ausência de mutação germinativa no gene *MEN1* investigada por Sanger (11); (33); (34).

É dito, mais recentemente, que fenocópias são representadas, principalmente, por pacientes mais velhos, cuja associação predominante é de HPT e adenoma hipofisário, que não desenvolvem um terceiro tumor, vivem melhor e por mais tempo que casos com mutações germinativas *MEN1* (33)(34).

A expectativa estimada de resultado genético positivo ou negativo para cada uma destas condições sob risco de *MEN1* precisa ser definida com mais exatidão para aprimorar o aconselhamento genético destes pacientes. Nesta direção, Ellard et al (2005) tentaram estimar o risco de detecção de mutação germinativa *MEN1* em diferentes populações testadas considerando a presença ou ausência de história familiar, número e tipos de tumores *MEN1*-relacionados nos casos submetidos ao teste genético (35).

Ellard et al demonstraram que a probabilidade de identificar uma variante patogênica em *MEN1* se correlacionou com o número de tumores relacionados a *MEN1* e com a história familiar. Em geral, variantes patogênicas foram encontradas em 79%, 37% e 15% dos casos-índices com três, dois e um tumor *MEN1* principal independente de história familiar. A prevalência de variantes alélicas patogênicas germinativas aumentou consideravelmente se uma história familiar era positiva em casos-índices com três, dois e um tumor principal (91%, 69% e 29%) em relação aos casos com história familiar negativa (69%, 23% e 0%). Também, foi demonstrada uma influência no tipo de associação de tumores sobre a prevalência de variantes patogênicas encontradas. Assim, o percentual de pacientes com mutações foi de 67% pela associação de HPT e tumores pancreáticos e de 15% por HPT e adenoma hipofisário (35). Esta análise não foi posteriormente reproduzida por nenhum outro estudo, exceto por estudo holandês discriminando achados fenotípicos de fenocópias (33)(34).

Além de perfis clínicos associados com risco diferencial de detecção de mutação, diferentes fenótipos *MEN1* têm sido associados com mutações nos genes *AIP* e *CDKIs*, incluindo *MEN1* familiar clássica, *MEN1* aparentemente esporádica, HPT esporádico isolado em diferentes idades, acromegalia esporádica, HPT familiar isolado, adenoma hipofisário esporádico, associações de tumores endócrinos suspeitas para *MEN1*, entre outros.

A padronização de painel por NGS pretendida neste estudo, poderá propiciar uma seleção de fenocópias verdadeiras pela análise completa e integrada de todos os genes relacionados a *MEN1* incluindo análise de deleções grandes por MLPA. Assim, fatores

clínicos preditores para ocorrência/ausência de mutação germinativa seriam interessantes de serem avaliados em casos com mutação e em fenocópias verdadeiras.

Um outro ponto importante a ser considerado em relação a estratégia de análise molecular de pacientes com MEN1 é a de que “*Guidelines*” recomendam a investigação ativa de deleções grandes e em todos os pacientes avaliados por Sanger que forem negativos para MEN1. Estudos aplicando, na maioria dos casos, a técnica de MLPA demonstraram uma frequência extremamente variável de grandes deleções reportadas (1-33)(10)(12) (13). É possível que esta variação seja influenciada por vários fatores de interferência como o tamanho da amostragem, a informação limitada do fenótipo ou a inclusão de pacientes com achados clínicos que configuram um risco relativamente baixo de detecção de variantes patogênicas no gene *MEN1*. Provavelmente, estes fatores têm limitado a incorporação da investigação sistemática destas deleções por MLPA na prática clínica. A análise por MLPA associada ao detalhamento dos fenótipos poderá discriminar melhor qual é a expectativa por resultado positivo ou negativo nos diferentes subgrupos de pacientes analisados. Como previamente informado, detectamos deleções grandes em 3 pacientes com MEN1 familiar e em nenhum de 11 casos esporádicos que eram negativos para MEN1 por sequenciamento paralelo em larga escala, sugerindo a influência da história familiar com fator preditivo para ocorrência destas deleções. Entretanto, o número de pacientes avaliados ainda é limitado e deve ser expandido no presente estudo.

Como o número de genes é crescente nos últimos anos, a técnica de Sequenciamento Sanger dificulta a implementação na prática clínica da recomendação por Guidelines de oferecer testes de diagnóstico molecular para todos os grupos de pacientes. Para isto, nós iniciamos o desenvolvimento de um painel de diagnóstico molecular baseado em sequenciamento paralelo em larga escala que inclui todos os genes conhecidos como relacionados ao fenótipo MEN1. Pela sua praticidade e custo-efetividade, o painel em desenvolvimento tem o potencial para ser aplicado futuramente para todos os casos com indicação de análise genética (**Tabela 1**).

Para a maioria dos grupos recomendados pelo último Consenso (2012) é esperada uma prevalência mais baixa de detecção de mutação germinativa *MEN1* se comparada aos casos de MEN1 clássica. Todos os estudos que tentaram definir o papel de testes genéticos para estes diferentes grupos de pacientes foram conduzidos por Sequenciamento Sanger com suas limitações e dificuldades. A análise mais ampla dos outros genes MEN1-relacionados por sequenciamento paralelo em larga escala também não foi ainda conduzida nesta população sob risco de MEN1. A baixa prevalência

esperada associada ao custo e dificuldades de execução pela técnica de Sequenciamento Sanger provavelmente tem desmotivado a avaliação destes grupos de pacientes apesar de haver recomendações destas análises pelo último Consenso sobre MEN1 (2012).

No trabalho atual, usando a técnica NGS, pretendemos incluir, especialmente, casos com MEN1 esporádica e, dentro da disponibilidade, pacientes pertencentes a grupos com menor probabilidade de serem encontradas mutações germinativas (Tabela 1).

Com a disponibilidade da análise genética em nosso meio houve uma significativa melhora do diagnóstico clínico de MEN1 no país nos últimos 15 anos. Assim, o número de casos de MEN1 tanto familiares como esporádicos ou de casos suspeitos para MEN1 vem aumentando exponencialmente em nosso Serviço que se tornou um centro de referência nacional para o encaminhamento destes pacientes (Ambulatório de MEN1 do HCFMUSP e de tumores neuroendócrinos do ICESP). A aplicação do sequenciamento paralelo em larga escala poderá resolver esta demanda crescente e, ainda, contribuir futuramente para definirmos melhor quem são os grupos de pacientes que realmente se beneficiariam da realização do exame genético bem como da expectativa estimada de resultado genético positivo ou negativo nestas diferentes populações sob risco de MEN1, questões ainda não respondidas na literatura.

4- Objetivos

Os objetivos principais deste estudo são:

- 1) Padronizar técnica de sequenciamento gênico capaz de proporcionar a análise genética completa e integrada de todos os genes relacionados a MEN1 conhecidos (genes MEN1, CDKN2B/p15, CDKN2C/p18 CDKN1A/p21, CDKN1B/p27Kip1 e AIP) permitindo tanto a avaliação de casos com MEN1 familiar como de todos os casos com MEN1 ou condições clínicas associadas a MEN1 (MEN1 esporádica, casos atípicos ou suspeitos de MEN1 e indivíduos com tumores MEN1-relacionados aparentemente esporádicos);
- 2) Propiciar, pela avaliação genética completa, o aprimoramento do aconselhamento genético destas diferentes populações.

5- Materiais e Métodos

Esta pesquisa foi desenvolvida após assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 2**), previamente aprovado pela CaPPesq, pelos pacientes com MEN1 que são seguidos clinicamente no Ambulatório de Neoplasia Endócrina Múltipla tipo (AIMN 8002) da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O mesmo termo de consentimento foi aplicado aos pacientes com tumores endócrinos relacionados a MEN1 que são seguidos clinicamente em outros ambulatórios do próprio Hospital das Clínicas (endocrinologia, gastrocirurgia, gastroclínica, cirurgia de cabeça e pescoço), incluindo Instituições agregadas ao Complexo como o Instituto do Câncer (oncologia e gastrocirurgia) e o de Psiquiatria (neuroendocrinologia). Todos estes pacientes somente assinaram o termo de consentimento mediante carta de encaminhamento do médico responsável aprovando a inclusão de seu paciente no estudo.

Todo o estudo genético foi realizado na Unidade de Endocrinologia Genética (UEG) do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM 25) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Para assinatura do termo, os pacientes tiveram esclarecimento verbal e escrito sobre a necessidade da coleta de material biológico (sangue) para extração de DNA, em acordo com os objetivos da pesquisa.

5.1 Extração de DNA

A extração de DNA genômico, a partir de leucócitos de sangue periférico, foi realizada seguindo o protocolo de extração “*Salting Out*”, ou Kit comercial de extração por colunas Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare).

5.2 Amplificação para sequenciamento Sanger

Oligonucleotídeos iniciadores (primers) foram desenhados com uso do software Primer3 (frodo.wi.mit.edu) para análise por PCR e sequenciamento tradicional (Sanger) de toda a região codificadora do gene *MEN1* (do éxon 2 ao 10 separadamente). As condições de purificação e precipitação das amostras bem como a seleção dos primers e as condições de PCR são conduzidos como previamente publicado (1)(25).

Tanto a amplificação como o sequenciamento por Sanger foram realizados somente com o objetivo de confirmar variantes patogênicas encontradas na análise do painel por sequenciamento paralelo em larga escala.

5.3 Amplificação para Sequenciamento Paralelo em Larga Escala

Para o sequenciamento paralelo em larga escala inicialmente foram utilizados primers que abrangem todo gene de interesse, resultando em produtos de PCR longos (Long Range PCR). (**Tabela 2**) O tamanho do produto de PCR obtido do gene *MEN1*, por exemplo, foi de aproximadamente 7000 pb que cobre toda a extensão do gene incluindo região promotora, introns e exons. Para obtenção de “*Long Range PCR*”, foi utilizado o kit da Thermo Fisher (Ca, USA).

Tabela 2: Primers desenhados para PCR Long Range.

MEN1	Foward 5'-3'	TAACAGACACTGATACCCAGCTAAAGC
	Reverse 3'-5'	GGGATACGAAGGAGAGGAACTAGG
p15	Foward 5'-3'	GGGATTAGGAGCTGAGGGCA
	Reverse 3'-5'	AGAGGCGTTTGGGGTTTATCAG
p18	Foward 5'-3'	CTGTGCTTAGTGGCAGTCCG
	Reverse 3'-5'	GGTGGACGGGACATGGGTAA
p21	Foward 5'-3'	GCTGTGGCTCTGATTGGCTT
	Reverse 3'-5'	GGTGATCTTTGCAGAGGTGTGAC
p27	Foward 5'-3'	CAGTACCCCTCCAGCAGTCA
	Reverse 3'-5'	ACATCATCTGAGTTGTGTGGCCT
AIP	Foward 5'-3'	CCAGCCCCGAGACATTCCTA
	Reverse 3'-5'	TCCCCCTTAAGACTGTGGGC

No primeiro momento, o Kit de reagentes utilizado para PCR Long Range foi o Kit Fermentas, comercializado e distribuído pela Thermo Fisher. O protocolo utilizado é descrito na **Tabela 3**

Tabela 3: Protocolo para PCR Long Range (kit Fermentas).

Volume	Reagentes
5 µl	Buffer a 10x para PCR longa a 15mM +MgCl ₂
5 µl	DNTP a 2Mm
1 µl	DNA alvo
2 µl	DMSO
0,5 µl	Primer F a 20 pmol
0,5 µl	Primer R a 20 pmol
0,5 µl	Enzima para PCR Long Range
35,5 µl	Água deionizada (livre de nuclease)

O programa de termociclagem utilizado para PCR foi:

1ª fase (denaturação): 94°C por 4 minutos

2ª fase (denaturação): 95°C por 15 segundos

3ª fase (anelamento): 61,5°C por 30 segundos

4ª fase (extensão): 68°C por 7:50 minutos

5ª fase (extensão): 68°C por 10 minutos

6ª fase: 15°C (infinito)

Repetir 39 ciclos

Com este kit foi possível a otimização no nosso laboratório para obtenção de “*long range PCR*” do gene *MEN1* em trabalho anteriormente citado. Recentemente, esta enzima foi descontinuada pelo fabricante. Com isso, houve a necessidade de procurar rapidamente uma outra que atendesse os requisitos necessários para obtenção de “*long range PCR*” direcionada ao presente estudo. Neste processo de seleção foi levado em consideração qualidade, reprodutibilidade e preço da enzima, objetivando melhor relação custo-benefício. O kit para “*long range PCR*” Go TAq Long PCR MASTER MIX (Promega) foi, nesta avaliação, o que melhor atendeu estas necessidades.

Com esta nova enzima, o protocolo utilizado para cada reação esta descrito na **Tabela 4** (seguindo recomendações do Fabricante)

Tabela 4: Protocolo para PCR Long Range kiT GOtaq Long PCR (Promega)

Vulume	Reagente
25 µl	GO taq Long PCR Master Mix 2X
0,5 µl	DNA alvo
2 µl	DMSO
1,0 µl	Primer F a 10 pmol
1,0 µl	Primer R a 10 pmol
20,5 µl	de água deionizada (livre de nuclease)

As condições de termociclagem para o gene *AIP* foram:

1ª fase (denaturação): 95° por 2 minutos
 2ª fase (denaturação): 94° por 15 segundos
 3ª fase (anelamento): 66° por 9 minutos
 4ª fase (extensão): 72° por 10 minutos
 5ª fase: 4° infinito

} 35 ciclos

Por sua vez, as condições de termociclagem para os demais genes (*MEN1*, *CDKN2B/p15*, *CDKN2C/p18*, *CDKN1A/p21*, *CDKN1B/p27*) foram:

1ª fase (denaturação): 95° por 2 minutos
 2ª fase (denaturação): 94° por 15 segundos
 3ª fase (anelamento): 68° por 10 minutos
 4ª fase (extensão): 72° por 10 minutos
 5ª fase: 4° infinito

} 35 ciclos

Foi, então, realizada eletroforese em gel de agarose 1,0% para checagem do produto de PCR, utilizando corante Blue Green Loading Dye I e o marcador de peso molecular de 1 kpb (Invitrogen, Brasil). O produto foi, então, analisado e quantificado por meio de espectrofotometria (Nanovue, GE) antes de ser encaminhado para processos de preparo para o sequenciamento. Tal processo de enriquecimento de amostra foi aplicado para estudo dos genes *MEN1*, *CDKN2B/p15*, *CDKN2C/p18*, *CDKN1A/p21*, *CDKN1B/p27* e *AIP*.

5.4 Sequenciamento paralelo em larga escala.

Os sequenciamentos paralelo em larga escala foi realizado na plataforma Illumina por ser bastante apropriada para estudos que envolvem genômica humana, pelas baixas taxas de erro, sobretudo, em regiões de homopolímeros e, por ser a tecnologia dominante na atualidade suportada pelas principais ferramentas de bioinformática.

As sequências produzidas possuem de 36 a 100 pares de bases que foram lidas tanto em paired-end (quando as duas extremidades da molécula do DNA são lidas), o que permite leituras de até 200 pares de base. O processo de sequenciamento envolveu as seguintes etapas fundamentais:

1. Confeção de bibliotecas de fragmentos de DNA obtidas através da fragmentação enzimática do DNA genômico.

Durante o presente estudo esta etapa foi realizada através da utilização de 2 kits para preparo de biblioteca diferentes. O kit Nextera XT DNA Library Preparation , © 2019 Illumina e o Kit kit de Genoma Total da Agilent, SureSelectQXT Whole Genome Library Prep for Illumina Multiplexed Sequencing, Ambos permitiram um desempenho satisfatório e semelhante para as amostras e genes sequenciados no presente estudo, sendo a única justificativa de utilização de um em detrimento do outro o valor de mercado no momento da aquisição dos Kits.

As amostras amplificadas por PCR Long Range de cada gene foram previamente quantificadas, utilizando o aparelho de quantificação por fluorescência Qubit(Invitrogen), obtendo a concentração total em nanogramas por microlitro(ng/ul) de cada amostra. Após, uma normalização foi realizada para que todos os genes de um mesmo paciente pudessem ser colocados em um mesmo pool em concentrações equimolares. Após essa etapa os pools por paciente foram quantificados (Qubit) e diluídos para que estivessem

todos dentro da concentração inicial pedida pelos diferentes fabricantes dos kits utilizados (1ng/ul Nextera XT; 50ng/ul SureSelect) , e então confeccionadas as bibliotecas conforme protocolo recomendado por cada kit.

Após a obtenção das bibliotecas, essas foram quantificadas por Q-PCR, tanto para conferir a qualidade das amostras quanto para que com esses dados de quantificação pudesse ser feito um pool único e equimolar de todas as bibliotecas para sequenciar. Para o pool de bibliotecas obtido através do kit da Illumina, foi utilizado 10% de controle PhiX no pool final sequenciado, e este pool estava em uma concentração final de 2nM. Para o pool de bibliotecas obtido através do kit da Agilent foi utilizado 30% de controle PhiX e o pool estava numa concentração final de 4nM. O Sequenciador é responsável pelas etapas 2 e 3 a seguir:

2. Amplificação clonal:

Nesta etapa, os fragmentos de DNA ligados às moléculas adaptadoras foram depositados em uma lâmina especial denominada flowcell. Esta lâmina é constituída por 8 canaletas (ou lanes), em cuja superfície encontram-se fixados, de maneira paralela, duas espécies de oligonucleotídeos que são complementares às moléculas adaptadoras acopladas às extremidades dos fragmentos de DNA da biblioteca. Após a ligação dos fragmentos aos seus oligos complementares, presentes na superfície da flowcell, cada molécula foi amplificada várias vezes através de uma reação conhecida como bridge PCR. Ao final, foram gerados clusters (clones) de moléculas de DNA idênticas à molécula original que são ligadas covalentemente à superfície da flowcell.

3. Sequenciamento

Após a amplificação clonal, as moléculas antisense foram removidas enzimaticamente e o processo de sequenciamento iniciado com o acoplamento de um primer especial. Em seguida, nucleotídeos modificados com terminadores reversíveis marcados com fluoróforos específicos para cada nucleotídeo foram adicionados ao meio. A cada ciclo de incorporação foram geradas imagens de toda a superfície da flowcell por meio de um scanner de fluorescência em cada um dos comprimentos de onda (específico para cada fluoróforo). Os clusters presentes na superfície da flowcell foram, então, identificados e mapeados. A sobreposição das imagens produzidas a cada ciclo de incorporação propicia a identificação da sequência de bases nucleotídicas de cada cluster de moléculas, ou seja, a sequência do fragmento que deu origem ao cluster.

Para as etapas 2 e 3 foi utilizado o mesmo kit de sequenciamento da Illumina , próprio para utilização no Sequenciador MISEQ, também da Illumina . O Kit utilizado foi o MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles), Illumina.

5.5 Bioinformática

A partir dos arquivos gerados no processo de sequenciamento de nova geração, a análise de bioinformática foi realizada por meio das seguintes etapas:

[1] checagem da consistência dos arquivos (análise de qualidade e da estrutura do arquivo FASTQ gerado) FASTQC e Groomer.

[2] alinhamento/recalibragem das sequências das amostras a uma sequência referência do genoma humano (hg19 UCSC/ b37 GRC/NCBI). Nesta etapa, a localização no genoma referência de cada fragmento do DNA sequenciado é determinada. Foram utilizados os programas BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) e GATk (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>), respectivamente.

[3] genotipagem. A partir do melhor alinhamento possível, é realizada a genotipagem da amostra que consiste em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos existentes em relação ao genoma referência. O programa GATK também foi utilizado para esta etapa.

[4] recalibragem da genotipagem. Sucintamente, nesta fase, falsos positivos são detectados e sinalizados a fim de que sejam descartados do processo. Novamente, módulos do GATK realizam esta tarefa para SNPs e In/dels. CNVs identificados não são recalibrados e passam diretamente para a próxima etapa da análise.

[5] anotação das variantes detectadas. Esta etapa consiste em:

(a) anotar as variantes encontradas utilizando o programa ANNOVAR- (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>);

(b) filtrar de acordo com bancos públicos de variantes com frequência menor ou igual a de MEN1 (1:30.000) utilizando bancos de dados genômicos populacionais públicos (gnomAD, 1000 genomas, ABraOM),

(c) prever, *in silico*, a consequência de cada variante na estrutura/função da proteína sintetizada (benigna, neutra ou deletéria). As ferramentas utilizadas para esta tarefa são: Mutation Taster e PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

5.6 Sequenciamento Automático Tradicional (Sanger)

Novas alterações identificadas por NGS foram validadas pelo sequenciamento Sanger. Em resumo, a região alvo a ser validada foi amplificada por PCR utilizando primers flanqueadores desta região de interesse. Todas as amplificações foram acompanhadas de um controle negativo. Os produtos amplificados foram submetidos a uma purificação enzimática com a enzima ExoSTAR (Promega), conforme a recomendação do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O produto desta reação foi submetido a uma eletroforese capilar no sequenciador automático ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (16 capilares). As análises dos eletroferogramas obtidos foram feitas manualmente através do auxílio de softwares de edição de sequência (Sequencher 5; GeneCodes Corporation, Ann Arbor, EUA).

5.7 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

O procedimento para a reação de MLPA foi realizado com o kit SALSA MLPA probemix P244-C1 AIP-MEN1-CDKN1B (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) seguindo as recomendações do fabricante. O processo foi dividido em cinco etapas: [1] denaturação do DNA e hibridização das sondas, [2] reação de ligação, [3] amplificação por PCR, [4] separação dos amplicons por eletroforese e [5] análise dos dados obtidos.

Como previamente informado, MLPA foi realizado nos casos negativos na análise por NGS.

6- Resultados

Durante o processo de análise de revisão de prontuários dos casos com diagnóstico clínico de MEN1 foi estabelecido que casos seriam definidos de acordo com os tumores endócrinos principais presentes no momento do diagnóstico clínico de MEN1 (dois ou mais tumores endócrinos acometendo hipófise, paratireoide e pâncreas-duodeno endócrinos). Assim, pacientes poderiam ter mais tumores que se desenvolveram posteriormente ao diagnóstico clínico de MEN1. Estes tumores não foram considerados na avaliação de associações de tumores encontradas ao diagnóstico.

Da mesma forma, foi considerada a informação que se tinha de história familiar no momento do diagnóstico. Assim, um caso-índice foi definido como sendo MEN1 familiar se um parente em primeiro grau também havia sido diagnosticado com pelo menos um tumor principal associado a síndrome MEN1. Dentro deste contexto, casos-índices foram definidos como MEN1 esporádica se eram únicos em suas famílias e a história familiar era claramente negativa ou dados de familiares eram insuficientes para concluir como familiar. Eventualmente, na evolução, casos aparentemente esporádicos na avaliação inicial foram posteriormente reclassificados como MEN1 familiar pela detecção de tumores em parentes.

Diante destas considerações sobre denominações e classificações, havia 143 casos-índices com MEN1, cuja idade média ao diagnóstico foi de 43 ± 15 y (7-77 y). A maioria era representada por mulheres (96/143, 67% vs. 47/143, 33%) com nenhuma diferença entre homens e mulheres na idade média ao diagnóstico (mulheres: 44 ± 14 anos vs. homens: 41 ± 16 anos). MEN familiar era representada por 40 casos com MEN1 familiar e 103 casos com MEN1 esporádica.

Todos os pacientes foram submetidos ao sequenciamento por Sanger enquanto que 93 casos foram avaliados por sequenciamento paralelo em larga escala para o gene *MEN1*. O painel de 6 genes foi realizado em 39 casos que eram negativos para a presença de mutação no gene *MEN1* avaliados por Sanger ou por sequenciamento paralelo em larga escala direcionado ao gene *MEN1*. MLPA foi conduzido em todos os 58 casos negativos para o gene *MEN1* por Sanger ou por sequenciamento paralelo em larga escala direcionado ao gene *MEN1* ou englobando os 6 genes estudados.

Para os primeiros 25 pacientes com MEN1 esporádica selecionados para o painel multi-gene, foi feita a extração de DNA pelo método de Sal. Em alguns casos, onde o material obtido apresentou uma qualidade abaixo do desejado, foi feita uma purificação

com kit comercial de extração por colunas (Illustra blood genomicPrep Mini Spin Ki, GE).

Em seguida, esse material foi devidamente quantificado e amplificado por “*Long Range PCR*”, utilizando enzima Thermo Fisher (Ca, USA) (protocolo descrito na metodologia), para todos os genes a serem sequenciados no painel (*MEN1*, *CDKN2B/p15*, *CDKN2C/p18* *CDKN1A/p21*, *CDKN1B/p27* e *AIP*).

A partir do material amplificado foram construídas bibliotecas gênicas que foram posteriormente sequenciadas, utilizando plataforma da Illumina - Miseq.

Considerando todos os genes sequenciados, a qualidade do sequenciamento resultou efetiva em: *MEN1* (23/25); *CDKN2B/p15* (23/25) e; *CDKN1B/p27* (23/25). Esses genes obtiveram uma porcentagem alta de reads mapeados tanto na sequência referência quanto no “*target*”, bem como uma cobertura vertical média (quantidade de vezes que cada base nitrogenada é lida) dentro dos padrões exigidos(**Tabela 5**).

Tabela 5. Análise de qualidade da corrida (*MEN1*, *CDKN2B/p15*, *CDKN1B/p27*).

	Reads mapeados na ref.(hg19) (%)	Reads mapeados no “target” (%)	Cobertura vertical Média (X)
Média	86,3	86,6	65,9
Desvio-padrão	8,1	7,2	30,7

Houve baixa performance para o gene *CDKN2C/p18* (8/25) enquanto que, nesta corrida, não funcionaram os genes *CDKN1A/p21* e *AIP*. Dentre os 25 pacientes sequenciados, em 2 casos nenhum gene funcionou. Para os casos que obtiveram boa qualidade na corrida, a análise procedeu normalmente.

Nós destacamos duas variantes que foram obtidas a partir deste painel multi-gene (**Tabela 6**) em fase de otimização para este estudo. Um delas é uma variante em frameshift, encontrada no exon 10 que é ausente nos principais bancos de dados populacionais de frequência genômica (GnomAD, 1000 genomas, ABraOM). Esta variante foi confirmada no IGV

A variante foi confirmada no IGV (**Figura 5**) e também pelo método de Sanger (**Figura 6**).

Tabela 6. Variantes Identificadas durante a primeira corrida.

Id. Amostra	Gene	Variante	Consequência	Freq. gnomAD	Freq. ABraOM
15	<i>MEN1</i>	c.203C>T/p.A68V;ht (ex2)	Missense	ausente	ausente
19	<i>MEN1</i>	c.1546_1547insC; R516Pfs*15(ex10)	Frameshift	ausente	ausente

Figura 5 – Confirmação da Variante em Frameshift (IGV) c.1546_1547insC (R516Pfs) no gene *MEN1* em paciente com apresentação clínica típica de MEN1.

Figura 6 – Confirmação da Variante em Frameshift (método de Sanger) c.1546_1547insC; R516Pfs no gene *MEN1* em paciente com apresentação clínica típica de MEN1.

A paciente, 40 anos, tem uma história clínica de ter sido diagnosticada com prolactinoma aos 30 anos de idade. Aos 32 anos de idade foi submetida a cirurgia transfenoidal pelo macroprolactinoma com resolução clínica da doença. Na época do diagnóstico de macroprolactinoma tinha níveis séricos elevados de cálcio que resultou no diagnóstico de HPT primário aos 32 anos. Paciente foi, então, submetida a paratireoidectomia total com enxerto de paratireoide em antebraço tendo evoluído com hipoparatiroidismo permanente. O anátomo-patológico confirmou a presença de quatro paratireoides hiperplásicas. Uma tentativa de reimplante de paratireoide criopreservada foi conduzida 2 anos após sem resolução do hipoparatiroidismo. Na investigação de PETs, ecoendoscopia revelou nódulos pancreáticos subcentimétricos aos 32 anos que permaneceram estáveis desde então. Apesar da pequena dimensão, um destes nódulos foi biopsiado sendo confirmado o diagnóstico de neoplasia endócrina pancreática pela imunohistoquímica positiva para cromogranina e sinaptofisina. Como outras evidências clínicas de MEN1, paciente teve diagnóstico de mioma uterino aos 33 anos e de lipoma subescapular aos 34 anos.

Sua história familiar é aparentemente negativa para MEN1. Entretanto, não há informações sobre história paterna. Exames hormonais realizados previamente ao teste molecular direcionados para MEN1 foram negativos em dois irmãos e na mãe da paciente. Exame genético por SS foi, então, realizado nos familiares sendo que a variante patogênica c.1546_1547insC não foi encontrada na mãe e em nenhum dos dois irmãos da paciente. Os familiares serão novamente interrogados sobre informações do pai.

Dentre os 23 pacientes sequenciados por sequenciamento paralelo em larga escala, apenas esta paciente tinha tumores acometendo as três glândulas endócrinas principais (hipófise, paratireoide e pâncreas) em combinação com multifocalidade. Assim, é possível que a somatória de algumas características do fenótipo represente fatores preditivos positivos para achado de variantes patogênicas.

A variante frameshift c.1546_1547insC foi previamente identificada em outros 5 casos-índices com MEN1 de nossa casuística. Em duas famílias uma segregação da doença com a variante foi claramente documentada. Esta variante foi primeiramente reportada na literatura logo após a descoberta no gene *MEN1* (3). Também, é reportada como sendo um de nove variantes caracterizadas com “*warm spot mutacional*” em MEN1 (10). Esta mesma variante está localizada em um dos 29 codons mais frequentemente afetados por variantes patogênicas previamente reportadas (11).

Uma variante com potencial de ser patogênica foi encontrada em um outro paciente, também no gene *MEN1* (**Tabela 6**). Trata-se de uma variante “*missense*” em heterozigose c.203C>T (p.A68V), localizada no exon 2, cuja substituição do nucleotídeo citosina por timina na posição 203 determina a troca do aminoácido alanina por valina. Esta variante foi confirmada por análise no IGV (**Figura 7**) e, também, pelo método de Sanger (**Figura 8**).

Figura 7. Confirmação da variante “*missense*” c.203C>T (p.A68V) identificada no IGV após NGS.

Figura 8. Confirmação da variante “*missense*” c.203C>T (p.A68V) (método de Sanger).

A paciente encontrada com esta variante “*missense*” teve o diagnóstico de MEN1 definido pela associação de HPT e acromegalia. Apesar desta associação de tumores envolver duas das três glândulas endócrinas principais, a acromegalia está presente em menos de 3% dos pacientes com MEN1. Assim, esta apresentação clínica é considerada atípica em MEN1. De fato, em nossa casuística com cerca de 300 pacientes com diagnóstico clínico e genético de MEN1 há somente 2 pacientes com acromegalia e outros 3 pacientes com adenoma hipofisário cosecretor de GH e prolactina. Dentre os 21 pacientes *MEN1*-negativos deste último sequenciamento por NGS, havia 11 pacientes com MEN1 com HPT e acromegalia. É dito que menos de 10% dos pacientes com esta associação tem variantes patogênicas no gene *MEN1*. Estes casos seriam candidatos potenciais para mutações no gene *AIP*. Entretanto, o último sequenciamento realizado por NGS não funcionou para este gene.

Apesar de ser predita pelo Mutation Taster como um polimorfismo, esta variante c.203C>T/p.A68V;ht (ex2) é ausente nos principais bancos de frequência genômica anteriormente mencionados. Além disso, esta variante foi classificada como provavelmente patogênica aplicando critérios da ACMG. Isto ressalta a importância de uma análise mais detalhada do fenótipo desta paciente bem como a necessidade de estender a investigação dos familiares uma vez o achado de segregação da variante com outros familiares poderia comprovar esta patogenicidade.

Diante dos dados acima apresentados, ficou clara a necessidade de uma melhor otimização da “*long range PCR*”, principalmente para os genes que não apresentaram resultados satisfatórios. A partir disto e do fato do kit utilizado inicialmente ter sido descontinuado pelo fabricante, optamos por escolher um outro que atendesse melhor os

requisitos do projeto, que amplificasse bem fragmentos ricos em GC e tivesse uma boa reprodutibilidade, evitando repetições de reação.

Com o novo kit para “*long range PCR*” selecionado, os resultados de padronização foram satisfatórios para todos os genes (**Figuras 9 e 10**).

Figura 9. Foto de gel de agarose, evidenciando a amplificação de amostras do gene *AIP*.

Figura 10. Foto de gel de agarose, evidenciando a amplificação de amostras dos genes *MEN1*, *CDKN2B/p15*, *CDKN2C/p18*, *CDKN1A/p21*, *CDKN1B/p27*.

Uma vez padronizadas as PCRs Long Range, e obtidas amplificações de qualidade para todos os genes, as amostras que obtiveram baixo desempenho na primeira corrida foram novamente sequenciadas e, desta vez, obtiveram um desempenho satisfatório com boa cobertura para todos os genes (**Tabela 7**), juntamente com as repetições, outras amostras foram incluídas, gerando um total de 30 amostras sequenciadas. Posteriormente foram sequenciadas outras 46 amostras, novamente com boa cobertura (**Tabela 8**). Nesta corrida foi possível sequenciar todos os genes pretendidos e de 46 amostras, apenas 5 não funcionaram.

Tabela 7: Análise de qualidade da corrida 2 (*MEN1*, *CDKN2B/p15*, *CDKN2C/P18*; *CDKN1A/P21*, *CDKN1B/p27e AIP*)

	Reads mapeados na ref.(hg19) (%)	Reads mapeados no “target” (%)	Cobertura vertical Média (X)
Média	95,5	97,1	98,2
Desvio-padrão	6,1	7,2	34,7

Tabela 8: Análise de qualidade da corrida 3 (*MEN1*, *CDKN2B/p15*, *CDKN2C/P18*; *CDKN1A/P21*, *CDKN1B/p27e AIP*)

	Reads mapeados na ref.(hg19) (%)	Reads mapeados no “target” (%)	Cobertura vertical Média (X)
Média	94,2	96,5	99
Desvio-padrão	8,1	6,2	13,7

A prevalência de cada um dos tumores principais associados à *MEN1* no momento do diagnóstico dos 143 casos-índices foi: HPT, 97% (138/143); PET, 55% (79/143) e; PIT, 79% (113/143). A associação HPT/PIT (45%; 64/143) foi a mais prevalente seguida por HPT/PET/PIT (30%; 43/143), HPT/PET (22%; 31/143) e PET/PIT (3.5%; 5/143). Assim, nos 100 (70%; 100/143) casos-índices com 2 tumores principais, a frequência de diferentes associações de tumores era: HPT/PIT (64%; 64/100), HPT/PET (31%; 31/100), e PET/PIT (5%; 5/100).

A prevalência de tipos diferentes de PETs ao diagnóstico de *MEN1* foi: NF-PET (79/143; 55%), GAST-oma (30/143; 21%); insulinoma (INS-oma) (21/143; 15%) e tumores neuroendócrinos gástricos (GT) (8/143; 5,6%). A frequência de PETs diferentes ocorrendo sincronicamente foi: (52%; 41/79), sendo que GAST-oma/NF-PET (30%; 24/79) era o mais frequente seguido por INS-oma/NF-PET (19%;15/79) e GAST-oma/INS-oma/NF-PET (2,5%; 2/79).

Considerando PIT, prolactinoma foi mais frequente (55/143; 38.5%) seguido por adenoma de hipófise não funcionante (30/143; 21%), tumor secretor de hormônio de

crescimento (GH-oma) (17/143; 12%), secretor de cortisol (ACTH-oma) (6/143; 4%) e tumor cosecretor de GH e prolactina (4/143; 2.8%).

Considerando outros tumores associados à MEN1, a prevalência tanto ao diagnóstico de MEN1 como na evolução foi: tumores neuroendócrinos brônquicos (b-NET) (3/143; 2%), tumores neuroendócrinos típicos (t-NET) (4/143; 2.8%) e tumores adrenocorticais (ACT) (35/143; 24.5%), além de um caso com PET secretor de calcitonina.

Mutações germinativas foram identificadas em 87 casos-índices MEN1 (87/143; 61%): 51 por *MEN1* t-NGS/SS (58,6%), 2 por MLPA (2,3%) e 34 por SS (39,1%). Por tNGS/SS/MLPA, MEN1 familiar tinha taxa de detecção de mutação mais elevada do que casos esporádicos (88%, 35/40 vs. 51%; 52/103). In 61% (11/18) dos casos.

Ao todo, 87 casos-índices MEN1 foram definidos como sendo hereditários (35 familiar e 52 aparentemente esporádicos). Em contraste, havia 56 casos *MEN1* negativos (5 familiar e 51 esporádicos) por *MEN1*-NGS/SS e MLPA. Um painel multi-gene cobrindo todas as regiões codificadoras e não codificadoras de genes associados com MEN1 (*CDKN2B/p15*, *CDKN2C/p18*, *CDKN1A/p21*, *CDKN1B/p27* and *AIP*) foi conduzido em 39 casos (4, familiar; 35, esporádicos) deste último grupo. Nesta análise, nenhuma mutação foi encontrada tanto em regiões codificadoras como não codificadoras nestes 39 casos. Entretanto, havia três variantes excepcionalmente raras que foram encontradas no gene *CDKN1A/p21* que estavam somente em heterozigose, eram presentes no GnomAD em frequências menores que 0,001275% e eram ausentes no ABraOM. Estes casos com MEN1 esporádica apresentavam, respectivamente, a seguinte associação de tumores e variantes encontradas: 1. insulinoma/prolactinoma (g.5807A>G;Chr6:36650111A>G); 2. HPT/prolactinoma (c.DNA.1956G>A; g.10499G>A; Chr6:36654803G>A) e; 3. HPT/ gastrinoma malign (g.2507G>C; Chr636646811G>C). Além disso, nenhuma deleção foi identificada nos genes *AIP* e *CDKN1B* por MLPA nos 56 pacientes *MEN1* negativos.

Também, a variante encontrada na região 5'UTR do gene *MEN1* (g.691G>T; chr11:64578076C>A), localizada a 26 nucleotídeos distante da área de splice e ausente em bancos genômicos poderia ser eventualmente responsável pelo fenótipo em paciente com HPT normocalcêmico e prolactinoma.

Combinando resultados de NGS/SS e MLPA, a maioria das mutações era frameshift (36//87; 41%), seguido por variante em sítio de splice (21/87; 24%), missense

(13/87; 15%), nonsense (12/87; 14%), in-frame (3/87; 3%) e deleções grandes (2/87; 2%). Uma mutação *de novo* foi documentada em 8 casos-índices esporádicos (8/103; 8%).

Como esperado, história familiar positiva para MEN1 é um forte preditor de presença de mutação germinativa *MEN1* (88%, 45/50 vs. 51%; 52/103; $p < 0.05$).

Independentemente de história familiar, o perfil fenotípico dos 87 casos-índices com MEN1 (35, MEN1 familiar e; 52, MEN1 esporádico) apresentando uma mutação *MEN1* germinativa era diferente daquele observado em 56 casos-índices MEN1 sem mutação (5, MEN1 familiar e; 51, MEN1 esporádico) tanto pela idade mais jovem ao diagnóstico (37.3 ± 12 vs. 52.3 ± 13.5) como pela maior frequência de três ou mais tumores principais (46%, 40/87 vs. 5.4%, 3/56); malignidade relacionada à MEN1 (25/87, 29% vs. 5/56, 9%); presença de PET (66/87, 76% vs. 13/56, 23%); malignidade relacionada à PET (20/87, 23% vs. 5/56, 9%); PETs multifocais (62/66, 94% vs. 3/13, 23%); dois ou mais tipos diferentes de PETs (42/66, 64% vs. 0/13, 0%); idade ao diagnóstico de um dos tumores em idade jovem ($\leq 20y$) (13/87, 15% vs. 1/56, 1.8%) e doença paratireoide multiglandular (71/87, 82% vs. 16/36, 44%). A multiplicidade de órgãos acometidos por tumores relacionados à MEN1 era mais prevalente em casos *MEN1* positivos durante o seguimento clínico (3.9 ± 1.2 , vs. 2.2 ± 0.5).

Todos casos MEN1-negativos eram também negativos pela análise por MLPA(**Figura11**) . Deve-se considerar que 39 dos 52 pacientes desta análise eram fenocópias verdadeiras indicando que o perfil clínico destes casos é diferente daqueles com mutação. Isso é confirmado pela apresentação do perfil destas 39 fenocópias abaixo.

Os achados fenotípicos dos 39 casos MEN1 sem mutação germinativa detectada por painel multi-gene e por MLPA eram: idade ao diagnóstico ($53 \pm 12y$); predominância de mulheres (34:5) e de casos esporádicos (35/39; 90%); frequência e idade ao diagnóstico de HPT (37/39, 95%; $54 \pm 11y$), PIT (36/39; 92%; $47 \pm 14y$), PET (6/39, 15%; $48 \pm 15y$); associação HPT/PIT (32/39, 82%), HPT/PET (3/39, 8%), HPT/PET/PIT (2/39, 5%), PIT/PET (2/39, 5%); PET multifocal (2/39, 5%); diagnóstico de tumor $< 21y$ (1/39 2.6%); malignidade relacionada a PET (1/39 2.6%) e; ausência de casos com dois ou mais tipos de PTEs .

Figura 11: Exemplo de paciente com resultado MLPA negativo.

Considerando outros fenótipo avaliados por painel além dos 39 casos com MEN1 esporádica, temos: 2 casos com suspeita clínica de MEN1 pela associação de tumor adrenocortical e HPT e por associação entre tumor adrenocortical e PET; 3 casos com HPT em idade jovem; 6 casos com HPT esporádico por hiperplasia de paratireoide; 1 caso com HPT familiar isolado; 2 com HPT recorrente; 3 casos com gastrinoma, 3 com insulinoma em idade jovem; 1 glucagonoma; 1 com PET secretor de PTH-RP e 1 com insulinomatose. Nenhuma variante patogênica foi encontrada pelo painel multi-genes nestes pacientes.

7- Discussão

Até o presente, não existem estudos publicados aplicando painel multi-gene por t-NGS direcionados ao diagnóstico genético de MEN1 apesar de guidelines internacionais indicarem a análise sequencial de todos os genes MEN1-relacionados em casos se apresentando com este fenótipo. Da mesma forma, apesar de MLPA ser recomendado por estes mesmos guidelines internacionais para todos os pacientes com o fenótipo MEN1 sem mutação germinativa MEN1 detectada por Sanger, a ocorrência de frequências variáveis de deleções grandes encontradas (1-33%) e insuficiência de dados clínicos de predição de ocorrência de mutação limitam sua aplicabilidade na prática clínica.

Suportando um protocolo otimizado direcionado ao diagnóstico genético de pacientes com fenótipo MEN1 baseado em tNGS e MLPA, nós originalmente documentamos sua eficácia em revelar tanto mutações germinativas *MEN1* como investigar simultaneamente mutações em outros genes relacionados à MEN1 (CDKIs e *AIP*); seu papel em prever a ocorrência de mutações germinativas em casos familiares e esporádicos pela identificação de fatores de predição clínicos e; reforçar a ausência ou raridade extrema de variantes patogênicas ocorrendo nestes genes em áreas não codificadoras.

Mais recentemente, nosso grupo desenvolveu um protocolo de sequenciamento por NGS baseado em PCR long-range cobrindo regiões codificadoras e não codificadoras do gene *MEN1*. Este protocolo foi hábil em identificar mutações germinativas em 57 casos-índices de MEN1 e excluir mutações em outros 19 casos. Deleções grandes do gene *MEN1* foram identificadas em três deles. Assim, 16 pacientes *MEN1*-negativos verdadeiros foram reconhecidos. Preliminarmente, nove deles foram investigados para mutações ocorrendo em genes CDKIs e *AIP*, mas nenhuma mutação foi encontrada nestes casos.

No presente estudo, nós significativamente ampliamos esta análise pela investigação genética completa destes seis genes relacionados à MEN1 e por MLPA para três destes genes em uma casuística constituída por 39 pacientes (5 familiares e 34 esporádicos) com o fenótipo de MEN1 bem como em 23 pacientes com outros fenótipos relacionados à MEN1. Com esta estratégia, foi possível classificar estes pacientes como fenocópias verdadeiras uma vez que nenhuma mutação ou mesmo deleções grandes foram encontradas tanto em regiões codificadoras como não codificadoras de todos os seis genes conhecidos associados ao fenótipo MEN1.

Os achados clínicos destas 39 fenocópias verdadeiras são completamente diferentes daqueles associados com mutações germinativas no gene *MEN1* e similares ao grupo de 16 pacientes *MEN1*-negativos investigados somente por Sanger e MLPA sugerindo que este último grupo será potencialmente incluído como fenocópia verdadeira quando análise genética completa dos outros genes forem futuramente realizadas.

Fenocópias verdadeiras foram representadas por pacientes mais velhos, predominantemente constituídos por mulheres, a associação HPT/PIT foi amplamente mais frequente, com prevalências muito baixas de PETs e de tumores malignos, ocorrência rara de novos tumores e predominância de doença paratireoide uniglandular. Mais estudos são necessários para esclarecer as possíveis etiologias de fenocópias verdadeiras identificadas neste estudo.

Na maioria dos casos, não havia nenhuma variante potencialmente patogênica para explicar o fenótipo *MEN1* indicando que a ausência de mutações em regiões não codificadoras de *MEN1*, *CDKIs* e *AIP* parecem ser a regra. Entretanto, três variantes com potencial patogênico foram reconhecidas ocorrendo em região UTR ou intrônica. Uma análise estendida da genealogia, história familiar e rastreamento clínico dos membros da família podem eventualmente elucidar alguns casos, especialmente aqueles com história familiar insuficiente.

Como estratégia adicional para elucidação etiológica, estas fenocópias podem ser candidatas à análise por exoma/genoma com o objetivo de investigar novos genes causadores de fenótipo *MEN1*. Mais recentemente, mosaicismos germinativos pós-zigóticos ocorrendo no gene *MEN1* explicou a etiologia de tumores em uma família com fenótipo *MEN1*. Isto não pode ser excluído pela nossa análise genética.

Mais provavelmente, a causa principal destas fenocópias seria a associação casual e fortuita de tumores associados ao fenótipo *MEN1* ocorrendo esporadicamente e se

originando de etiologias diferentes. É possível que a identificação da etiologia destas fenocópias poderá aperfeiçoar o aconselhamento genético e otimizar o manejo clínico destes pacientes.

Nesta linha, a identificação de fenocópias verdadeiras permitiu que explorássemos fatores preditores clínicos para detecção de mutação em casos-índices MEN1. De fato, nós reforçamos dados prévios recentemente publicados indicando que casos *MEN1*-negativos (fenocópias) são mais velhos do que casos *MEN1*-positivos, apresentam risco mais baixo de um novo tumor, tem frequência mais elevada de tumores hipofisários e maior sobrevida. Também, confirmamos originalmente estes dados aplicando uma análise genética completa e estendida por tNGS provando que estes pacientes MEN1-negativos representam fenocópias verdadeiras. Adicionalmente, outros fatores preditivos foram associados com a presença de mutação MEN1 como o desenvolvimento de tumores em idade jovem, ocorrência de PETs multifocais ou doença paratireoide multiglandular e risco mais elevado de tumores malignos além de presença mais elevada de envolvimento tumoral de múltiplos órgãos. Alguns preditores isolados como a presença de PET multifocal em casos com diagnóstico clínico de MEN1 ou associações de dois ou mais fatores preditivos indicou um risco potencialmente elevado de detecção de mutações *MEN1* variando de 80 até 100%.

Novamente, o conhecimento de cada um destes preditores clínicos pode estimar a probabilidade de detecção de mutação nestes casos-índices durante a avaliação clínica precedente ao teste genético. É possível que a expectativa pela liberação de teste genético seja minimizada pela aplicação de preditores clínicos durante esta avaliação inicial com potencial de prever resultado genético provável levando a uma redução da ansiedade frequentemente observada em pacientes e familiares sob risco enquanto eles aguardam pelos resultados dos testes genéticos.

8- Considerações finais

Nós, originalmente, desenvolvemos um painel constituído pelos seis genes conhecidos como responsáveis pelo fenótipo MEN1 que se mostrou eficiente no rastreio e identificação de variantes patogênicas e não patogênicas ao longo de toda a extensão destes genes simultaneamente. Assim, regiões codificadores (exons), fronteiras intron-exon, regiões não traduzidas UTR e intrônicas profundas de todos estes genes foram lidas com qualidade. Em paralelo, este painel possibilitou a análise genética de diferentes fenótipos associados à MEN1. Adicionalmente, o MLPA conduzido para todos casos *MEN1*-negativos e permitiu a identificação de deleções grosseiras sustentando uma avaliação genética completa. Nosso protocolo baseado em painel por sequenciamento paralelo em larga escala e MLPA permitiu a identificação de fenocópias verdadeiras fortalecendo a análise comparativa destes casos MEN1-negativos verdadeiros com casos portadores de mutação. Com isto, um espectro clínico completamente diferente foi revelado nestes grupos possibilitando identificação de diversos fatores clínicos preditores de detecção de mutação como: história familiar, associação de tumores, presença de PET, PET multifocal, tumor diagnosticado em idade jovem, doença paratireoide multiglandular, acometimento tumoral de múltiplos órgãos e malignidade. A presença de um destes fatores ou a associação de dois ou mais deles resultou em risco superiores a 80% e até 100% de probabilidade para detecção de mutação. É possível que o conhecimento e aplicação destes fatores preditores possa aperfeiçoar o aconselhamento genético de pacientes e de familiares com risco de MEN1

Referências Bibliográficas

1. Toledo R de A, Lourenço Junior DM, Toledo SP de A. Neoplasias endócrinas múltiplas. In: Clínica médica: doenças endócrinas e metabólicas, doenças ósseas, doenças reumatológicas. Manole; 2009.
2. Samuel A. Wells J. CONSENSUS: Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;86(12):5658–71.
3. Agarwal SK, Kester MB, Debelenko L V, Heppner C, Emmert-buck MR, Skarulis MC, et al. Germline mutations of the MEN1 gene in familial multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. 1997;6(7):1169–75.
4. Lips C, Dreijerink K, Höppener J. Variable clinical expression in patients with a germline MEN1 disease gene mutation: clues to a genotype–phenotype correlation. *Clinics.* 2012;67(S1):49–56.
5. Falchetti A. Genetics of multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome: what’s new and what’s old. *F1000Research.* 2017;6:73.
6. Thakker R V., Newey PJ, Walls G V., Bilezikian J, Dralle H, Ebeling PR, et al. Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(9):2990–3011.
7. Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(5):367–75.
8. Lemmens I, Van De Ven Wim JM, Kas K, Zhang CX, Giraud S, Wautot V, et al. Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. *Hum Mol Genet.* 1997;6(7):1177–83.
9. Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi S-E, Collins FS, Emmert-Buck MR, et al. Positional Cloning of the Gene for Multiple Endocrine Neoplasia-Type 1. *Science* (80-) [Internet]. 1997;276(5311):404–7. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/276/5311/404>
10. Lemos MC, Thakker R V. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): Analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat.* 2008;29(1):22–32.
11. Concolino P, Costella A, Capoluongo E. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): An update of 208 new germline variants reported in the last nine years. *Cancer Genet* [Internet]. 2016;209(1–2):36–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergen.2015.12.002>
12. Raef H, Zou M, Baitei EY, Al-Rijjal RA, Kaya N, Al-Hamed M, et al. A novel deletion of the MEN1 gene in a large family of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) with aggressive phenotype. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011;75(6):791–800.
13. Owens M, Ellard S, Vaidya B. Analysis of gross deletions in the MEN1 gene in

- patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;68(3):350–4.
14. Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Hofler H, et al. Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;
 15. Pellegata N. MENX and MEN4. *Clinics*. 2012;
 16. Tonelli F, Giudici F, Giusti F, Marini F, Cianferotti L, Nesi G, et al. A heterozygous frameshift mutation in exon 1 of cdkn1B gene in a patient affected by MEN4 syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2014;171(2).
 17. Karnik SK, Hughes CM, Gu X, Rozenblatt-Rosen O, McLean GW, Xiong Y, et al. Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2005;102(41):14659–64. Available from: <https://www.pnas.org/content/102/41/14659>
 18. Fontanière S, Casse H, Bertolino P, Zhang CX. Analysis of p27Kip1 Expression in Insulinomas Developed in Pancreatic β -cell Specific Men1 Mutant Mice. *Fam Cancer [Internet]*. 2006 Mar;5(1):49–54. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10689-005-2575-3>
 19. Belar O, De La Hoz C, Pérez-Nanclares G, Castaño L, Gaztambide Saénz S, Moreno A, et al. Novel mutations in MEN1, CDKN1B and AIP genes in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(5):719–24.
 20. Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ciccarelli A, Valdes-Socin H, Rohmer V, Tamburrano G, et al. Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3316–23.
 21. Costa-Guda J, Marinoni I, Molatore S, Pellegata NS, Arnold A. Somatic mutation and germline sequence abnormalities in CDKN1B, encoding p27Kip1, in sporadic parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(4):701–6.
 22. Costa-Guda J, Soong CP, Parekh VI, Agarwal SK, Arnold A. Germline and Somatic Mutations in Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Genes CDKN1A, CDKN2B, and CDKN2C in Sporadic Parathyroid Adenomas. *Horm Cancer*. 2013;4(5):301–7.
 23. Geerdink EAM, Van der Luijt RB, Lips CJM. Do patients with multiple endocrine neoplasia syndrome type 1 benefit from periodical screening? *Eur J Endocrinol*. 2003;149(6):577–82.
 24. Bassett JHD, Forbes SA, Pannett AAJ, Lloyd SE, Christie PT, Wooding C, et al. Characterization of Mutations in Patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Am J Hum Genet*. 2002;62(2):232–44.
 25. Lourenço-Jr DM, Toledo RA, Coutinho FL, Margarido LC, Siqueira SAC, Santos MACG d, et al. The impact of clinical and genetic screenings on the management of the multiple endocrine neoplasia type 1. *Clinics*. 2007;62(4):465–70.
 26. Sanger F, Coulson AR. A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441–8.
 27. Margraf RL, Durtschi JD, Stephens JE, Perez M, Voelkerding K V. Determination

- of RET sequence variation in an MEN2 unaffected cohort using multiple-sample pooling and next-generation sequencing. *J Thyroid Res.* 2012;2012.
28. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *Role Bioinforma Agric.* 2014;2012:1–25.
 29. Endocrinologia P De. Avaliação do método de sequenciamento de nova geração no diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1. 2016;
 30. Carvalho RA, Urtremari B, Jorge AAL, Santana LS, Quedas EPS, Sekiya T, et al. Germline mutation landscape of multiple endocrine neoplasia type 1 using full gene next-generation sequencing. *Eur J Endocrinol.* 2018 Dec;179(6):391–407.
 31. Stratakis CA, Tichomirowa MA, Boikos S, Azevedo MF, Lodish M, Martari M, et al. The role of germline AIP, MEN1, PRKAR1A, CDKN1B and CDKN2C mutations in causing pituitary adenomas in a large cohort of children, adolescents, and patients with genetic syndromes. *Clin Genet.* 2010;78(5):457–63.
 32. Salenave S, Ancelle D, Bahougne T, Raverot G, Kamenický P, Bouligand J, et al. Macroprolactinomas in children and adolescents: Factors associated with the response to treatment in 77 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(3):1177–86.
 33. de Laat JM, van der Luijt RB, Pieterman CRC, Oostveen MP, Hermus AR, Dekkers OM, et al. MEN1 redefined, a clinical comparison of mutation-positive and mutation-negative patients. *BMC Med [Internet].* 2016;14(1):182. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0708-1>
 34. Laat JM De, Leeuwaarde RS Van, Valk GD. The Importance of an Early and Accurate MEN1 Diagnosis. 2018;9(September):1–8.
 35. Ellard S, Hattersley AT, Brewer CM, Vaidya B. Detection of an MEN1 gene mutation depends on clinical features and supports current referral criteria for diagnostic molecular genetic testing. *Clin Endocrinol (Oxf) [Internet].* 2005;62(2):169–75. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2265.2005.02190.x>

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO
PACIENTE:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M () F ()
DATA DE NASCIMENTO:...../...../.....
ENDEREÇO:..... Nº:.....
APTO:..... BAIRRO:.....
CIDADE:.....
CEP: -..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NOME:.....
....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M () F ()
DATA DE NASCIMENTO:...../...../.....
ENDEREÇO: Nº:.....
APTO:..... BAIRRO: CIDADE:.....
CEP: -..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** “Impacto clínico da aplicação de um painel de diagnóstico genético baseado em sequenciamento de nova geração nos diferentes fenótipos sob risco potencial de neoplasia endócrina múltipla tipo 1”.

PESQUISADOR: Delmar Muniz Lourenço Junior

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente HCFMUSP **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL** Nº: 90206 – Conselho Regional de Medicina.

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Investigação Médica (LIM) 25 – Unidade de Endocrinologia Genética (UEG). Faculdade de Medicina da USP – FMUSP – Av. Dr. Arnaldo, 455 – 5º andar

2. **DURAÇÃO DA PESQUISA:** 36 meses

1. Desenho do estudo e objetivos:

Você está sendo convidado para participar de um trabalho que tem o objetivo de testar a eficiência de uma técnica nova e mais barata para investigar se você tem ou não uma doença chamada Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (MEN1). É importante descobrir se você tem ou não essa doença porque ela pode ser passada de pais para filhos. Para isso é preciso analisar em seu DNA o gene chamado *MEN1* e outros genes que também podem causar esta doença. A avaliação de seu DNA é geralmente realizada por técnicas complexas e caras e, por isso, poucas pessoas podem fazer o exame. O nosso objetivo é testar outra técnica mais moderna e barata chamada de sequenciamento de nova geração. No futuro, com esta nova técnica, este exame poderá ser feito em um número maior de pessoas que possam ter a doença.

2. Descrição dos procedimentos que serão realizados com seus propósitos.

Para analisar o seu DNA, vamos coletar seu sangue de uma veia de seu antebraço, por uma punção simples (com agulha). Isto será feito no Hospital das Clínicas e seu material (sangue) será enviado ao laboratório da Unidade de Endocrinologia Genética (UEG) no Laboratório de Investigação Médica (LIM) 25, na Faculdade de Medicina da USP para que seja realizado o exame utilizando

a técnica antiga e a nova. O problema é que DNA guardado pode estragar com tempo. Se isso acontecer, pediremos à você para repetir a coleta de sangue. Também, seu prontuário médico e os resultados de outros exames serão revistos por nós. Os resultados da análise do seu material estarão disponíveis para você a qualquer momento.

3. Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados

O único processo direto que realizaremos em você será a retirada de sangue de uma veia de seu antebraço utilizando uma agulha.

4. Riscos e desconfortos esperados

Durante a coleta de sangue, você poderá sentir um pequeno desconforto (como uma picada). Após a coleta, poderá aparecer no local da picada uma mancha roxa, inchaço ou, em casos raros, infecção.

5. Benefícios ao participante

A análise do seu DNA permitirá ver se você tem a doença ou não. É importante você e o seu médico saberem porque esta informação poderá mudar as orientações e os exames periódicos a serem pedidos pelo seu médico. Além disto, se você tiver esta doença, outros tumores relacionados a ela poderão ser diagnosticados e tratados mais cedo. Por outro lado, se você não tiver esta doença, será beneficiada da informação que não tem riscos maiores do que o normal de desenvolver outros tumores que acontecem nesta doença te liberando da necessidade de ficar fazendo exames periódicos para investigar estes tumores. Este estudo fará, também, com que mais pessoas possam ser beneficiadas pelo estudo genético em MEN1, como seus familiares que saberão se precisam fazer os mesmos exames que você ou não e se tem risco ou não de passar a doença para os filhos.

6. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não Há.

7. Garantia de acesso

Você terá acesso, a qualquer momento, a todas as informações deste termo, assim como procedimentos, riscos e benefícios relacionados a pesquisa ou a qualquer esclarecimento de dúvidas que você possa ter. O pesquisador responsável é o Dr. Delmar Muniz Lourenço Junior, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Arnaldo 455 - CEP 01246-903 - Cerqueira César - São Paulo - SP, no LIM 25 - 5º andar ou pelo telefone (11) 3061-7252. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar Tel: 2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

8. É garantido que a qualquer momento você pode cancelar seu consentimento livre e esclarecido para participar deste estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo a continuidade do seu atendimento médico na instituição.

9. Direito de se manter anônimo (direito de confidencialidade)

Para este estudo, sua identidade será confidencial, para qualquer tipo de publicação dos resultados. Toda informação obtida como resultado desta pesquisa (dados de pesquisa) será mantido confidencial até onde a lei exigir. Contudo, os dados desta pesquisa assim como os dados médicos (caso haja algum importante para o estudo) podem ser revistos por agências do governo (por exemplo, Secretaria da Saúde e Ministério da Saúde), pela agências ou companhia financiadora desta pesquisa, por pessoas envolvidas na pesquisa ou autorizadas a monitorar ou auditar, pelos comitês de ética (comitê que avalia todas as pesquisas em seres humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), se exigida por leis ou regulamentos.

10. Você tem o direito de ser mantido atualizado e ser informado sobre os resultados da pesquisa, se assim desejar.

11. Despesas e compensações

Não existem despesas pessoais ao participante em qualquer fase do estudo, incluindo consultas e coletas de material. Não haverá compensação financeira por participação neste estudo nem por qualquer resultado obtido. Não haverá indenização por qualquer eventual problema que ocorra.

12. Armazenamento do seu material e utilização do seu material para outras pesquisas

O seu DNA poderá ser armazenado por até 10 (dez) anos, se você permitir e se for autorizado pela CAPPesq. Assim, seu material poderá ser utilizado em estudos futuros ajudando em novas descobertas sobre sua doença. Além disto, quanto mais material tivermos, mais fortes serão as conclusões que podemos chegar. Se você autorizar, sua amostra será guardada em um lugar chamado biorrepositório junto ao laboratório de investigação médica-25 (LIM-25) da faculdade de Medicina da USP. Sabendo disto, você pode responder as perguntas abaixo.

Você autoriza o armazenamento de seu DNA para uso em pesquisas futuras? SIM (☐)
NÃO (☐)

Existe necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(☐) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.
(☐) NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

13. Consentimento pós-esclarecido

Acredito e confirmo que fui suficientemente informado a respeito das informações que li, ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo e pude discutir minhas dúvidas com Dr. Delmar Muniz Lourenço Jr. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a pesquisa, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste serviço. Entendi e estou de pleno acordo com as informações acima explicitadas e em total exercício dos meus direitos, autorizo a coleta de sangue e o envio das amostras para a equipe do LIM 25 – UEG – FMUSP sob responsabilidade do Dr. Delmar Muniz Lourenço Jr. para a realização do trabalho. Após a obtenção dos resultados da análise do meu DNA, autorizo que os resultados gerados sejam incluídos e publicados nesse projeto de pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do paciente ou responsável legal

Data: ____/____/____

Assinatura de testemunha (para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Data: ____/____/____

Somente ao responsável do projeto: Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para participação neste estudo.

Assinatura do pesquisador responsável pela obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido por forma voluntária e apropriada (carimbo ou nome legível)

Data: ____/____/____