

Letícia Ferreira Gontijo Silveira

**ESTUDO DO GENE HRPT2 NA SÍNDROME DE
HIPERPARATIREOIDISMO ASSOCIADO A TUMOR
DE MANDÍBULA E NO HIPERPARATIREOIDISMO
FAMILIAR ISOLADO**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Letícia Ferreira Gontijo Silveira

**ESTUDO DO GENE HRPT2 NA SÍNDROME DE
HIPERPARATIREOIDISMO ASSOCIADO A TUMOR
DE MANDÍBULA E NO HIPERPARATIREOIDISMO
FAMILIAR ISOLADO**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Luiz Armando De Marco

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2005

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25,dihidroxi vitamina D ₃
25(OH)D ₃	25-hidroxivitamina D ₃
AP1	Proteína ativadora 1
APP	Proteína precursora do amilóide B
CaSR	Sensor de cálcio extracelular
CDH1	E-caderina
CRVM	Cirurgia de revascularização miocárdica
cM	CentiMorgan
cDNA	DNA complementar
ddNTP	Didesoxi-nucleotídeo trifosfato
dATP	Desoxi-adenosina trifosfato
dCTP	Desoxi-citosina trifosfato
Del	Deleção
dGTP	Desoxi-guanosina trifosfato
dNTP	Desoxi-nucleotídeo trifosfato
dTTP	Desoxi-tirosina trifosfato
DNA	Ácido desoxireibonucleico
DNAr	DNA ribossômico
dsDNA	DNA de fita dupla
EDTA	Ácido tetra etileno diamino
ER	Retículo endoplasmático

g	Gravidade
H1F2	Histona 1 family member 2
H3	Histona 3
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HFF	Hipercalcemia hipocalciúrica familiar
HPFI	Hiperparatireoidismo familiar isolado
HPT-JT	Hiperparatireoidismo associado a tumor de maxila ou mandíbula
IAM	Infarto agudo do miocárdio
Ins	Inserção
Ins(1,4,5) P_3	Inositol (1,4,5)-trifosfato;
IRC	insuficiência renal crônica
Kb	Kilobase
LOH	Loss of heterozigosity
Mb	megabase
MEN1	Neoplasias endócrinas múltiplas tipo 1
MEN2	Neoplasias endócrinas múltiplas tipo 2
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NFκB	Fator nuclear kappa B
Paf1	Peroxisome assembly factor-1
pb	Pares de base
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio

<i>PRAD1</i>	parathyroid adenomatosis 1
PTH	Paratormônio
PKC	Proteína kinase C
PLC	Fosfolipase C
RNA	Ácido ribonucleico
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borato-EDTA
TE	TRIS-EDTA
Tris	Tris-hidroximetil-etilenodiamino
TSR	Template Supression Reagent
VDR	receptor de vitamina D

CÓDIGOS PARA NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

Nucleotídeos

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

Aminoácidos

A	Alanina	C	Cisteína
D	Ácido Aspártico	E	Ácido Glutâmico
F	Fenilalanina	G	Glicina
H	Histidina	I	Isoleucina
K	Lisina	L	Leucina
M	Metionina	N	Asparigina
P	Prolina	Q	Glutamina
R	Arginina	S	Serina
T	Treonina	V	Valina
W	Triptofano	Y	Tirosina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Achados típicos de carcinoma de paratireóide e hiperparatireoidismo primário benigno.....	6
Tabela 2: Protocolo de coloração pela prata do gel de poliacrilamida.....	45
Tabela 3: Componentes utilizados para a reação de sequenciamento e suas quantidades.....	47
Tabela 4: Características dos membros afetados da família com HPFI.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de regulação da homeostase do cálcio.....	4
Figura 2 Representação esquemática do gene <i>HRPT2</i> e mutações patológicas descritas até o momento.....	21
Figura 3: Heredograma da família com HPT-JT.....	28
Figura 4: Heredograma da família portadora de hiperparatireoidismo primário isolado.....	30
Figura 5: Raio X região maxilar: tumor de partes moles, bem delimitado, em região maxilar direita.....	52
Figura 6: Produtos de PCR mostrando a amplificação dos 17 exons do gene <i>HRPT2</i> . Acima de cada canaleta encontra-se o número do exon amplificado.....	55
Figura 7: Cromatograma mostrando a deleção de uma adenina e uma guanina no exon 7 do gene <i>HRPT2</i> em heterozigose, no probando (II:3, figura 3), portador de HPT-JT.....	56
Figura 8: Cromatograma do seqüenciamento do exon 1 do gene <i>HRPT2</i> mostrando em substituição de uma guanina por uma adenina (TGG→TGA) no DNA tumoral do paciente III:4 , com HPFI (A) e a mesma mutação em heterozigose no DNA genômico (B).....	57
Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, mostrando os produtos da digestão do exon 1 do gene <i>HRPT2</i> pela enzima HaeIII.	58

RESUMO

A Síndrome de hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula ou maxila (HPT-JT) é uma doença rara, herdada como traço autossômico dominante. A síndrome é caracterizada por hiperparatireoidismo associado a tumores fibro-ósseos de mandíbula ou maxila, com penetrância variável. Alguns pacientes podem apresentar alterações renais como tumor de Wilms, hamartomas ou rim policístico. O *HRPT2* (1q25-q31) é um gene candidato a supressor de tumor, que codifica a proteína parafibromina de função ainda desconhecida. Mutações no gene *HRPT2* foram associadas à síndrome de HPT-JT e também foram descritas em casos de carcinoma de paratireóide e de hiperparatireoidismo familiar isolado (HPFI). Esse trabalho teve com objetivo investigar o gene *HRPT2* em um caso de HPT-JT e em uma família portadora de HPFI. Os 17 exons do gene *HRPT2* foram amplificados por PCR, com a utilização de pares de *primers* específicos, a partir de DNA genômico, isolado do sangue periférico, e DNA tumoral, extraído de adenomas de paratireóide de um paciente do sexo masculino, portador adenoma de paratireóide recidivado, apresentando também lesão tumoral na região maxilar e de membros afetados de uma família com 9 casos de hiperparatireoidismo, sem outras endocrinopatias associadas. Os produtos de PCR foram purificados e seqüenciados em um seqüenciador automático. No caso de HPT-JT, foi encontrada uma mutação germinativa em heterozigose (679delAG) no exon 7 levando a uma mudança na janela de leitura,. Na família portadora de HPFI, encontramos uma mutação nonsense no exon 1 (96 G>A), em heterozigose no DNA genômico e em homozigose no DNA tumoral, corroborando o papel do *HRPT2* como gene supressor tumoral. As mutações descritas nesse trabalho fortalecem a associação desse gene com a síndrome de HPT-JT e o seu papel na patogênese dessa doença e reforçam a hipótese de que o HPFI, em pelo menos parte dos casos, pode ser considerada uma variante alélica do HPT-JT.

ABSTRACT

Hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome (HPT-JT) is a rare disease, inherited as an autosomal dominant trait and characterized by hyperparathyroidism associated to fibro-osseous lesions of the mandible and maxilla, and renal cysts tumors, with variable penetrance. *HRPT2* (1q25-q31) is a presumed tumor suppressor gene, which encodes the protein parafibromin, with unknown function. *HRPT2* mutations were associated to the HPT-JT syndrome and also described in cases of parathyroid carcinoma and familial isolated hyperparathyroidism (FIHP). The aim of this study was to investigate the *HRPT2* gene in an isolated case of HPT-JT and in a family with FIHP. The 17 exons of the gene were amplified by PCR, using specific primers pairs, from genomic and tumoral DNA, extracted from peripheral leucocytes and parathyroid adenomas respectively, from a patient presenting recurrent parathyroid adenomas and a maxilla tumor and from affected members of a family with 9 confirmed cases of hyperparathyroidism, without other associated endocrinopathies. PCR products were purified and automatic sequenced. In the HPT-JT patient, we found a germinative heterozygote mutation in exon 7 (679delAG), leading to a frameshift. In the FIHP family a nonsense mutation was found in exon 1 (96 G>A), which was heterozygous in genomic DNA and homozygous in tumoral DNA, supporting the role of *HRPT2* as a tumor suppressor gene. The mutations described in this study strenght the association of this gene with HPT-JT syndrome and reinforce the hypothesis of FIHP as na allelic variant of HPT-JT at least in a subset of the families.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Hiperparatireoidismo primário.....	3
1.1.1 Homeostase do cálcio extracelular.....	3
1.1.2 Apresentação clínica.....	5
1.1.3 Alterações moleculares no hiperparatireoidismo primário.....	6
1.2 Síndromes hereditárias associadas ao hiperparatireoidismo.....	9
1.2.1 Neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (MEN1)	10
1.2.2 Neoplasia endócrina múltipla tipo 2A (MEN2A).....	12
1.2.3 Hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula ou maxila (HPT-JT).....	13
1.2.3.1 Histopatologia.....	14
1.2.3.2 Gene HRPT2.....	16
1.2.3.3 Proteína Parafibromina.....	17
1.2.3.4 Mutações no gene HRPT2.....	18
1.2.4 Hiperparatireoidismo familiar isolado (HPFI).....	22
2. Objetivo.....	24
3. Material e métodos.....	26
3.1 Pacientes.....	27
3.1.1 HPT-JT.....	27
3.1.2 HPFI.....	29
3.2 Amostras de sangue e tumor.....	37

3.3	Extração do DNA.....	38
3.3.1	Extração do DNA de leucócitos periféricos (genômico).....	38
3.3.1.1	Separação de leucócitos do sangue total.....	38
3.3.1.2	Extração do DNA.....	39
3.3.2	Extração do DNA de tecidos tumorais a fresco.....	40
3.4	Quantificação do DNA.....	40
3.4.1	Avaliação da pureza do DNA extraído.....	41
3.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	41
3.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	43
3.7	Coloração pela prata.....	44
3.8	Purificação dos produtos de PCR.....	46
3.9	Sequenciamento automático.....	46
3.10	Análise de restrição..... produtos de PCR mostrando a amplificação dos 17 exons do gene <i>HRPT2</i> . Acima de cada canaleta encontra-se o número do exon amplificado.	49
4.	Resultados.....	50
4.1.	Casuística.....	51
4.1.1.	HPT-JT.....	51
4.1.2.	HPFL.....	52
4.2.	Estudo do gene <i>HRPT2</i>	54
4.2.1.	HPT-JT.....	55
4.2.2.	HPFL.....	57
4.2.2.1.	Análise de restrição no exon 1 do gene <i>HRPT2</i>	58
5.	Discussão.....	59

5.1. HPT-JT.....	60
5.2. HPFI.....	63
5.3. Considerações finais.....	66
6. Conclusões.....	68
7. Referências bibliográficas.....	70
8. Anexos.....	83
ANEXO A - Mutações previamente identificadas no gene <i>HRPT2</i>	84
ANEXO B: Exames laboratoriais do paciente portador de HPT-JT (II:3, fig 3).....	86
ANEXO C: Exames laboratoriais dos familiares do paciente com hiperparatireoidismo e tumor de mandíbula	88
ANEXO D: Exames laboratoriais da paciente II:12 (HPFI).....	89
ANEXO E: Exames laboratoriais da paciente II:15 (HPFI).....	91
ANEXO F: Exames laboratoriais da paciente II:10 (HPFI).....	92
ANEXO G: Exames laboratoriais da paciente II:14 (HPFI).....	94
ANEXO H: Exames laboratoriais do paciente II:6 (HPFI).....	95
ANEXO I: Exames laboratoriais do paciente II:3 (HPFI).....	96
ANEXO J: Exames laboratoriais do paciente III:4 (HPFI).....	97
ANEXO K: Exames laboratoriais do paciente II:2 (HPFI).....	99
ANEXO L: Exames laboratoriais do paciente III:6 (HPFI).....	100
ANEXO M: Exames laboratoriais da paciente I:1 (HPFI).....	101
ANEXO N: Soluções utilizadas para extração de DNA a partir de sangue periférico....	102
ANEXO O: Iniciadores e condições de PCR utilizados na amplificação dos 17 exons do gene <i>HRPT2</i>	103
ANEXO P: Soluções utilizadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	104
ANEXO Q: Soluções utilizadas para Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)..	105

ANEXO S: Soluções utilizadas para a reação de Sequenciamento.....	107
ANEXO T: Equipamentos utilizados.....	108
ANEXO U: Seqüência do gene HRPT2 e da proteína parafibromina.....	109

1- INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O hiperparatireoidismo primário é a causa mais comum de hipercalcemia, com uma prevalência de 1 a 2 para cada 1000 indivíduos, ocorrendo em cerca de 0,2% das mulheres e 0,1% dos homens acima dos 60 anos. A grande maioria dos casos é esporádica, sendo que 80 a 85% se apresentam como um adenoma único de paratireóide, 10 a 15% como hiperplasia das quatro glândulas e menos de 1% dos casos são causados por carcinoma das paratireóides (Marx, 2000).

As formas familiares são responsáveis por cerca de 10% dos casos de hiperparatireoidismo primário e geralmente se apresentam no contexto de síndromes hereditárias como as neoplasias endócrinas múltiplas tipo 1 ou 2 (MEN1 e MEN2, respectivamente), o hiperparatireoidismo associado ao tumor de maxila ou mandíbula (HPT-JT), hipercalcemia hipocalciúrica familiar benigna (HFF) e do hiperparatireoidismo familiar isolado (HPFI) sem outras manifestações endócrinas (Marx, 2000).

Recentemente, a associação entre o gene *HRPT2* e o HPT-JT e também o HPFI, síndromes raras, relativamente heterogêneas, com características clínicas, fisiopatológicas e histórias naturais ainda não completamente conhecidas, foi descrita (Szabó *et al.*, 1995; Carpten *et al.*, 2002). Nesse trabalho investigaremos o envolvimento do *HRPT2* na patogênese de um caso esporádico de HPT-JT e uma família portadora de HPFI.

1.1 HIPERPARATIREOIDISMO PRIMÁRIO

1.1.1 Homeostase do cálcio extracelular

O PTH é um hormônio polipeptídico de 84 aminoácidos com peso molecular de 9300 kilodaltons, produzido pelas células principais das paratireóides. Após a sua síntese, o PTH é armazenado em grânulos citoplasmáticos e secretado sobretudo em resposta à queda na concentração plasmática de cálcio iônico, constituindo o principal responsável pela homeostase do cálcio extracelular. A síntese e secreção de PTH são inibidas pela hipercalcemia, hipofosfatemia e pela vitamina D3.

O cálcio iônico plasmático é o principal regulador da produção do PTH, agindo através do sensor de cálcio extracelular (CaSR) (figura 1), um membro da família dos receptores acoplados à proteína G (Garrett *et al.*, 1995). O cálcio iônico extracelular se liga ao domínio N-terminal do receptor levando à geração de inositol trifosfato, que resulta na liberação de cálcio dos estoques intracelulares e influxo de cálcio extracelular através da abertura de canais iônicos na membrana citoplasmática. O aumento da concentração de cálcio intracelular inibe a secreção e a transcrição do gene do PTH. A vitamina D3 também age como um importante regulador negativo da síntese e secreção do PTH, através de sua ligação ao receptor de vitamina D (VDR) nas células principais da paratireóide.

Os efeitos do PTH no metabolismo mineral são mediados através da sua ligação ao receptor de PTH tipo 1 nos ossos e rim. O estímulo do PTH leva a um aumento na reabsorção óssea e renal de cálcio, ativação da 1α -hidroxilase no rim, com conseqüente aumento na produção de vitamina D3 ativa ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) que, por sua vez, aumenta a absorção intestinal de cálcio e fósforo. O resultado final é a liberação de cálcio e fósforo inorgânico na corrente sanguínea (figura 1).

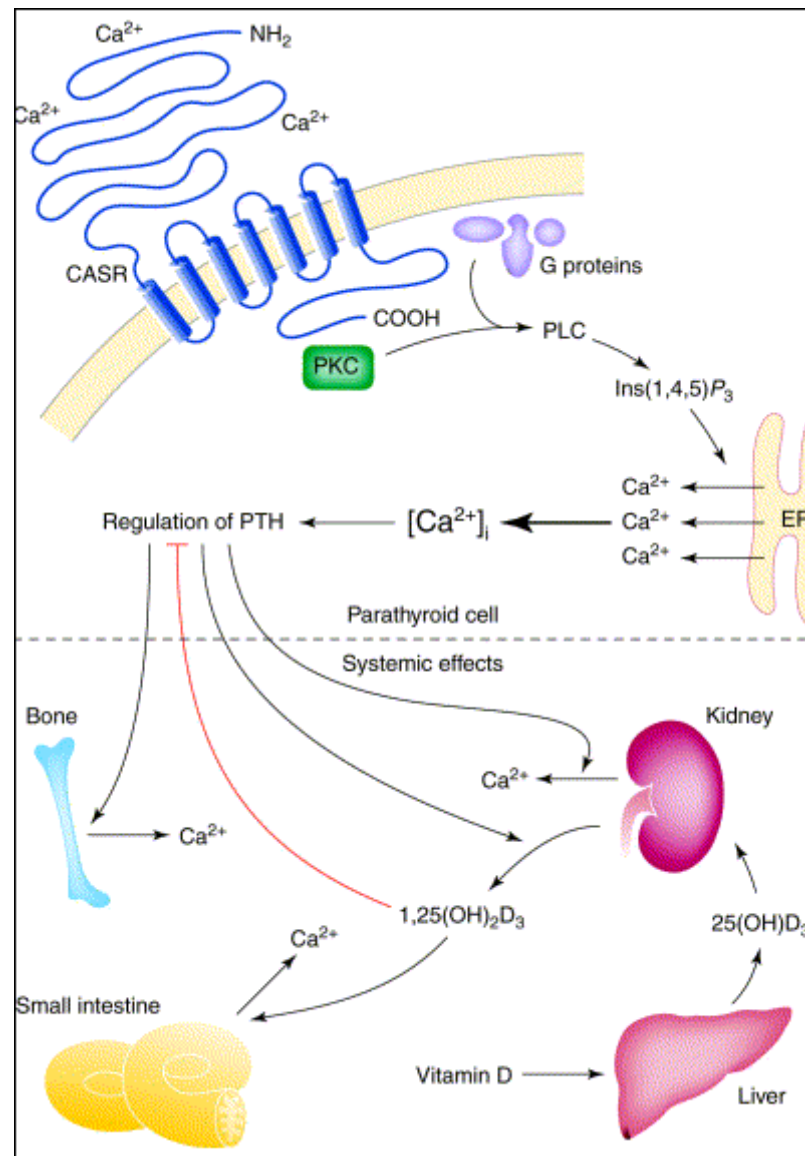


Figura 1: Mecanismos de regulação da homeostase do cálcio O CaSR, localizado na superfície das células paratireoideanas principais, é ativado pelo Ca^{++} extracelular, levando a ativação da PLC e aumento os níveis de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, por sua vez, aumenta a concentração de Ca^{++} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que inibe a secreção de PTH na corrente sanguínea por mecanismos pós-transcricionais. Em resposta à hipocalcemia, PTH aumenta os níveis de Ca^{++} sérico, através de aumento na reabsorção óssea e renal de Ca^{++} . O hormônio precursor da vitamina D sofre uma hidroxilação inicial à 25-hidroxivitamina D_3 [$25(\text{OH})\text{D}_3$] no fígado e, posteriormente, sob regulação do PTH, que estimula a atividade da 1- α -hidroxilase nos túbulos renais proximais, é hidroxilada a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta os níveis séricos de Ca^{++} estimulando a absorção intestinal de Ca^{++} e também é responsável por um mecanismo de retroalimentação negativa na paratireóide, inibindo a secreção de PTH (seta vermelha). (adaptado de Carling, 2001)

1.1.2 Apresentação clínica

O hiperparatireoidismo primário é definido como uma associação de distúrbios resultantes da secreção excessiva, relativamente descontrolada, do paratormônio (PTH), por uma ou mais glândulas paratireoideanas (Arnold *et al.*, 1988).

Os pacientes portadores de hiperparatireoidismo apresentam-se, em geral, com hipercalcemia, hipofosfatemia, hipercalciúria e aumento dos níveis séricos de PTH. As manifestações clínicas estão relacionadas aos efeitos da própria hipercalcemia como, por exemplo, a poliúria, polidipsia, nefrolitíase, nefrocalcinose, náuseas, vômitos, constipação intestinal, úlcera péptica, pancreatite, fadiga, hipertensão arterial ou aos efeitos da ação direta do PTH, como osteíte fibrosa com reabsorção subperiosteal, osteoporose, osteomalácia. No entanto, no adenoma esporádico de paratireóide, a hipercalcemia costuma não ser muito acentuada e os pacientes são freqüentemente assintomáticos (Marx *et al.*, 2000).

Já no carcinoma de paratireóide, os pacientes são bastante sintomáticos e a doença é geralmente devastadora. A doença é usualmente diagnosticada em torno da quinta década de vida, cerca de dez anos antes do hiperparatireoidismo primário típico (adenoma esporádico) e a incidência é igual em homens e mulheres. Os níveis de cálcio sérico costumam ser bem mais elevados que nos casos de adenoma ou hiperplasia de paratireóide e os pacientes freqüentemente queixam-se de fraqueza, emagrecimento, hiporexia, dor óssea, fraturas, além dos sintomas citados anteriormente. Uma massa cervical é palpável em cerca de 30 a 76% dos pacientes, um achado incomum no hiperparatireoidismo benigno, e os níveis de PTH estão geralmente 5 a 10 vezes acima do limite superior (Shane, 2001).

Achados típicos do hiperparatireoidismo primário benigno e do carcinoma de paratireóide podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1: Achados típicos de carcinoma de paratireóide e hiperparatireoidismo primário benigno

	<i>Carcinoma de paratireóide</i>	<i>Hiperparatireoidismo primário</i>
Taxa mulher: homem	1:1	3.5:1
Idade média (anos)	48	55
Assintomáticos (%)	<5	>80
Cálcio sérico (mg/dL)	>14	≤11,5
PTH	muito elevado	pouco elevado
Massa cervical palpável	comum	Raro
Envolvimento renal (%) ¹	32 – 80	4 - 18
Envolvimento esquelético (%) ²	34 – 91	<5
doença renal e esquelética concomitante	comum	Raro

¹ Nefrolitíase, nefrocalcinose e insuficiência renal sem outra etiologia.

² Osteíte fibrosa, reabsorção subperióstea, crânio com aspecto "*salt and pepper*" e osteopenia difusa em radiografias simples (adaptado de Shane 2001).

1.1.3 Alterações moleculares no hiperparatireoidismo primário

A fisiopatologia do hiperparatireoidismo primário se relaciona à perda da função normal de retroalimentação negativa do cálcio extracelular no controle da secreção do PTH. As causas desse descontrole são ainda desconhecidas, porém já foram identificados vários mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do hiperparatireoidismo. Os adenomas, carcinomas e grande parte dos casos de doença poliglandular são de origem monoclonal (Friedman *et al.*, 1989), sugerindo crescimento a partir de células precursoras que sofreram mutações somáticas ou germinativas em genes que controlam o crescimento

da célula paratireoideana ou a expressão do PTH, como a ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais.

O exemplo mais conhecido de gene supressor tumoral envolvido na patogênese do hiperparatireoidismo é o *MEN1* (Kas *et al.*, 1993). Mais de 600 mutações no gene *MEN1* foram descritas em casos de neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (Thakker, 2004) e na maioria dos casos pode se observar perda de heterozigose no DNA tumoral. (Friedman *et al.*, 1989; Friedman *et al.*, 1992; Larsson *et al.*, 1992) Mutações somáticas no *MEN1* são encontradas em cerca de 25 a 30% dos adenomas esporádicos de paratireóide; Heppner *et al.*, 1997, Carling *et al.*, 1998, Farnebo *et al.*, 1998).

O modelo para o desenvolvimento de um tumor a partir da perda de função do produto de um gene supressor tumoral é semelhante ao paradigma descrito para a oncogênese do retinoblastoma (Cavenee *et al.*, 1983; Bishop, 1987). Os alelos normais codificam proteínas envolvidas na modulação do crescimento e multiplicação celular. Alguns produtos de genes supressores tumorais previnem a progressão do ciclo celular, outros induzem apoptose em células defeituosas ou desempenham funções que mantêm a estabilidade genoma estável, como controle da replicação do DNA e reparo de mutações. De acordo com a teoria de Knudson, a inativação de ambos os alelos (“*two hits*”) é necessária para transformar uma célula de um tipo específico num precursor de um clone de tumor benigno ou maligno. Nas formas familiares, um alelo inativado é herdado (geralmente com uma mutação em ponto) e o segundo alelo, normal, é herdado do ascendente não afetado, mas torna-se inativo por uma mutação somática na célula precursora do tumor (Knudson, 1985). Nos casos esporádicos, os dois eventos inativadores são de origem somática. A primeira inativação é geralmente uma mutação em ponto, enquanto a segunda muitas vezes envolve a perda de um cromossomo inteiro ou parte dele. Desse modo, tanto os tumores familiares quanto esporádicos tendem a reter marcadores

adjacentes ao gene em questão em um dos alelos, mas perdem esses marcadores no alelo que sofreu a deleção.

Quando se estuda um determinado *locus* ligado a um gene supressor de tumor com marcadores microssatélites polimórficos a perda de um dos alelos causada por deleção cromossômica pode ser visualizada como perda de heterozigose alélica (*loss of heterozygosity* ou *LOH*) (Tischfield, 1997). Ou seja, num indivíduo que seja heterozigoto para esse *locus*, as células normais apresentarão dois alelos. Nas células tumorais, o evento de deleção cromossômica que inativa o gene supressor de tumor leva à perda de um dos alelos anteriormente presente.

Nem todos os tumores, entretanto, apresentam o padrão típico de perda de heterozigose. Se o alelo normal for silenciado por pequenas alterações como uma mutação em ponto, deleção de uma seqüência curta ou por metilação, ao invés de uma grande deleção, não haverá perda de heterozigose. As técnicas de *screening* geralmente utilizadas não detectam alterações de metilação, e por isso, sua importância pode estar sendo subestimada (Strachan and Read, 1999).

O gene supressor de tumor *RB* é inativado em mais de 85% dos carcinomas de paratireóide e, provavelmente, é um fator importante na sua patogênese molecular (Cryns *et al.*, 1994, Shan *et al.*, 1998). O gene *RB* localiza-se no braço longo do cromossomo 13, região 13q14e codifica a fosfoproteína nuclear RB, importante na modulação do ciclo celular (Lewin, 1999). O retinoblastoma (e vários outros tumores) ocorre quando ambas as cópias *RB* são inativadas (Knudson, 1985).

Outro mecanismo descrito na patogênese dos adenomas de paratireóide é um rearranjo no cromossomo 11 envolvendo os genes *PTH-PRAD1*, causado por uma inversão pericentromérica, que resulta em uma expressão exagerada do produto do oncogene *PRAD1*, a ciclina D, uma proteína regulatória do ciclo celular que é normalmente expressa

em altos níveis na fase G1 do ciclo celular e permite a entrada da célula na fase mitótica do ciclo (Arnold *et al.*, 1989; Rosenberg *et al.*, 1991). Portanto, uma desordem específica da regulação do ciclo celular na paratireóide leva à proliferação anormal e, conseqüentemente, à formação tumoral. Essa alteração genética está presente em todas as células tumorais, mas não nos tecidos normais. Aumento da expressão da ciclina D é encontrado em 18 a 40% dos adenomas esporádicos de paratireóide (Hsi *et al.*, 1996; Arnold *et al.*, 2002).

A perda de heterozigose no locus responsável pela localização do gene que codifica o receptor de cálcio ocorre em aproximadamente 10 % dos adenomas esporádicos (Thompson *et al.*, 1995). A inativação da função desse receptor levaria ao aumento na produção de PTH apesar dos níveis elevados de cálcio extracelular.

1.2 SÍNDROMES HEREDITÁRIAS ASSOCIADAS AO HIPERPARATIREOIDISMO

Em 1936, Goldman and Smyth relataram a presença de tumores da paratireóide em uma única família, sugerindo, desse modo, a origem genética dessa doença. Posteriormente, vários casos foram descritos e, embora aproximadamente 100 mil novos casos de hiperparatireoidismo sejam anualmente diagnosticados, somente nos Estados Unidos, o hiperparatireoidismo familiar responde por apenas 10% desse total.

1.2.1 Neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (MEN1)

A MEN1 é uma síndrome herdada de forma autossômica dominante caracterizada pela ocorrência de tumores de paratireóide, ilhotas pancreáticas e hipófise anterior. O hiperparatireoidismo está presente em 95% dos pacientes e é a apresentação inicial em cerca de 85% dos casos, geralmente na forma de hiperplasia poliglandular. Os tumores de ilhotas pancreáticas (tipo gastrinomas, insulinomas, glucagonomas) e adenomas hipofisários (geralmente produtores de prolactina ou de hormônio de crescimento) apresentam uma penetrância mais baixa, ocorrendo em até 50% dos pacientes portadores da síndrome. Vários tipos de lesões dermatológicas também podem estar associados à MEN1. Angiofigomas faciais múltiplos foram relatados em até 90% dos casos e colagenomas foram identificados e mais de 70% dos casos de MEN1 (Schussheim *et al.*, 2001). Outros tumores associados, que também podem estar presentes, incluem tumores carcinóides, tumores do córtex adrenal, lipomas, angiofibromas e colagenomas (Thakker, 2004).

A incidência de MEN1 em estudos *postmortem* é de 0,25%. Varia de 1 a 18% entre pacientes com hiperparatireoidismo, 16 a 38% entre os pacientes com gastrinomas e menos de 3% entre os pacientes com tumores hipofisários (Thakker, 2000). Comparando-se o hiperparatireoidismo associado à MEN1 ao esporádico, observa-se que o primeiro geralmente se apresenta com uma hipercalcemia leve, em pacientes mais jovens, geralmente na terceira década de vida, e com uma incidência igual entre homens e mulheres (Thakker, 2000).

A MEN1 é causada por mutações inativadoras no gene supressor tumoral *MEN1*, mapeado na região 11q13 (Larsson *et al.*, 1988). A existência de perda de heterozigose no

locus atribuído ao gene da MEN1 em tumores de pacientes portadores da síndrome, indicou a possibilidade desse gene pertencer à categoria dos genes supressores de tumor (Friedman *et al.*, 1989; Thakker *et al.*, 1989; Kas *et al.*, 1993). Pelo critério de perda clonal de um alelo estabeleceu-se que muitos tumores paratireoideanos na MEN1 são na verdade adenomas monoclonais e não hiperplasias policlonais (Arnold *et al.*, 1988).

Em 1997, o gene *MEN1* foi clonado, sendo composto de 10 exons, que codificam a proteína nuclear Menin, de 610 aminoácidos (Chandrasekharappa *et al.*, 1997). Menin interage com uma série de proteínas nucleares envolvidas na regulação transcricional, como o fator de transcrição JunD (um membro da família da proteína ativadora 1 (AP1)), membros da família de reguladores transcricionais do fator nuclear kappa B (NFκB), membros da família SMAD, entre outros, e reprime a ativação da transcrição mediada por esses fatores (Agarwal *et al.*, 1999, Heppner 2001, Kaji 2001). Recentemente, foram descritas interações da Menin com uma série de proteínas envolvidas no controle da estabilidade genômica (Lopez-Egido *et al.*, 2002). O exato mecanismo de ação da Menin, entretanto, ainda não é conhecido.

Mais de 90% das famílias portadoras de MEN1 apresentam mutações germinativas inativadoras no gene *MEN1*. Além disso, os tumores desses pacientes apresentam mutações somáticas no *MEN1* ou LOH envolvendo a região 11q13, que inativam a segunda cópia do gene, consistente com o papel de gene supressor tumoral. As mutações descritas são distribuídas pelos 9 exons traduzidos do gene *MEN1* e não há uma correlação genótipo-fenótipo (Thakker, 2004).

1.2.2 Neoplasia endócrina múltipla tipo 2A (MEN2A)

Na neoplasia endócrina do tipo 2 (MEN2), o hiperparatireoidismo ocorre na variante MEN2A, em cerca de 20 a 30% dos casos. Esses pacientes apresentam ainda, em 100% dos casos, o carcinoma medular da tireóide e em menos de 50% tumores adrenais, tais como o feocromocitoma e a hiperplasia da medular (Friedman, 1994). Na MEN2B, que representa apenas 5% de todos os casos de MEN2, o envolvimento das paratireóides é raro, e o carcinoma medular de tireóide e o feocromocitoma estão associados com *habitus* marfanóide, neuromas mucosos e megacólon. Há também a variante na qual o carcinoma medular de tireóide familiar é a única manifestação da síndrome (Thakker, 2004).

As três variantes da MEN2, herdadas de forma autossômica dominante, são causadas por mutações ativadoras no proto-oncogene *RET*, mapeado no cromossomo 10q11.2 (Simpson *et al.*, 1987) e que codifica um receptor de superfície celular, com domínios extracelulares ricos em cisteína e um domínio intracelular tirosina quinase. O proto-oncogene *RET* é normalmente expresso nas células C da tireóide, células cromafin e células paratireoidianas (Pausova *et al.*, 1995). Evidentemente, o produto desse gene é menos importante para o crescimento das células paratireoideanas do que para as tireoideanas do tipo C, já que a penetrância do hiperparatireoidismo na MEN2A e 2B é baixa, predominando o carcinoma medular de tireóide.

Ao contrário da MEN1, na MEN2 há uma correlação bem estabelecida entre o genótipo e o fenótipo (Carling, 2001). Em 95% dos pacientes, MEN2A é associada com mutações no domínio extracelular rico em cisteína, sendo que 85% dessas mutações ocorrem no códon 634 (C634R). O carcinoma medular de tireóide familiar também está associado a mutações missense no domínio extracelular, principalmente no codon 618. Já a

MEN2B está associada a mutações numa região altamente conservada do domínio intracelular tirosina quinase (codon 918, M918T) em 95% dos pacientes. (Mulligan *et al.*, 93; Mulligan *et al.*, 95; Mihai, 2001; Thakker, 2004).

O *RET* é um proto-oncogene, o que significa que uma única mutação ativadora em apenas um alelo seria suficiente para causar a transformação neoplásica. Todas as mutações no gene *RET* identificadas até hoje resultam em ativação oncogênica da proteína RET. Por exemplo, mutações afetando os resíduos cisteína do domínio extracelular levam os monômeros do receptor a se dimerizarem, mimetizando os efeitos causados pela ligação de um ligante ao receptor e induzindo um aumento da fosforilação e ativação constitutiva do domínio tirosina quinase.

1.2.3 Hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula ou maxila

O hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula ou maxila (HPT-JT) é uma síndrome rara, de incidência e prevalência desconhecidas, herdada de forma autossômica dominante e caracterizada pelo desenvolvimento de adenomas ou carcinomas paratireoideanos e tumores fibro-ósseos benignos de mandíbula ou maxila.

Cerca de 90% dos pacientes apresentam-se com hiperparatireoidismo, que geralmente é a manifestação inicial da síndrome. Na HPT-JT, o hiperparatireoidismo apresenta, em geral, comportamento mais agressivo do que nos casos esporádicos, com hipercalcemia mais grave, e é causado por adenomas de característica recorrente, que podem acometer uma ou mais glândulas, simultaneamente ou não, ou, em até 15% dos casos, carcinomas de paratireóide. Ao contrário do hiperparatireoidismo esporádico que é mais comum em mulheres acima dos 60 anos, no HPT-JT o hiperparatireoidismo pode se

manifestar no fim da adolescência ou no adulto jovem, com penetrância menor em mulheres (Chen *et al.*, 2003). Os tumores de mandíbula ou maxila estão presentes em cerca de 40% dos casos e podem, em alguns casos, preceder o hiperparatireoidismo.

Em cerca de 45% dos casos podem estar presentes lesões renais como o tumor de Wilms, adenomas corticais, hamartomas, cistos renais múltiplos e carcinoma papilar de células renais (Szabó *et al.*, 1995). Outras lesões associadas incluem adenocarcinoma de pâncreas, tumores de testiculares germinativos e adenomas tireoidianos de células de Hürthle (Cavaco *et al.*, 2001). Recentemente, Bradley *et al.* (2005) relataram a presença de menorragia e tumores uterinos benignos e malignos em 20 de 27 mulheres de 13 entre 33 famílias estudadas. As lesões encontradas incluíam adenosarcomas, adenofibromas, leiomiomas, adenomioses e hiperplasia endometrial. As mulheres afetadas apresentavam história de abortamento repetido e baixa taxa de natalidade.

1.2.3.1 Histopatologia

Histologicamente, há uma alta incidência de alterações císticas nos adenomas de paratireóide encontrados na HPT-JT, que variam desde numerosas dilatações em forma de foliculo ou criptas, até grandes cistos que distorcem a arquitetura da glândula, sempre revestidos por células paratireoidianas. Apesar dessas alterações serem mais comuns no HPT-JT, não são exclusivas dessa entidade e também podem estar presentes em casos de hiperparatireoidismo esporádico e até mesmo em glândulas normais.

O diagnóstico histológico do carcinoma de paratireóide é extremamente difícil e não há lesões patognomônicas. Características sugestivas de carcinoma incluem septos fibrosos espessos, invasão capsular e vascular, atividade mitótica aumentada e células em arranjo

trabecular. Contudo, invasão capsular pode ser vista em adenomas muito grandes, principalmente após hemorragia traumática, com fibrose subsequente e encapsulamento das células tumorais. O achado cirúrgico de aderência ou invasão de estruturas adjacentes é altamente sugestivo e o diagnóstico é confirmado apenas após a constatação de metástases locais ou à distância (Shane, 2001; Chen *et al.*, 2003).

As lesões ósseas características do HPT-JT são geralmente descritas como lesões fibro-ósseas benignas da mandíbula ou maxila e estão presentes em cerca de 40% dos casos (Chen *et al.*, 2003). Ao contrário do “tumor marrom”, lesão osteoclástica clássica do hiperparatireoidismo primário que pode ocorrer como complicação da hipercalcemia prolongada, o tumor mandibular fibro-ósseo não se resolve com a correção da hipercalcemia. Esses tumores podem preceder o desenvolvimento do hiperparatireoidismo na HPT-JT e ocorrem esporadicamente como uma patologia isolada (Regezi *et al.*, 1978).

O diagnóstico histopatológico de lesão fibro-óssea benigna engloba as displasias fibrosas e fibromas ossificantes centrais ou cemento-ossificantes, difíceis de serem distinguidos histologicamente entre si, e caracterizado por um estroma rico em fibroblastos, relativamente avascular, com trabéculas irregulares de tecido ósseo imaturo e esférulas cementificantes, às vezes com uma borda focal de osteoblastos. As células gigantes não são comuns como na osteíte fibrosa cística, mas podem estar presentes em pequeno número. Radiologicamente o fibroma ossificante é um tumor bem delimitado, facilmente removido cirurgicamente, enquanto a displasia fibrosa apresenta bordas menos definidas, fundindo-se com o tecido ósseo normal adjacente (Szabo *et al.*, 1995, Chen *et al.*, 2003; Thakker, 2004). Independente da diferenciação entre displasia fibrosa e fibroma ossificante, o mais importante é que o diagnóstico diferencial histopatológico é facilmente feito em relação ao tumor marrom, caracterizado pela presença de numerosos osteoclastos multinucleados ou células gigantes em meio a fibroblastos e matrix extracelular.

Clinicamente, porém, o diagnóstico diferencial entre os tumores ósseos associados ao HPT-JT e os tumores marrons é facilmente feito pela constatação da falta de regressão desses tumores após correção da hipercalcemia.

1.2.3.2 Gene HRPT2

Desde 1958 existem relatos isolados de casos familiares de hiperparatireoidismo associados a tumores de mandíbula ou maxila que não regrediam após a cura do hiperparatireoidismo; porém, foi apenas em 1990 que a síndrome do hiperparatireoidismo associada a tumores de mandíbula ou maxila foi reconhecida como uma entidade genética distinta, e o locus da doença, ainda desconhecido, foi denominado HRPT2. (Jackson, 1958; Kennett and Pollick, 1971; Caudill *et al.*, 1977; Rosen and Palmer, 1981; Warnakulasuriya *et al.*, 1985; Mallette *et al.*, 1987; Jackson *et al.*, 1990; Inoue *et al.*, 1995).

Szabo *et al.* (1995) mapearam o locus do *HRPT2* na posição 1q21-q31 através de análise de ligação em 5 famílias portadoras de HPT-JT, com 20 indivíduos afetados. Teh *et al.* (1996) determinaram, através do estudo de duas famílias, que a doença estava ligada a 5 marcadores na região 1q21-q32, reduzindo a região do *HRPT2* de mais de 60 cM para aproximadamente 34 cM, ao passo que a ligação com as regiões de MEN1 e MEN2 foram excluídas. Perda de heterozigose na região 1q21-q32 foi encontrada em 7 hamartomas renais associados à síndrome e HPT-JT em uma das famílias. Todas as perdas envolviam o alelo selvagem, sugerindo a inativação de um gene supressor tumoral nessa região. Estudos posteriores combinando a análise de ligação com marcadores na região 1q25-q31 em famílias com vários membros afetados e relatos anteriores delimitaram a região do HRPT2 a 14 cM (Hobbs *et al.*, 1999; Haven *et al.*, 2000).

Em 2002, através da genotipagem de 26 famílias portadoras de HPT-JT, Carpten *et al.* clonaram o gene HRPT2, mapeado no cromossomo 1q25-q31, e identificaram 13 diferentes mutações inativadoras germinativas em heterozigose em 14 famílias portadoras de HPT-JT e uma família com FIHP, sugerindo fortemente uma associação direta desse gene com a patogênese do HPT-JT (Carpten *et al.*, 2002).

O gene HRPT2 é composto por 17 exons, ocupando um segmento de 1,3 Mb no DNA genômico. O mRNA possui 2,7Kb, com uma janela de leitura de 1596 nucleotídeos, e codifica uma proteína de 531 aminoácidos, denominada Parafibromina, devido ao seu envolvimento no desenvolvimento de tumores paratireoidianos e fibromas ossificantes (Carpten *et al.*, 2002).

1.2.3.3 Proteína Parafibromina

Estudos com *Northern blot* sugerem que o mRNA da parafibromina é expresso de forma ubíqua, estando presente em todos os tecidos analisados, como coração, rim, pulmão, cérebro, placenta, fígado, pâncreas e músculo esquelético (Carpten *et al.*, 2002). Estudos de imunohistoquímica com anticorpos policlonais para a parafibromina mostraram imunoreatividade específica nas glândulas adrenais, paratireóides, rim, coração e músculo esquelético (Woodard *et al.*, 2005).

A função da parafibromina é desconhecida e ainda não há domínios funcionais identificados na proteína. Entretanto, a parafibromina humana é bem conservada na evolução, apresentando 54% e 25% de identidade com os ortólogos da *D. melanogaster* e *C. elegans*, respectivamente (Carpten *et al.*, 2002). Além disso, a parafibromina apresenta homologia parcial com uma proteína do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc73p

(Carpten *et al.*, 2002), componente do complexo proteico Paf1 associado à RNA polimerase II e importante na metilação da histona H3 nos resíduos de lisina 4 e 7, e sua conexão com eventos pós-transcricionais. A metilação da histona H3 é necessária para a repressão da transcrição mediada pela RNA polimerase II no DNAr, sendo importante para o crescimento celular normal e silenciamento pós-transcricional (Krogan *et al.*, 2003).

Rozenblatt-Rosen *et al.* (2005) identificaram a parafibromina como componente do correspondente humano do complexo Paf1 do fungo. Como no fungo, o complexo humano associa-se com a maior subunidade da RNA polimerase II. Estes autores sugerem ainda que a parafibromina possa interagir com o complexo histona-metiltransferase, responsável pela metilação da histona H3. Através de microscopia confocal, a expressão da parafibromina foi demonstrada nos compartimentos citoplasmáticos e nucleares. Algumas formas mutantes de parafibromina não se associam ao complexo Paf1 e, conseqüentemente, ao complexo histona-metiltransferase, sugerindo que a má formação desses complexos pode se correlacionar com o processo oncogênico (Rozenblatt-Rosen *et al.*, 2005). Woodward *et al.* (2004) demonstraram que a superexpressão transitória da parafibromina selvagem *in vitro*, mas não do mutante L64P, encontrado em casos de HPFI, levou à inibição da proliferação celular e bloqueou a expressão da ciclina D1, implicada na patogênese da neoplasia paratireoidiana. Em conjunto, esses resultados sugerem funções para a parafibromina consistentes com o papel de uma proteína supressora tumoral.

1.2.3.4 Mutações no gene *HRPT2*

Até o momento 44 mutações inativadoras foram descritas no gene *HRPT2* (Anexo A e figura 2). Destas, 18 mutações germinativas diferentes foram descritas em 22 famílias

não relacionadas, portadoras de HPT-JT, sendo que em 4 casos foi demonstrada perda de heterozigose no locus do *HRPT2* e em 2 casos foi constatada uma mutação somática adicional no tumor de paratireóide (carcinoma). Foram encontradas também mutações no gene *HRPT2* em 7 famílias portadoras de hiperparatireoidismo familiar isolado (HFPI) (5 germinativas e 2 somáticas). Nenhuma mutação foi detectada em 150 controles normais (Carpten *et al.*, 2002). A grande maioria das mutações descritas são inserções ou deleções causando uma alteração da janela de leitura levando a um códon de parada ou mutações nonsense, e algumas no sítio de *splice*. Apenas duas mutações missense foram descritas, porém uma delas envolve a metionina de iniciação (M1L) e a outra substitui uma leucina, bem conservada na evolução, por uma prolina (L64P). A mutação missense 191T>C (L64P) foi encontrada em 3 famílias não relacionadas portadoras de HFPI. A prolina possui uma função conhecida de quebrar hélices e pode afetar a estrutura terciária da parafibromina, alterando sua função. Dessa maneira, todas as mutações descritas até o momento são claramente de natureza inativadora. As mutações estão distribuídas ao longo de todo o gene, porém os exons 1, 2 e 7 são os mais afetados, contendo 38%, 17% e 21% das mutações descritas, respectivamente (figura 2). Até o momento não se estabeleceu uma correlação genótipo-fenótipo. O melhor exemplo dessa falta de correlação entre genótipo e fenótipo é a mutação 679insAG no exon 7, que já foi encontrada em 5 casos diferentes, não relacionados, incluindo um caso de carcinoma esporádico de paratireóide, duas famílias portadoras de HPT-JT com carcinoma de paratireóide, uma família de HPT-JT sem carcinoma de paratireóide e uma família portadora de HPFI com carcinoma de paratireóide.

Alguns tumores associados à síndrome de HPT-JT apresentam perda somática de heterozigose na região 1q, porém a frequência de perda de heterozigose demonstrada nesses casos é relativamente baixa, especialmente se comparada aos casos de MEN1, nos quais há perda de heterozigose em mais de 70% das vezes. Explicações possíveis seriam

outros mecanismos de inativação, como hipermetilação, inativação regulatória, microdeleções somáticas não detectáveis em estudos com microssatélites e pequenas mutações somáticas. A natureza inativadora das mutações descritas, junto aos achados de perda de heterozigose, corrobora o papel do *HRPT2* como gene supressor tumoral.

Membros de oito famílias com HPT-JT e duas famílias com FIHP nas quais foram encontradas mutações no *HRPT2* eram portadores de carcinoma de paratireóide. A alta incidência de malignidade paratireoidiana nas síndromes associadas ao *HRPT2*, em contraste com as outras formas familiares de hiperparatireoidismo, levou pesquisadores a estudarem a associação do *HRPT2* com o carcinoma esporádico de paratireóide. De fato, 26 casos de carcinoma de paratireóide foram investigados e em 20 foram encontradas mutações inativadoras no gene *HRPT2*, das quais cinco eram germinativas e as demais somáticas. A grande maioria desses casos apresentava evidências de inativação bialélica por perda de heterozigose ou mutações compostas (heterozigose composta).

Por outro lado mutações no gene *HRPT2* não parecem ser comuns em adenomas esporádicos de paratireóide, ao contrário do gene da *MEN1*, freqüentemente associado à patogênese do adenoma esporádico mas não ao carcinoma de paratireóide. No estudo de Carpten *et al.* (2002) foram encontradas apenas duas mutações somáticas em 47 adenomas esporádicos de paratireóide (53delT e 126del24).

Estudos com imunohistoquímica mostraram perda da imunoreatividade nuclear para a parafibromina em cerca de 95% dos casos de carcinoma de paratireóide e adenomas associados à síndrome de HPT-JT. Os adenomas esporádicos de paratireóide expressavam a parafibromina normalmente (Tan *et al.*, 2004).

Através de microarray marcado com 19.968 clones de cDNA e imunohistoquímica, Haven *et al.* (2004) estudaram o padrão de expressão de diversos tipos de tumores paratireoidianos e tecido paratireoidiano normal. Foi demonstrado que os tumores

associados a mutações no gene *HRPT2*, ou seja, originados de pacientes com hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula, carcinoma de paratireóide e hiperparatireoidismo familiar isolado, se concentraram em um único grupo, distinto dos demais e apresentavam expressão aumentada de proteínas como a histona 1 family member 2 (H1F2), E-caderina (CDH1), proteína precursora do amilóide B (APP), envolvidas na organização celular, tradução de sinais e apoptose celular, respectivamente. Segundo os autores, esses achados sugerem um mecanismo molecular de tumorigênese em comum para os tumores associados a mutações no *HRPT2*, diferentes daqueles envolvidos em tumores relacionados à *MEN1*.

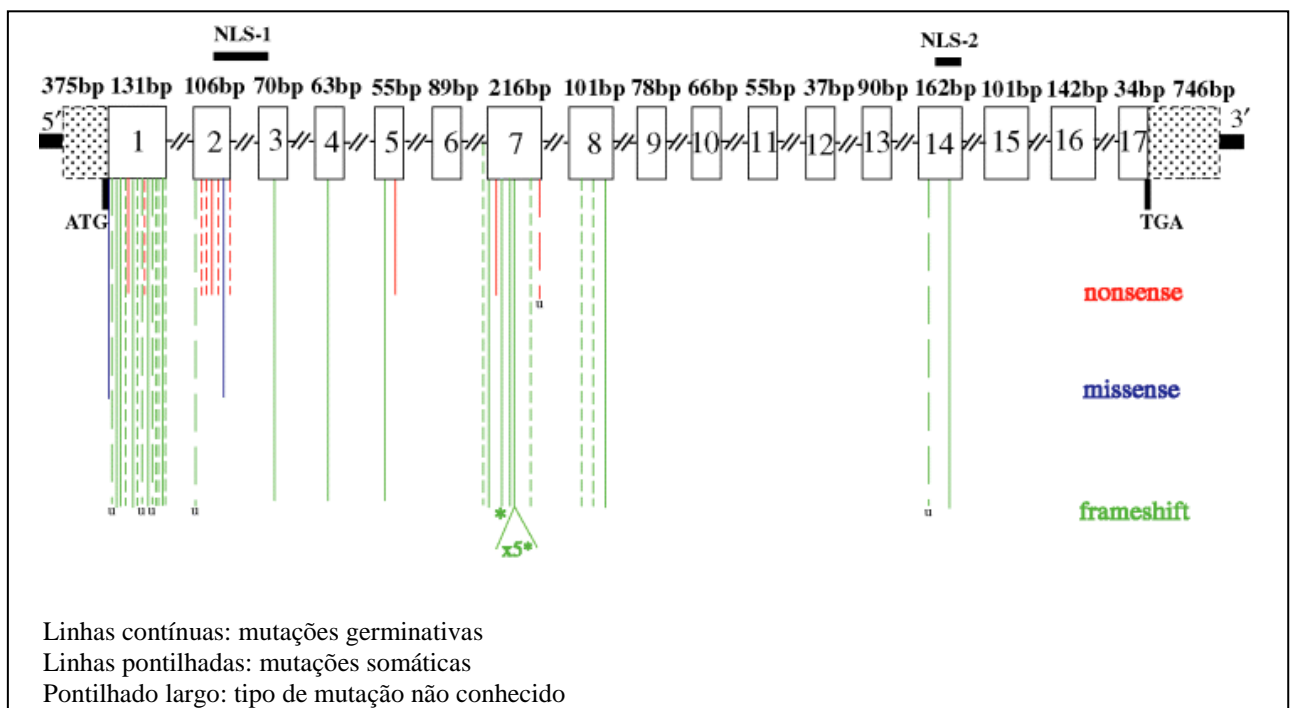


Figura 2: Representação esquemática do gene *HRPT2* e mutações patológicas descritas até o momento (adaptado de Bradley *et al.*, 2005)

1.2.4 Hiperparatireoidismo familiar isolado (HPFI)

O hiperparatireoidismo familiar isolado consiste na ocorrência familiar de hiperparatireoidismo, sem outras neoplasias endócrinas associadas. O HPFI é uma síndrome clínica heterogênea, herdada de maneira autossômica dominante, com aproximadamente 100 famílias descritas até o momento (Huang et al., 1997; Teh et al., 1998; Yoshimoto et al., 1998). Ainda não está estabelecido se essa síndrome é, na verdade, uma variante da neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (MEN1) ou da síndrome do hiperparatireoidismo associado ao tumor de mandíbula (HPT-JT). Clinicamente, pacientes com essa síndrome apresentam crises hipercalcêmicas mais graves que aqueles com MEN1, que geralmente têm um hiperparatireoidismo de evolução mais leve (Teh et al., 1998). Alguns autores a consideram como uma entidade genética distinta, apresentando um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de paratireóide (Wassif et al., 1993). Outros autores a consideram como uma entidade, do ponto de vista molecular, bastante heterogênea, podendo apresentar mutações no gene também responsável pela MEN1 (Honda et al., 2000; Kassem et al., 2000) ou pelo HPT-JT (Haven et al., 2000). Mutações germinativas no gene MEN1 foram descritas em 25 famílias com HPFI (Ohye et al., 1998; Villablanca et al., 2002; Pannett et al., 2003; Carrasco et al., 2004; Warner et al., 2004). Mutações no gene HRPT2 foram encontradas em 8 famílias portadoras HPFI, representando 10% dos casos investigados (Carpten *et al.*, 2002; Howell *et al.*, 2003; Cetani *et al.*, 2004; Villablanca *et al.*, 2004).

Mutações inativadoras do CaSR, em heterozigose, estão associadas a uma forma familiar benigna de hipercalcemia, conhecida como hipercalcemia hipocalciúrica familiar (HHF), que cursa com níveis pouco elevados de cálcio séricos, PTH inapropriadamente normal e glândulas paratireoidianas normais ou com hiperplasia leve. Em homozigose,

essas mutações causam hiperparatireoidismo neonatal grave. O HHF deve ser diferenciado do HPFI, já que consiste numa alteração benigna da homeostase do cálcio e não é corrigido cirurgicamente. Recentemente, mutações inativadoras do CaSR foram também associadas a formas atípicas de HHF, referidas como hipercalcemia hiper calciúrica familiar, cursando com hiperparatireoidismo clínico, hiperplasia ou adenoma de paratireóides e melhora com tratamento cirúrgico (Carling *et al.*, 2000; Warner *et al.*, 2004).

Em trabalho realizado e apresentado como tese de doutorado no programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da UFMG, Soares (2000) estudou tumores de oito membros de uma família, dos quais cinco apresentavam hiperparatireoidismo e haviam sido tratados cirurgicamente. Nos pacientes analisados, mutações relacionadas com as vias de sinalização ligadas à proteína G, ativadoras ($G\alpha$) ou inibitórias ($Gi2\alpha$), não foram responsáveis pelo desenvolvimento tumoral. Foi então estudado o gene *MEN1* através do seqüenciamento direto de sua parte codificadora sem que fossem encontradas mutações. Os dados sugeriam, portanto que outros mecanismos moleculares de formação tumoral deveriam ser investigados para um melhor esclarecimento da doença em estudo. A partir desses dados, decidimos investigar o gene *HRPT2* nessa família.

Considerando a ausência de mutações em outros genes associados ao hiperparatireoidismo familiar isolado nessa família e a recente clonagem do gene *HRPT2* e sua associação com as síndromes de HPT-JT e HPFI, decidimos investigar o gene *HRPT2* nessa família portadora de HPFI, já descrita anteriormente por Soares (2000), em um caso esporádico de HPT-JT.

2 - OBJETIVO

2. OBJETIVO:

O objetivo deste trabalho é investigar a presença de mutações no gene HRPT2 em uma família portadora de HPFI e em um caso de HPT-JT, através da análise genética da sequência codificadora desse gene. Desta maneira, visamos contribuir para uma melhor caracterização dos fenótipos associados ao HRPT2 e para o entendimento das bases moleculares envolvidas na patogênese das diferentes formas de hiperparatireoidismo.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 PACIENTES

Todos os pacientes incluídos nesse trabalho deram seu consentimento para participar de estudos genéticos. Esse trabalho foi aprovado pelo comitê de ética médica da Universidade Federal de Minas Gerais, parecer nº ETIC 079/98.

Foram estudados um paciente portador da síndrome de hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula e uma família portadora de hiperparatireoidismo familiar isolado, com oito membros afetados.

O diagnóstico de hiperparatireoidismo foi estabelecido pela detecção de níveis elevados de cálcio e PTH, associados a níveis diminuídos de fosfato. Para rastreamento de neoplasia endócrina múltipla tipo 1, foram dosados calcitonina, gastrina e prolactina.

3.1.1 Hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula ou maxila (HPT-JT)

Paciente do sexo masculino, 26 anos, apresentou-se em janeiro de 1995, com quadro de fratura espontânea de arcos costais, noctúria e fraqueza generalizada. Ao exame físico, apresentava nódulo em região de projeção do lobo esquerdo da tireóide além de tumoração de cerca de 2 cm em região maxilar direita, PA = 130 x 60 mmHg; FC = 80 bpm; altura = 175 cm; peso = 66,7 kg.

Exames laboratoriais realizados em 01/04/95 mostraram Cálcio sérico = 14,8 mg/dl, Fósforo = 1,1 mg/dl e PTH intacto = 489 pg/ml, confirmando o diagnóstico de hiperparatireoidismo primário. Os exames realizados na época do diagnóstico são mostrados no anexo B.

Submetido a exérese de adenoma de paratireóide em 27/06/95, evoluiu com hipocalcemia no pós-operatório e normalização do cálcio sérico após seis meses de acompanhamento.

Em 18/10/96 retornou para controle, assintomático, com análise bioquímica normal, apresentando ao exame físico persistência da tumoração em região maxilar direita.

Em 2004 voltou a apresentar hipercalcemia e foi constatada recidiva do hiperparatireoidismo. O paciente foi submetido a exérese de um segundo adenoma de paratireóide, evoluindo novamente com normalização dos níveis de cálcio sérico. A tumoração em região maxilar permanecia inalterada, porém o paciente recusou biópsia ou remoção do tumor.

Exames laboratoriais solicitados dos familiares do probando (figura 3) mostraram apenas Cálcio no limite superior da normalidade na mãe (I:2), que no entanto, se recusou a realizar propedêutica mais extensa. Os exames realizados pelos familiares do probando podem ser vistos no anexo C.

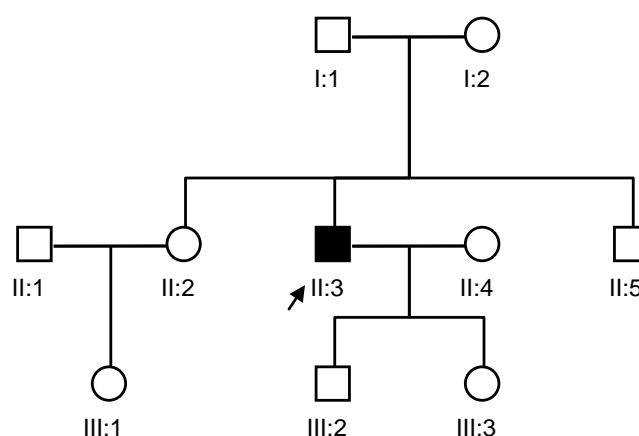


Figura 3: Heredograma da família com HPT-JT

O probando é indicado pela seta. Símbolos cheios indicam membros afetados.

3.1.2 Hiperparatireoidismo Familiar Isolado (HPFI)

Estudamos uma família que possui oito casos de hiperparatireoidismo, 7 dos quais tratados cirurgicamente (Figura 4). Os pacientes já foram submetidos à análise bioquímica e genética para rastreamento da neoplasia endócrina múltipla tipo 1, descartando essa possibilidade (Soares, 2000). A seguir explicitaremos os achados clínico-laboratoriais de alguns indivíduos investigados. Os indivíduos I:2, II:3, II:6, II:10, II:12, II:14 e II:15 já foram descritos anteriormente por Soares (2000) e serão revistos resumidamente nesse trabalho.

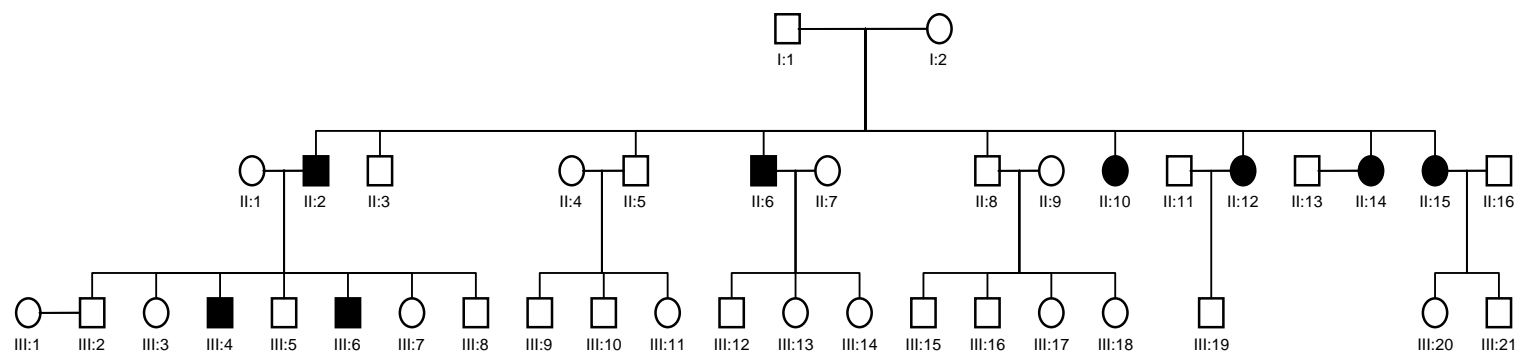


Figura 4: Heredograma da família portadora de hiperparatireoidismo primário isolado. Símbolos cheios representam os membros afetados.

II:12 - sexo feminino, leucoderma, nascida em 27/05/43

Apresentou-se em 1976, com quadro de dor nos joelhos, poliúria, polidipsia, epigastralgia, náuseas, emagrecimento progressivo. Ao exame físico apresentava mucosas hipocoradas, peso = 37.3 kg, altura = 159 cm, dor à palpação óssea em membros inferiores, principalmente na crista ilíaca direita e joelho esquerdo, onde se notava uma tumoração de superfície irregular e de limites imprecisos; nódulo de aproximadamente 1 cm de consistência fibroelástica, superfície lisa, limites imprecisos, não doloroso, em topografia de lobo esquerdo da tireóide; tumoração na mandíbula que foi submetida à biópsia, mostrando lesão gigante-celular e fibroblástica, além de numerosos osteoclastos reabsorvendo o tecido ósseo, compatível com tumor marrom de paratireóide. Exames complementares (Anexo D) confirmaram o diagnóstico de hiperparatireoidismo. Foi indicado o tratamento cirúrgico, que resultou na retirada de um adenoma de células principais da paratireóide inferior esquerda. Recebeu alta com Cálcio = 8,1 mg/dl.

Em 1981, apresentou recorrência da hipercalcemia (Cálcio = 11,5 mg/dl), raio X de ossos longos mostrando osteopenia difusa e raio X de crânio e de mandíbula com lesões císticas, levando à hipótese de recidiva do hiperparatireoidismo. Foi então submetida a reintervenção cirúrgica, sendo retirados mais dois nódulos bem encapsulados, medindo entre 0,5 e 1,2 cm, com áreas de células claras e de células oxifílicas compatíveis com o diagnóstico de adenoma de paratireóide. O nódulo maior mostrava áreas de degeneração cística.

Atualmente a paciente encontra-se assintomática, com peso = 61,5 Kg. Seus últimos exames mostram níveis normais de cálcio e fósforo séricos, calciúria baixa e PTH no limite superior da normalidade (Anexo D).

II:15 - sexo feminino, leucoderma, nascida em 19/11/1952

Apresentou-se em 1990, aos 37 anos de idade, com quadro de poliúria, polidipsia, anemia ferropriva crônica e história progressiva de metrorragia desde os 18 anos de idade, nefrolitíase com eliminação de cálculos renais de oxalato de cálcio, e nefrectomia direita por tumor renal benigno (leiomioma renal). Apresentava ainda diagnóstico endoscópico de endometriose e história familiar de uma irmã paratireoidectomizada. Ao exame físico apresentava peso = 50 kg; altura = 161 cm, À palpação cervical notava-se nódulo de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, na região de projeção lobo esquerdo tireoideano. Exames laboratoriais solicitados mostraram hipercalcemia com PTH elevado, confirmando o diagnóstico de hiperparatireoidismo (Anexo E).

A paciente foi encaminhada à cirurgia, tendo sido realizada exérese de adenoma de paratireóide esquerda e também exérese de um pequeno adenoma tireoideano direito. O exame anatomopatológico do tecido paratireoideano mostrou um fragmento com proliferação celular exuberante, com células em geral oxifílicas, sendo difícil diferenciar entre adenoma e hiperplasia. O diagnóstico anátomopatológico do nódulo tireoideano foi de bócio colóide. Um mês após a cirurgia (em uso de 2 g de cálcio/dia), apresentava Cálcio = 8,9 mg/dl e Fósforo = 3,5 mg/dl.

Atualmente continua sendo acompanhada ambulatorialmente, em uso contínuo de doses baixas de carbonato de cálcio (500 mg de cálcio elementar/dia), mantendo cálcio, fósforo, provas de função tireoideana e prolactina normais.

II:10: sexo: feminino, leucoderma nascida em 12/06/58

Apresentou-se em 1992, aos 34 anos, com queixas de dores nos joelhos, poliúria, noctúria, nervosismo, dores ósseas generalizadas e aparecimento de nódulo tireoidiano, que vinha aumentando progressivamente e história familiar de duas irmãs paratireoidectomizadas (II:12 e II:15). Ao exame físico apresentava nódulo de aproximadamente 2,5 cm no polo inferior do lobo esquerdo da tireóide, e dor forte na região da tibia, à compressão. Exames realizados confirmaram a hipótese diagnóstica de hiperparatireoidismo (Anexo F) e a paciente foi encaminhada à cirurgia onde foi realizada exérese de adenoma atípico de paratireóide.

Evoluiu no segundo mês pós-operatório, em uso de 4 g de cálcio por via oral/dia, com Cálcio = 8,2 mg/dl e Fósforo = 3,0 mg/dl. Em 1995 apresentava Cálcio = 9,1 mg/dl e PTH = 23 pg/ml. A paciente encontra-se atualmente assintomática.

II:14 - sexo: feminino, leucoderma, nascida em 25/08/54

Apresentou-se em 1993, aos 38 anos, apresentou-se com queixas de cefaléia crônica, nervosismo, polidipsia, poliúria, náuseas pela manhã e dores em membros inferiores ao caminhar. História pregressa de polimenorréia e metrorragia desde os 21 anos de idade, histerectomia em 1984 para tratamento de miomatose uterina, nefrolitíase com eliminação de cálculos em 1989 e diagnóstico endoscópico de úlcera gástrica. História familiar de três irmãs paratireoidectomizadas (II:12, II:15, II:10). Exame físico sem alterações, exceto por com nódulo de aproximadamente 1,5 cm em lobo direito da tireóide.

Exames laboratoriais solicitados confirmaram hipótese diagnóstica de hiperparatireoidismo primário (Anexo G). A paciente foi encaminhada à cirurgia, com exérese de um adenoma de paratireóide, com áreas sólidas e outras císticas, em março de 1993. A evolução laboratorial, em maio de 1993, mostrava Cálcio = 6,6mg/dl; Fósforo = 2,5 mg/dl e, um ano após, Cálcio = 8,9 mg/dl e PTH = 18 pg/ml.

II:6 - Sexo masculino, leucoderma, nascido em 12/11/41

Encaminhado em 1993, para avaliação pré-operatória de cirurgia de revascularização miocárdica (CRVM), com queixas de poliúria e polidipsia, em uso de furosemida, alopurinol, dinitrato de isossorbida, atenolol e nifedipina, e história de hipertensão arterial sistêmica há mais de 20 anos e dois episódios de infarto agudo do miocárdio, gota e de insuficiência renal crônica. História familiar de quatro irmãs paratireoidectomizadas (II:12; II:15; II:10; II:14). Exame físico sem alterações, exceto por edema de membros inferiores. Os exames bioquímicos (Anexo H) confirmaram os diagnósticos de hiperparatireoidismo, insuficiência renal crônica e gota.

Foi submetido à CRVM em caráter de urgência após quadro de angina instável,. Evoluindo com hipercalcemia de difícil controle no pós-operatório. Foi então indicado paratireoidectomia em caráter de urgência, porém a exploração cervical não foi bem sucedida quanto à localização do adenoma de paratireóide. Recebeu alta hospitalar, mantendo hipercalcemia (Cálcio = 12,2 mg/dl) no controle ambulatorial e evoluiu posteriormente para óbito.

II:3 - Sexo masculino, leucoderma, nascido em 02/01/40

Paciente assintomático avaliado em 1996 devido à história familiar de hiperparatireoidismo. Não apresentava nenhuma história progressiva relevante para o estudo em questão. Exames físico e laboratoriais sem alterações. (Anexo I).

III:4 - sexo masculino, leucoderma, nascido em 23/01/72

Apresentou-se em dezembro de 2001 com queixas de dor no joelho direito, membros superiores e articulações, nictúria, polidipsia e nervosismo há cerca de um ano. História progressiva de fratura de punho direito e história familiar de quatro tias e um tio com hiperparatireoidismo. Ao exame físico, apresentava peso = 67 kg, altura = 177 cm, PA = 120 x 60 mmHg, FC = 62 bpm, tireóide com aumento difuso discreto à palpação e o restante do exame físico sem alterações. Exames realizados confirmaram o diagnóstico de hiperparatireoidismo e podem ser vistos no anexo J.

O paciente foi encaminhado à cirurgia e submetido a exérese de adenoma de paratireóide inferior esquerda, medindo 2,0 x 2,0 x 1,5 cm. Evoluiu no pós-operatório com normalização dos níveis de cálcio (Cálcio total = 9,8 mg/dl) e recebeu alta em uso de 2 g de cálcio por via oral/dia.

Em julho de 2002, apresentava Cálcio total = 10,5 mg/dl e densitometria óssea mostrando ganho de massa óssea em relação à anterior.

Em agosto de 2003, o paciente evoluiu com recidiva do hiperparatireoidismo e foi submetido a reintervenção cirúrgica com exérese de adenoma típico de paratireóide inferior direita, medindo 2,0 x 1,5 x 1,0 cm. Recebeu alta com Cálcio total = 9,3 mg/dl e Fósforo =

2,9mg/dl. Em janeiro de 2004 mantinha níveis normais de cálcio e fósforo séricos. (Cálcio total = 9,0 mg/dl e Fósforo = 2,8 mg/dl).

II-2, sexo masculino, leucoderma, nascido em 07/09/37

Avaliado em janeiro de 2002 devido à história familiar de hiperparatireoidismo. Apresentava queixas de emagrecimento progressivo nos últimos oito anos, poliúria nos últimos quatro meses, agitação e instabilidade emocional. Ao exame físico, apresentava-se com peso = 48 kg, altura = 167 cm, PA = 120 x 80 mmHg, FC = 78 bpm, e o restante do exame físico sem alterações.

Exames realizados confirmaram a hipótese diagnóstica de hiperparatireoidismo (Anexo K). O paciente foi encaminhado à cirurgia e submetido a exérese de adenoma de paratireóide inferior esquerda. Evoluiu com queda discreta do cálcio no pós-operatório e recebeu alta em uso de 2 g de cálcio por via oral/dia. Duas semanas depois havia interrompido a reposição de cálcio e foi atendido com quadro de hipocalcemia (Cálcio total = 6,9 mg/dl), sendo reiniciado a reposição de cálcio.

III:6 - sexo masculino, leucoderma, nascido em 1977

Avaliado em 2003, aos 26 anos de idade, devido a fratura de antebraço em linha após queda de motocicleta. Apresentava história pregressa de fratura de punho aos 12 anos de idade e história familiar fortemente positiva para hiperparatireoidismo. Sem outras queixas.

Ao exame físico apresentava peso = 78 kg, altura = 176 cm, PA = 110 x 80 mmHg, FC= 60 bpm, e o restante do exame físico sem alterações.

Exames bioquímicos confirmaram a hipótese diagnóstica de hiperparatireoidismo (Anexo L). O paciente foi encaminhado à cirurgia e submetido a exérese de adenoma de paratireóide inferior esquerda, evoluindo com normalização dos níveis de cálcio sérico.

I:1 - sexo feminino, leucoderma, nascida em 1912

Mãe de nove filhos, seis dos quais com hiperparatireoidismo confirmado, além de uma irmã falecida com diagnóstico de câncer ósseo. Portadora de diabetes, controlado com hipoglicemiantes orais e de cirrose hepática sem etiologia conhecida. Não referia história pregressa de cálculos renais, fraturas ósseas ou quaisquer outros sinais sugestivos de hiperparatireoidismo, porém foi submetida à propeidética devido à história familiar. Exames realizados não mostraram alterações e podem ser vistos no anexo M. Faleceu em 1996, após episódio de pneumonia.

3.2 AMOSTRAS DE SANGUE E TUMOR

Os tumores frescos foram obtidos durante cirurgias de paratireoidectomia realizadas no Hospital Felício Rocho, após consentimento prévio dos pacientes. Os tecidos obtidos foram colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C até o uso, ou foram submetidos à extração do DNA imediatamente.

Amostras de sangue venoso periférico foram colhidas em tubos com EDTA. Após a coleta, o sangue foi submetido inicialmente a refrigeração e quando o DNA não era extraído no mesmo dia da coleta, as amostras eram armazenadas a -20°C para posterior extração de DNA.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA

3.3.1 Extração do DNA de leucócitos periféricos (genômico)

DNA genômico foi extraído a partir do sangue periférico dos pacientes estudados. As amostras de sangue descongeladas foram transferidas para tubos de polipropileno estéreis. A separação dos leucócitos foi feita por centrifugação em meio hipotônico, segundo procedimento descrito por Jeanpiere (1987); o sedimento obtido foi ressuspensionado na mesma solução. Foi retirada uma alíquota do material e o DNA foi extraído de acordo com procedimento descrito por Boom *et al* (1990). Os procedimentos usados estão resumidos adiante.

3.3.1.1 Separação de leucócitos do sangue total

Em tubos de polipropileno com capacidade para 50 ml, foram misturados 5 ml de sangue colhido em EDTA e 45 ml de solução de EDTA/NaCl 10mM, homogenizando-se a mistura por inversão do tubo. O mistura foi centrifugada a 1.300 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento obtido foi ressuspensionado em aproximadamente

50ml da mesma solução, misturando-se suavemente por inversão do tubo, seguindo-se nova centrifugação. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de um sobrenadante límpido, de cor branco-amarelada, associado a um sedimento claro, branco ou levemente róseo, quando então os leucócitos foram ressuspensos em aproximadamente 1 ml da mesma solução utilizada para lavagem. Esse material foi congelado e estocado a -20°C.

3.3.1.2 Extração do DNA

A uma alíquota de 100-150 µl da suspensão de leucócitos foram adicionados 900 µl de tampão de lise e 40 µl de suspensão de sílica, sendo a mistura submetida a agitação vigorosa em vórtex por alguns segundos. Em seguida a suspensão foi incubada a 56°C durante 10 a 15 minutos e, posteriormente, centrifugada a 12000 x g em microcentrífuga por 1 minuto à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de sílica obtido foi lavado duas vezes com 900 µl de tampão de lavagem, repetindo-se a centrifugação entre cada lavagem. Foram feitas outras duas lavagens sucessivas com 900 µl de etanol 70% e, finalmente, uma com 900 µl de acetona. Descartado o sobrenadante, secou-se a sílica a 56°C por 3 a 5 minutos e adicionou-se 0,5 ml de tampão TE pH = 8.0. Após vigorosa agitação em vórtex, a mistura foi incubada novamente a 56°C até o dia seguinte (*overnight*). A seguir, centrifugou-se novamente por 2 minutos e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo. O material extraído foi armazenado a 4°C. As soluções empregadas estão descritas no anexo N.

3.3.2 Extração do DNA de tecidos tumorais a fresco

Os tecidos tumorais a fresco foram lavados com tampão contendo 10 mM de NaCl e 10 mM de EDTA. A seguir, cerca de 5 g de cada amostra foram trituradas separadamente em um gral, parcialmente coberto por nitrogênio líquido. Quando o tecido adquiriu uma consistência de pó, uma alíquota desse material foi transferida para um tubo de 1,5 ml e nesse tubo foi processada a extração pelo mesmo método descrito acima. O restante do material foi armazenado em freezer a -70°C para extrações posteriores.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Amostras de DNA e RNA foram submetidas à quantificação através da espectrofotometria. O princípio da espectrofotometria é a leitura de cromóforos encontrados nas moléculas biologicamente ativas, que são aqueles derivados da ligação π (duplas ligações) em sistemas ressonantes. Por causa disso, moléculas como o DNA e o RNA, cujo principal cromóforo são as bases aminadas, e as proteínas, cujo principal cromóforo são os aminoácidos aromáticos e a ligação peptídica, absorvem luz na região do espectro correspondente ao ultravioleta.

O espectrofotômetro foi ligado 30 minutos antes de se iniciar a leitura para estabilização da luz ultravioleta utilizada para a quantificação. As amostras foram diluídas em água e colocadas em uma cuveta de cristal de 1 ml. A cubeta foi colocada então no aparelho, previamente zerado em relação a absorbância da cubeta e da água (branco), e obtidas as leituras de absorbância em dois tipos de comprimento de onda: 260 nm, comprimento de onda ótimo para leitura de DNA, e no comprimento de onda de 280 nm,

ótimo para leitura de proteínas. As leituras foram realizadas em duplicata e uma média foi obtida em relação às duas leituras. A concentração de DNA foi calculada da seguinte forma:

$[\text{dsDNA}(\mu\text{g/mL})] = A \times A_{260} \times \text{diluição}$, onde A é uma constante de cada substância e é definida como a capacidade intrínseca do material analisado de absorver luz em um determinado comprimento de onda. No caso do dsDNA (DNA de fita dupla) o valor desta constante é 50. A_{260} é a leitura da absorbância da amostra no comprimento de onda de 260 nm. Diluição corresponde a quantas vezes a amostra foi diluída para ser feita a leitura.

3.4.1 Avaliação da pureza do DNA extraído

A pureza das amostras foi obtida determinando a relação entre os valores de absorbância nos comprimentos de onda 260 (A_{260}), correspondente ao DNA, e 280 (A_{280}), correspondente às proteínas. Relação entre A_{260}/A_{280} entre 1,4 e 2,0 são aceitáveis, para DNA, sendo que valores mais baixos significam que a amostra possui uma quantidade maior de proteína, que podem interferir na utilização dessas amostras.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O DNA obtido foi utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR), para amplificação dos 17 exons do gene da HRPT2. Essa técnica, descrita por Saiki *et al* (1988), consiste na replicação “*in vitro*” de fragmentos específicos de DNA pela enzima *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerase. Para isso são utilizados pares de oligonucleotídeos denominados *primers* ou iniciadores, que consistem de seqüências curtas complementares às

regiões 5' e 3' que delimitam o segmento de DNA a ser amplificado e funcionam como os iniciadores da reação.

A amplificação pela PCR consiste em ciclos repetidos de três passos: desnaturação do DNA a 94°C, anelamento dos iniciadores às suas seqüências complementares e extensão da fita de DNA a partir dos iniciadores anelados pela *Taq* DNA polimerase. A cada ciclo sucessivo duplica-se a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior, resultando em um acúmulo exponencial (2^n) dos fragmentos a serem amplificados, em que n representa o número de ciclos (Saiki et al., 1988).

A reação é iniciada com o aquecimento da mistura até temperatura de 94°C, quando ocorre a separação da fita dupla do DNA.

O passo seguinte é o resfriamento controlado do material, até uma temperatura definida, variável para cada par de iniciadores, denominada temperatura de anelamento. Nessa temperatura, os iniciadores formam híbridos com o DNA nas regiões de seqüência complementar à sua. A temperatura de anelamento é estimada de acordo com a extensão do primer e proporção de C/Gs e A/Ts. A partir da temperatura estimada inicialmente, foram feitos testes de condição da reação, variando-se a temperatura, os componentes dos tampões utilizados e a concentração de magnésio na reação até se obter condições ótimas de amplificação para cada par de iniciadores.

Após o anelamento, o material é aquecido até 72°C, temperatura ideal para a atividade da enzima *Taq* polimerase. A partir desse momento, os dNTPs são incorporados aos iniciadores, formando uma nova fita de seqüência complementar à fita molde. Essas etapas são repetidas geralmente entre 25 e 40 vezes. (Saiki *et al.*, 1988)

Desde que se utilizem condições adequadas, o produto de amplificação obtido é bastante específico, com baixa probabilidade de ter se originado de outras regiões do DNA genômico, ou mesmo de haver algum erro na incorporação de bases pela enzima. O resultado

é um produto relativamente puro, contendo basicamente a região de interesse, em concentração bastante elevada.

Para amplificação da região codificadora do HRPT2 foram utilizados pares de iniciadores intrônicos específicos, flanqueando as sequências de interesse, amplificando 16 fragmentos correspondentes aos 17 exons do HRPT2 (Anexo O).

As reações foram realizadas para um volume final de 50 µl. Foram utilizados 200 a 400ng de DNA, 10 pmol de cada primer, 5 µl de tampão 10X, 1,5 a 4 mM de MgCl₂, 1,5 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 2,5U da enzima *Taq* DNA Polimerase. A amplificação foi realizada em um termociclador (Mastercycler gradient thermocycler, Eppendorf AG, Hamburg) com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento por 1 minuto e extensão a 72°C por 45 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Cada fragmento foi amplificado sob condições específicas de temperatura de anelamento descritas no anexo O. A composição das soluções utilizadas na reação em cadeia da polimerase está descrita no anexo P.

Para cada reação foi feito um controle negativo (branco), contendo todos os componentes da reação, exceto a amostra de DNA, para avaliar se o resultado obtido é proveniente da amostra de DNA utilizada, e não de contaminação de DNA proveniente do ambiente externo.

3.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A visualização do material amplificado foi realizada através da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (Sambrook *et al.*, 1989). O método consiste na migração do

fragmento de DNA através de uma matriz inerte, sob ação de um campo elétrico. A matriz é um polímero de acrilamida, que confere resistência suficiente ao meio, dificultando a mobilidade do DNA relativa ao seu tamanho, sendo capaz de separar fragmentos de até 1 kb. Foi utilizado gel na concentração de 6,5%, para obter uma faixa de separação de 50-1000 pares de base, abrangendo a faixa de tamanho dos fragmentos em estudo.

Foram aplicados 3 μl de cada produto de PCR, juntamente com 1,0 μl de tampão de corrida (gel loading buffer) em cada canaleta do gel. Para determinar o peso molecular do fragmento amplificado, foi aplicado em uma canaleta do gel, 1,5 μl de padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ – Gibco BRL). A corrida foi realizada em tampão TBE 1X, a 160 V, durante 20 a 30 minutos, em gel de 8 x 10 x 0,75 cm utilizando-se uma cuba específica (mini vertical gel electrophoresis unit, Sigma). Após o término da corrida, o gel foi corado pela prata para visualização do material amplificado. As soluções utilizadas nesta etapa estão descritas no anexo Q.

3.7 COLORAÇÃO PELA PRATA

Devido à grande afinidade do íon prata por ácidos nucleicos, estes formam complexos lineares com o metal. O processo de coloração é uma adaptação do método descrito por Bassam *et al* (1991), que se baseia na capacidade da prata de se ligar ao DNA fixo em uma matriz, sendo posteriormente oxidada, produzindo cor que vai do amarelo escuro ao preto. Com isso, é possível visualizar e identificar os fragmentos de DNA que migraram no gel, de acordo com seu peso molecular.

O protocolo consiste de uma série de etapas, descritas na tabela 2.

Tabela 2: Protocolo de coloração pela prata do gel de poliacrilamida.

<i>Reagente</i>	<i>Tempo</i>	<i>Condições</i>
1. Ácido acético 10%	10 minutos	Sob agitação
2. Água destilada	3 minutos	Sob agitação
3. Solução de prata	10 minutos	Sob agitação
4. Água destilada	2 x 30 segundos	Sob agitação
5.Revelador	Até a coloração aparecer	Sob agitação
6. Ácido acético	5 minutos	Sob agitação
7. Água destilada	5 minutos	Sob agitação
8. Secar em papel celofane	12-24h	

A integridade e a qualidade do material amplificado são verificadas pelo padrão de bandas formado pelo material amplificado no gel. As bandas devem apresentar-se bem delimitadas, e seu posicionamento no gel, quando comparado ao das bandas de um padrão de peso molecular, deve ser compatível com o tamanho esperado para o fragmento. Cada amostra deve apresentar apenas uma banda, correspondente ao fragmento amplificado, sendo admissível a presença de mais bandas apenas em casos específicos.

O controle negativo (branco), que foi realizado para cada reação, deve apresentar-se totalmente isento de bandas, demonstrando não ter ocorrido contaminação durante o manuseio dos reagentes e amostras, indicando a confiabilidade do processo de amplificação.

O material considerado de boa qualidade, de acordo com os parâmetros descritos anteriormente, foi utilizado para as análises de mutação. As soluções utilizadas nesta etapa estão no anexo R.

3.8 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Esta técnica consiste na purificação do material amplificado, eliminando fragmentos inespecíficos, de baixo peso molecular, como, por exemplo, excesso de iniciadores, que podem inibir a reação de sequenciamento.

Para realização da purificação, foi utilizada o *Kit* GFX de purificação (*GFX PCR and Gel Band Purification Kit*, Amersham Biosciences, USA). O *Kit* consiste de uma coluna contendo fibra de vidro (com a função de filtrar os fragmentos indesejáveis), tubos de microcentrífuga, solução para capturar o DNA e solução de lavagem. Após a identificação dos tubos coletores, cada qual com sua coluna adaptada, procedeu-se à aplicação das amostras (50 μ l) junto com 500 μ l do tampão de captura (acetato). Centrifugou-se a 20.000 x g, em microcentrífuga, por 30 segundos, descartando-se o material centrifugado. À coluna contendo o DNA, aplicaram-se 500 μ l de um tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA), procedendo-se novamente a centrifugação com descarte do material. A coluna foi então transferida para um tubo de microcentrífuga estéril e aplicaram-se 50 μ l de TE pH 8,0. Em temperatura ambiente, aguardou-se aproximadamente 5 minutos e centrifugou-se a 20.000 x g por 2 minutos; o material centrifugado contém o DNA purificado. A pureza das amostras também foi certificada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5%.

3.9 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO

O método utilizado, descrito inicialmente por Sanger em 1981, baseia-se na síntese de uma fita de DNA por uma enzima DNA polimerase a partir de um molde de fita simples,

interrompendo esta duplicação quando há incorporação de um dideoxinucleotídeo (ddNTP), que, por não possuir o grupo hidroxila ligado ao carbono 3', não é capaz de sofrer nova esterificação, interrompendo a extensão da cadeia.

A reação de sequenciamento do DNA foi realizada com o Kit de sequenciamento Big Dye Terminators (ABI Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). Para que ocorra a reação, é necessário um mix (*Terminator Ready Reaction Mix*), fornecido pelo kit que contém os ddNTP's, os dNTP's, a enzima polimerase, MgCl₂ e tampão Tris-HCl, pH=9.0. Os componentes utilizados para essa etapa estão listados na tabela 3.

Tabela 3: Componentes utilizados para a reação de sequenciamento e suas quantidades

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
<i>Terminator Ready Reaction Mix</i>	2µl
Tampão de incubação	3µl
Produto de PCR	100 ng
Iniciador	3,2 pmoles
Água deionizada	q.s.p. 20 µl
Total	20 µl

Existem três passos principais na reação de sequenciamento, que podem ser repetidos por 25 a 30 ciclos. Esses passos são:

1. Desnaturação do DNA a 96° C por 30 segundos: durante a desnaturação, a fita dupla de DNA se abre, formando duas fitas simples, sendo que todas as reações enzimáticas são paralisadas (por exemplo, a extensão do ciclo anterior).

2. Anelamento a 50° C por 15 segundos: na reação de sequenciamento, somente um iniciador é usado. Desta forma, somente uma fita é copiada (na PCR dois iniciadores são usados, formando duas fitas cópias). O iniciador se liga à fita simples por meio de ligações iônicas. Uma vez ligado em uma região específica e complementar da fita simples, a polimerase inicia a formação da fita complementar.

3. Extensão a 60° C por 4 minutos: após o anelamento, a temperatura é elevada a 60° C, que é a temperatura ideal de ação da polimerase (normalmente é de 72° C, mas, devido à presença de ddNTP's, que são quimicamente modificados pela fluorescência, a temperatura é diminuída para 60° C para que haja tempo de incorporação dessas moléculas quimicamente modificadas). A partir desse momento, as bases são adicionadas de forma complementar à fita simples que está disponível para ser copiada. Pode ser adicionado tanto um dNTP quanto um ddNTP à fita nascente. Quando um ddNTP é incorporado, a reação de extensão é paralisada, uma vez que esse dideoxynucleotídeo contém um átomo de hidrogênio no terceiro átomo de carbono (o dNTP contém um grupo OH nesta posição). Como os ddNTP são fluorescentes, é possível identificar a cor da última base fluorescente adicionada, por meio da leitura pelo sequenciador automático.

Após 25 ciclos de repetição, o produto final foi precipitado em álcool isopropílico 75%, durante 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugado por 25 minutos a 16.000 x g, descartando-se em seguida o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em etanol 70% e novamente centrifugado por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o produto foi seco a 80° C por 2 minutos, adicionando-se em seguida 12µl da solução TSR (*Template Suppression Reagent*, ABI PRISM/USA) para que o sequenciador automático possa fazer a leitura em eletroforese por capilaridade. Foi utilizado, como equipamento de leitura da reação de sequenciamento, o aparelho ABI PRISM 310 Genetic Analyser. As soluções utilizadas nesta etapa estão descritas no anexo S.

3.10 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO

As endonucleases são enzimas que possuem a propriedade de reconhecer certas seqüências de bases de clivar a molécula de DNA nessas regiões. Essas enzimas são chamadas enzimas de restrição, e as seqüências reconhecidas são os sítios de restrição. A digestão de fragmentos de DNA com enzimas de restrição é utilizada na identificação de mutações capazes de promover alteração em sítios reconhecidos por enzimas específicas (Myers & Parry, 1994). Com isso, pode-se visualizar a presença/ausência de mutações nos referidos sítios de restrição ou inserção/deleção na região analisada. A técnica consiste na incubação do DNA em estudo com uma endonuclease, em tampão específico, a uma dada temperatura recomendada para cada enzima. Após o período de incubação, o material digerido é submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida e posteriormente corado pela prata, com descrito anteriormente, para visualização e análise dos fragmentos obtidos.

Para digestão do exon 1 do gene HRPT2, foi utilizada a endonuclease Hae III (New England Biolabs, USA), que reconhece e cliva a seqüência GGCC.

O protocolo utilizado, de acordo com as especificações do fabricante, consistiu na incubação, de cerca de 300 ng do produto de PCR a ser analisado, com 5 U da enzima HaeIII, 1,5 µl de tampão (NEBuffer 2 10x, New England Biolabs), e água num volume final de 20 µl, a 37°C Durante 4h e posterior inativação térmica a 80° por 25 minutos. Após a digestão os produtos da reação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e corados pela prata.

4 - RESULTADOS

4. RESULTADOS:

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula ou maxila

O paciente avaliado neste trabalho (II:3, figura 3) apresentou quadro clínico compatível com o descrito na literatura para a síndrome de HPT-JT. O diagnóstico de hiperparatireoidismo foi feito aos 26 anos de idade, bem mais jovem que a idade média de diagnóstico do adenoma esporádico de paratireóide. A doença apresentou comportamento agressivo, sendo o paciente bastante sintomático e com níveis de cálcio sérico bastante elevados e PTH cerca de 7 a 8 vezes maior que o limite superior da normalidade. Houve recidiva do quadro de hiperparatireoidismo com exérese de um segundo adenoma cerca de dez anos após o aparecimento do primeiro adenoma, sendo a ocorrência de múltiplos adenomas também um achado freqüente na síndrome de HPT-JT.

O paciente apresentava tumor de maxila compatível com fibroma ossificante central ao exame radiológico (figura 5) e, embora não tenha sido submetido à biópsia, a constatação da persistência do tumor após mais de dez anos da correção da hipercalcemia excluiu a hipótese de tumor marrom.

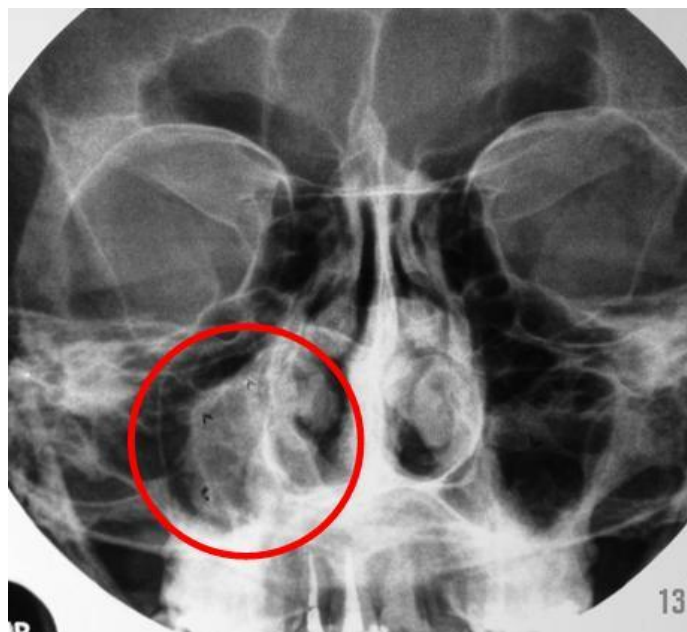


Figura 5: Raio X região maxilar: tumor de partes moles, bem delimitado, em região maxilar direita.

4.1.2 Hiperparatireoidismo Familiar Isolado

Estudamos uma família com oito indivíduos com diagnóstico de hiperparatireoidismo primário, em duas gerações afetadas, sem outras endocrinopatias associadas e após 30 anos de seguimento desde o diagnóstico do caso índice. O padrão de herança observado é sugestivo de transmissão autossômica dominante. Embora nenhum membro da família apresente tumor de maxila ou mandíbula sugestivo de lesão fibro-óssea benigna, a apresentação clínica dos pacientes afetados os aproxima do descrito para HPT-JT, em contraste com o quadro típico dos pacientes portadores de MEN 1 ou adenoma esporádico de paratireóide, reforçando a associação do HPFI com a síndrome de HPT-JT. A tabela 4 resume os achados clínicos dos pacientes afetados.

Tabela 4: Características dos membros afetados da família com HPFI

<i>Paciente</i>	<i>sexo</i>	<i>Idade ao diagnóstico</i>	<i>Histologia paratireoideana</i>	<i>Lesões associadas</i>	<i>Quadro clínico</i>
II:2	M	65 anos	Adenoma		poliúria, polidipsia, emagrecimento, nervosismo
II:6	M	52 anos	–	cistos renais bilaterais	poliúria, polidipsia, HAS, IRC, IAM
II:10	F	34 anos	adenoma atípico		poliúria, polidipsia, dor óssea, nervosismo, massa cervical palpável
II:12	F	34 anos	adenoma recorrente adenoma com alterações císticas		poliúria, polidipsia, dor óssea, massa cervical palpável, emagrecimento, tumor marrom
II:14	F	38 anos	adenoma com alterações císticas	mioma uterino	poliúria, polidipsia, nefrolitíase, dor óssea, nervosismo, massa cervical palpável, úlcera péptica
II:15	F	37 anos	adenoma	leiomioma renal endometriose/metrorragia	poliúria, polidipsia, nefrolitíase
III:4	M	27 anos	adenoma recorrente		poliúria, polidipsia, dor óssea, nervosismo, fraturas de punho
III:6	M	26 anos	adenoma		fraturas de punho e antebraço

M: masculino F: feminino

4.2 Estudo do gene *HRPT2*

DNA genômico foi extraído de leucócitos periféricos do probando (II:3), portador de HPT-JT, e dos seus familiares II:2, III:1 e III:2, não afetados e dos membros II:12, II:14 e III:4 da família portadora de HPFI. DNA tumoral foi extraído de adenomas de paratireóide do paciente II:3, portador de HPT-JT, e do paciente III:4 da família com HPFI. A quantificação em espectrofotômetro confirmou a obtenção de material de boa qualidade.

O DNA obtido foi usado para amplificação dos 17 exons do gene *HRPT2*, compreendendo toda a região codificadora do gene. Os produtos amplificados, utilizando-se os iniciadores específicos, corresponderam aos fragmentos esperados, visualizados no gel de poliacrilamida (figura 6). Os controles negativos de todas as reações não mostraram amplificação, excluindo a possibilidade de contaminantes na reação.

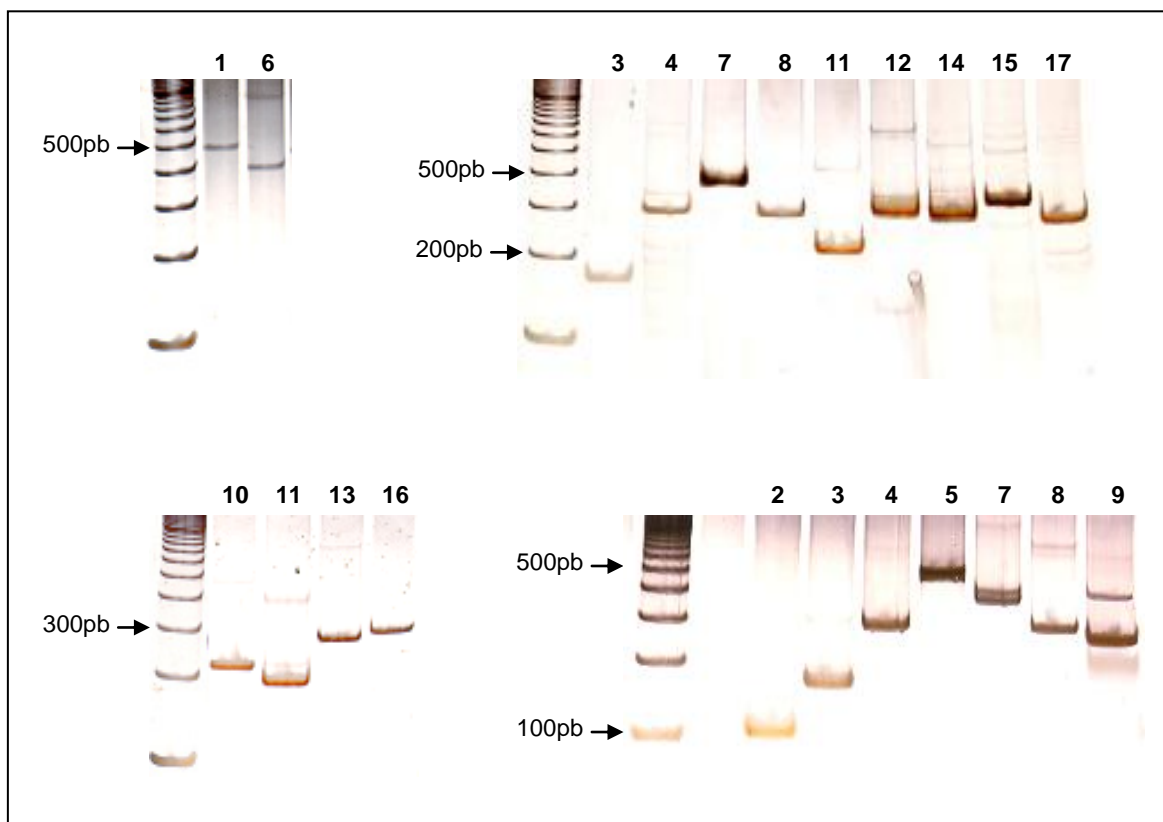


Figura 6: Produtos de PCR mostrando a amplificação dos 17 exons do gene *HRPT2*. Acima de cada canaleta encontra-se o número do exon amplificado.

4.2.1 Hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula ou maxila (HPT-JT)

Inicialmente, todos os exons do gene *HRPT2* foram amplificados a partir do DNA tumoral extraído do adenoma de hipófise do paciente II:3 e seqüenciados. Foi encontrada uma deleção de duas bases no exon 7, em heterozigose (679delAG), levando a uma alteração da janela de leitura. A mesma mutação foi encontrada no DNA genômico do paciente (Figura 7). Não foram encontradas alterações nos outros 16 exons seqüenciados.

O exon 7 foi então amplificado e seqüenciado a partir do DNA genômico dos familiares II:2, III:1 e III:2, não se encontrando alterações.

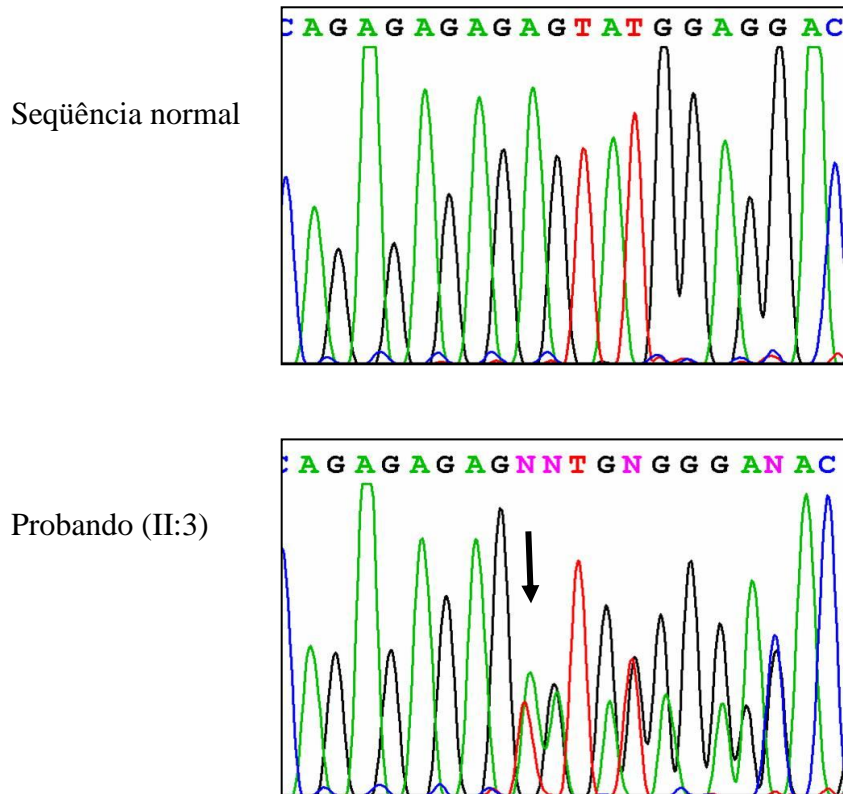


Figura 7: Cromatograma mostrando a deleção de uma adenina e uma guanina no exon 7 do gene *HRPT2* em heterozigose, no probando (II:3, figura 3), portador de HPT-JT.

4.2.2 Hiperparatireoidismo Familiar Isolado (HPFI)

Todos os 17 exons do gene *HRPT2* foram amplificados a partir do DNA tumoral do paciente III:4. Foi encontrada uma substituição de um G por um A no exon 1 (96 G>A), aparentemente em homozigose. O exon 1 foi então amplificado a partir do DNA genômico de membros afetados da família, encontrando-se a mesma mutação, porém em heterozigose. (Figura 8)

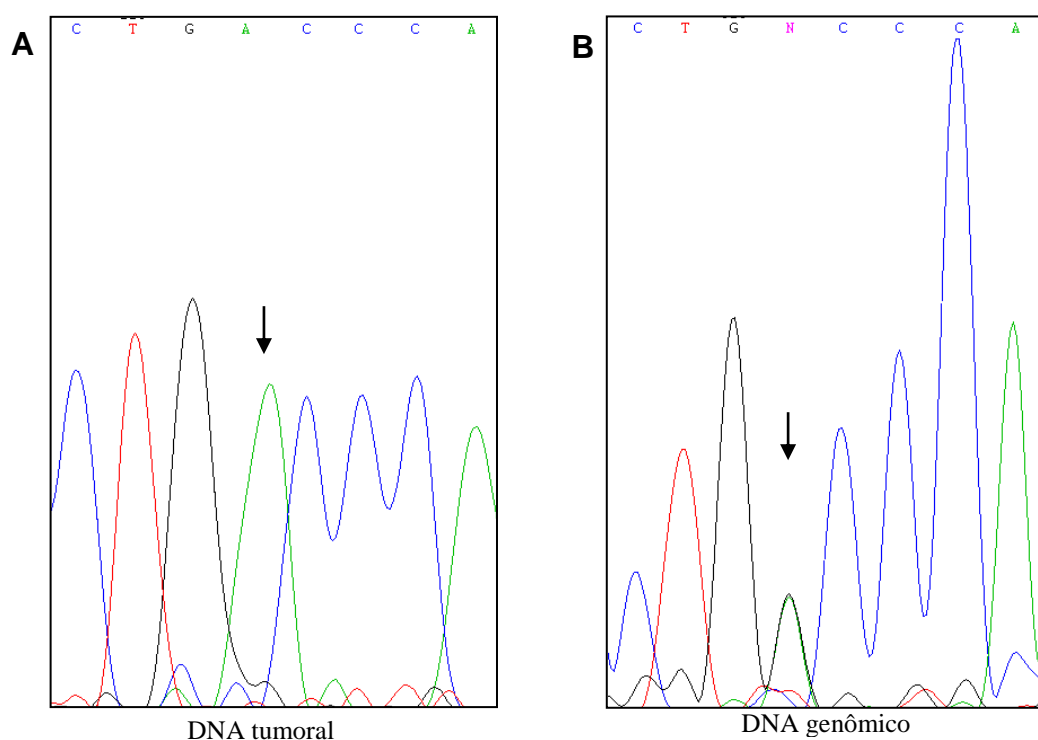


Figura 8: Cromatograma do seqüenciamento do exon 1 do gene *HRPT2* mostrando em substituição de uma guanina por uma adenina (TGG→TGA) no DNA tumoral do paciente III:4, com HPFI (A) e a mesma mutação em heterozigose no DNA genômico (B).

4.2.2.1 Análise de restrição no exon 1 do gene *HRPT2*

A mutação encontrada no exon 1 do gene *HRPT2*, na família portadora de HPFI foi confirmada por análise de restrição com a enzima *HaeIII*, a qual reconhece e cliva a seqüência GGCC. A seqüência selvagem do exon 1 apresenta dois sítios de restrição para a enzima *HaeIII*, de maneira que após a digestão obtém-se três fragmentos de 255, 156 e 57pb. A seqüência mutada perde um dos sítios de restrição (GGCC é substituído por GACC), obtendo-se então apenas dois fragmentos de 312 e 156pb. Produtos de PCR do DNA tumoral e genômico foram submetidos a análise de restrição, confirmando-se que a alteração encontrada está presente tanto no tumor quanto no sangue, constituindo portanto uma mutação germinativa. (figura 8)

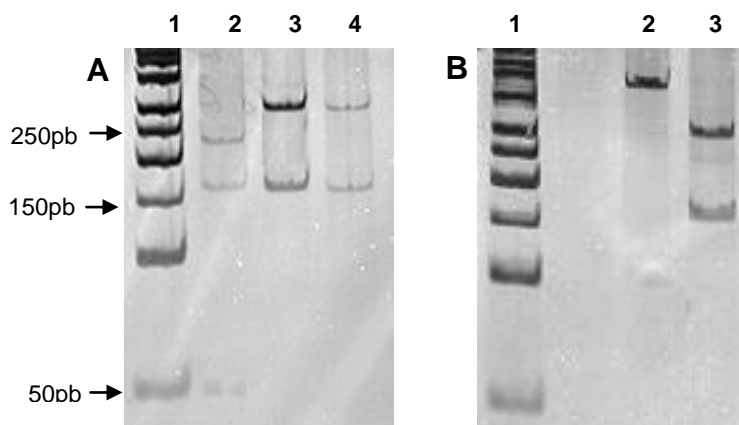


Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, mostrando os produtos da digestão do exon 1 do gene *HRPT2* pela enzima *HaeIII*. A, canaleta 1: padrão de peso molecular, canaleta 2: amostra normal, canaleta 3: DNA tumoral do paciente III:4 (HPFI), canaleta 4: DNA genômico da paciente II:12 (HPFI). B, canaleta 1: padrão de peso molecular, canaleta 2: DNA tumoral paciente III:4 sem enzima, canaleta 3: digestão do DNA tumoral do paciente III:4.

5 - DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO:

Neste trabalho, descrevemos clínica e laboratorialmente um paciente portador de HPT-JT e uma família portadora de HPFI e relatamos os resultados da análise do gene *HRPT2* nessas duas patologias. A evolução e as características clínicas dos pacientes mostraram, em ambos os casos, hiperparatireoidismo de comportamento mais agressivo e diagnosticado em pacientes mais jovens do que o encontrado, em média, nos casos de hiperparatireoidismo primário esporádico.

5.1 HIPERPARATIREOIDISMO ASSOCIADO A TUMOR DE MANDÍBULA OU MAXILA

O paciente descrito neste estudo apresenta diagnóstico clínico da síndrome de HPT-JT com quadro clínico característico, de acordo com o descrito na literatura (Chen *et al.*, 2003). O paciente foi diagnosticado aos 26 anos de idade, apresentando níveis muito elevados de PTH e Cálcio sérico, com quadro clínico bastante exuberante, requerendo propedêutica mais aprofundada. Miedlich *et al* (2003) sugerem que uma síndrome familiar deve ser suspeitada sempre diante de hiperparatireoidismo em pacientes jovens (<40 anos), com doença multiglandular, adenomas atípicos ou recorrentes ou carcinoma de paratireóide. O hiperparatireoidismo isolado raramente é diagnosticado antes dos 50 anos e, na grande maioria dos casos, é causado por adenomas solitários de paratireóide. A doença apresentou comportamento agressivo, sendo o paciente bastante sintomático e com níveis de cálcio sérico bastante elevados e PTH cerca de 7 a 8 vezes maior que o limite

superior da normalidade, ao contrário do adenoma esporádico, no qual os pacientes são geralmente assintomáticos, com níveis pouco elevados de cálcio e PTH.

A tumoração em região maxilar levantou a suspeita inicial de tumor marrom, compatível com a gravidade do caso. Porém, essa possibilidade foi descartada ao exame radiológico e, principalmente, pela ausência de remissão após a ressecção cirúrgica de um adenoma de paratireóide e remissão da hipercalcemia, em contraste com as outras alterações ósseas (reabsorção subperiosteal e osteopenia) que melhoraram após a cura do hiperparatireoidismo. Após 10 anos de acompanhamento com Cálcio sérico normal, o paciente apresentou recidiva do hiperparatireoidismo, sendo submetido a exérese de um novo adenoma. A ocorrência de recidiva, ou adenomas acometendo mais de uma paratireóide, simultaneamente ou não, também é característico da síndrome de HPT-JT (Carpten *et al.*, 2002). Lesões renais associadas ao HPT-JT não foram encontradas no nosso paciente, porém estas estão presentes em apenas 40% dos casos (Chen *et al.*, 2003).

Foi identificada uma deleção de duas bases no exon 7 (679delAG) do gene *HRPT2*, no DNA genômico desse paciente, levando a uma alteração da janela de leitura e, conseqüentemente, a uma proteína truncada. Apesar do HPT-JT ser uma síndrome familiar de herança autossômica dominante, esse é um caso aparentemente esporádico. Os pais do probando não foram investigados geneticamente, porém não havia nenhuma história familiar hiperparatireoidismo e nem sinais clínicos ou laboratoriais de sugestivos da doença nos familiares investigados. Podemos então considerar a hipótese de que esse paciente tenha apresentado uma mutação *de novo*. Essa afirmação não pode ser feita com certeza, pois existe a possibilidade de um dos pais ser portador assintomático da mutação, já que o HPT-JT é uma síndrome com penetrância incompleta e até 30% dos pacientes podem ser portadores silenciosos (Simonds *et al.*, 2004; Bradley *et al.*, 2005).

A mutação aqui descrita já havia sido relatada previamente por Howell *et al.* (2003) numa família também portadora de HPT-JT. Até o momento já foram descritas 45 mutações no gene *HRPT2*, distribuídas por toda a região codificadora, porém os exons 1 e 7 são os mais afetados. O exon 7, além de ser o maior exon do gene, contém um elemento de repetição (AG)₅, que pode ser considerado uma área de instabilidade genômica, sendo uma possível área de inserções e deleções. De fato, além da mutação aqui relatada, encontrada pela segunda vez, outra mutação alterando essa mesma região, 679insAG, já foi descrita em cinco ocasiões diferentes, em pacientes/famílias de origens também diferentes (Carpten *et al.*, 2002; Shattuck *et al.*, 2002; Simonds *et al.*, 2004; Bradley *et al.*, 2005). Essas duas mutações (679insAG e 679delAG) ilustram bem a falta de correlação entre genótipo e fenótipo observadas nas patologias associadas ao *HRPT2*. Dentre os cinco casos descritos com a mutação 679insAG, encontramos formas de apresentação variadas: um caso de carcinoma esporádico de paratireóide, três famílias com HPT-JT, sendo que em duas delas havia casos de carcinoma e adenoma de paratireóide e na outra o hiperparatireoidismo se apresentava como adenoma de paratireóide e, finalmente, uma família portadora de HPFI com casos de carcinoma e adenoma de paratireóide. Já a mutação aqui descrita (679delAG), afetando a mesma região, foi encontrada em dois casos de HPT-JT, sem carcinoma. Outro exemplo é a mutação nonsense 700C>T, encontrada em dois casos de carcinoma esporádico e um caso de HPT-JT.

Mutações no gene *HRPT2* são encontradas em cerca de 50% das famílias portadoras de HPT-JT (Carpten *et al.*, 2002; Bradley *et al.*, 2005). Todas as mutações descritas são de natureza inativadora, reforçando a associação desse gene com a síndrome. A ausência de mutações na sequência codificadora do gene no restante das famílias poderia ser atribuída a mutações em regiões promotoras ou outras regiões regulatórias ainda não definidas, ou

até mesmo grandes deleções ou rearranjos complexos envolvendo o gene *HRPT2*. O caso descrito no nosso trabalho corrobora o papel do gene *HRPT2* na patogênese do HPT-JT.

5.2 HIPERPARATIREOIDISMO FAMILIAR ISOLADO

O HPFI é composto por um grupo heterogêneo de pacientes e pouco mais de 100 famílias estão descritas na literatura (Huang *et al.*, 1997; Teh *et al.*, 1998). A maioria dos relatos envolve doença multiglandular, entre hiperplasia e adenomas múltiplos, com graus variáveis de agressividade.

Ainda não se sabe se esta é uma patologia isolada ou uma variante alélica, com penetrância incompleta de outras síndromes, principalmente a MEN 1 e HPT-JT, já que mutações nos genes responsáveis por essas duas síndromes já foram encontradas em indivíduos portadores de HPFI (Chen *et al.*, 2003). Em grande parte dessas famílias, no entanto, a base genética permanece desconhecida. Além do mais, algumas famílias apresentadas inicialmente como HPFI, eventualmente desenvolvem o quadro completo de MEN 1 ou HPT-JT, o que vem a dificultar ainda mais a caracterização clínica da síndrome (Villablanca *et al.*, 2002).

Descrevemos uma família portadora de HPFI, com duas gerações de membros afetados. O caso índice vem sendo acompanhado há 31 anos, sem evidências de tumores endócrinos em outros membros da família. Nessa família, a maioria dos membros afetados apresentou quadro de hiperparatireoidismo agressivo, com hipercalcemia importante, níveis bastante elevados de PTH e acometimento ósseo e renal. A idade média do diagnóstico foi de 39 anos, cerca de 20 anos mais cedo que no hiperparatireoidismo primário esporádico em geral. O diagnóstico histopatológico em todos os oito casos

examinados foi de adenoma de paratireóide. Em dois desses casos existiam alterações císticas e um caso havia adenoma atípico. Houve dois casos de recorrência do hiperparatireoidismo, com ressecção de um segundo adenoma. Um dos pacientes apresentava cistos renais, e tumores uterinos estavam presentes em duas das quatro mulheres afetadas. As características clínicas dessa família são bastante semelhantes às geralmente encontradas na síndrome de HPT-JT, exceto pela ausência de tumores de mandíbula ou maxila. Como estes não foram detectados mesmo após um longo período de seguimento, consideramos baixa a probabilidade que um quadro completo de HPT-JT venha a se manifestar.

Detectamos nessa família uma mutação germinativa inédita no gene *HRPT2*. Foi encontrada uma transição de G para A na posição 96 levando a um códon de parada prematuro (W32X) no exon 1. A mutação foi encontrada em heterozigose no DNA genômico e em aparente homozigose no DNA extraído do adenoma de paratireóide de um dos membros afetados. Pode-se presumir que, na verdade, tenha ocorrido perda do alelo normal na amostra tumoral e a mutação esteja presente no alelo restante em hemizigose, representando um exemplo típico da teoria de “*two hits*” (Knudson, 1985), reforçando o papel do *HRPT2* como um gene supressor tumoral.

A família descrita neste trabalho representa o oitavo caso de HPFI com uma mutação confirmada do gene *HRPT2*. A presença de uma nova mutação inativadora no gene *HRPT2* numa família portadora de HPFI reforça a associação dessa síndrome com o HPT-JT, sugerindo que esses casos representam uma variante da síndrome de HPT-JT (Teh *et al.*, 1998). Alguns autores (Howell *et al.*, 2003; Villablanca *et al.*, 2004) investigaram se o tipo ou localização da mutação poderia influenciar na penetrância das lesões associadas ao HPT-JT, determinando a apresentação clínica, como ocorre na MEN 2, porém nenhum tipo

de correlação genótipo-fenótipo foi encontrado e por vezes a mesma mutação pode ser responsável por um quadro de HPT-JT ou por HPFI, com descrito na seção anterior.

O HPFI também poderia ser considerado em alguns casos como uma variante da MEN 1, já que mutações do gene *MEN 1* foram encontradas em 25 famílias portadoras de HPFI. A grande maioria dessas famílias apresentava doença multiglandular ou hiperplasia de paratireóides, com hipercalcemia leve, apresentação semelhante à usualmente encontrada na MEN 1. Em apenas duas dessas famílias foi constatada a presença de carcinoma de paratireóides em um dos membros afetados (Sato *et al.*, 1998; Ohye *et al.*, 1998; Villablanca *et al.*, 2002; Pannett *et al.*, 2003; Carrasco *et al.*, 2004; Warner *et al.*, 2004). Em contrapartida, as oito famílias portadoras de HPFI, nas quais foram detectadas mutações no gene *HRPT2*, incluindo a descrita nesse trabalho, apresentaram hiperparatireoidismo agressivo, com acometimento ósseo e renal, com diagnóstico histopatológico de adenoma, em alguns casos recorrente, com atipias ou alterações císticas e carcinoma de paratireóide em duas famílias, como geralmente observado nos casos clássicos de HPT-JT. Em nenhum dos casos foi caracterizada hiperplasia de paratireóides.

Essas observações nos permitem sugerir a que o HPFI pode ser subdividido pelo menos em dois grandes grupos. O primeiro seria uma variante da MEN 1, caracterizado por formas mais leves de hiperparatireoidismo, geralmente apresentando-se como doença multiglandular e associado a mutações no gene *MEN 1*. O segundo, caracterizado por hiperparatireoidismo mais agressivo, adenomas atípicos ou carcinoma de paratireóide, geralmente associado a mutações no gene *HRPT2*, poderia ser considerado uma variante do HPT-JT.

Em várias famílias, no entanto, nenhum tipo de mutação foi encontrado (Simonds *et al.*, 2004). Nesses casos, não se sabe se existe outro gene envolvido na patogênese do HPFI ou se, como sugerido para a síndrome de HPT-JT, o seqüenciamento da região

codificadora do *HRPT2* não identificou mutações presentes nas regiões promotoras ou outras regiões regulatórias.

5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A recente identificação do gene *HRPT2* oferece uma nova e importante ferramenta na investigação dos casos de hiperparatireoidismo familiar. O esclarecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese das síndromes associadas ao hiperparatireoidismo é de fundamental importância para o entendimento das características clínicas e fisiopatológicas, classificação e prognóstico desses grupos de doentes.

As síndromes associadas ao gene *HRPT2* apresentam um fenótipo variado e ainda não totalmente caracterizado, embora a associação de mutações no *HRPT2* com formas mais agressivas de hiperparatireoidismo pareça estar estabelecida. Além das complicações decorrentes da hipercalcemia grave e o risco de lesões renais, é importante notar que pacientes com mutações no gene *HRPT2* apresentam risco aumentado de desenvolver carcinoma de paratireóide, e, nesse caso, o diagnóstico precoce seria de grande valia.

Considerando-se a variabilidade fenotípica dessas síndromes e as dificuldades na distinção histológica entre adenoma, hiperplasia e carcinoma, o diagnóstico genético pode ter grande valor na decisão terapêutica, prognóstico e aconselhamento genético desses pacientes. Clinicamente, é importante diferenciar esses pacientes dos casos associados à MEN 1 ou a alterações no CaSR, pois a condução dos casos é bastante distinta em cada um deles. Por outro lado, a precisão do estudo genético permite um rastreamento mais fácil, seguro e econômico das famílias dos pacientes afetados, pois propiciaria a identificação e o

tratamento precoce dos membros afetados e evitaria exames desnecessários nos familiares sem a alteração genética identificada.

Alguns autores sugerem que o rastreamento para mutações no *HRPT2* seja feito em todos os casos de suspeita clínica de HPT-JT ou HPFI, além de todos os casos de carcinoma aparentemente esporádico de paratireóide (Chen *et al.*, 2003; Howell *et al.*, 2003; Shattuck *et al.*, 2003). Por outro lado, foi sugerido que o rastreamento para mutações no gene *HRPT2* não deveria ser rotineiramente utilizado nos portadores de HPFI, pois o sequenciamento dos 17 exons do gene é um processo caro, demorado e com poucas chances de trazer um resultado imediato para o paciente e sua família, embora recomende o teste para portadores de HPT-JT clinicamente comprovado (Warner *et al.*, 2004).

Apesar de não haver consenso sobre quais pacientes seriam candidatos ao rastreamento genético, recomenda-se que os pacientes suspeitos ou portadores assintomáticos da mutação sejam submetidos a um acompanhamento periódico que inclui a dosagem anual de Cálcio sérico a partir dos 15 anos de idade, exame radiológico da face a cada três anos e ultrassonografia abdominal anual. O rastreamento genético de familiares de pacientes afetados evitaria que indivíduos não portadores de mutação fossem submetidos a exames desnecessários.

A importância de identificar as bases moleculares nos casos de hiperparatireoidismo familiar deve-se ao fato de que as várias síndromes existentes possuem características clínicas e genéticas próprias, levando a prognóstico e tratamento bastante distintos. Nesse trabalho, contribuimos para a melhor caracterização clínica e genética de duas síndromes de hiperparatireoidismo familiar, associadas a formas mais agressivas da doença, reforçando a associação de mutações no gene *HRPT2* com o HPT-JT e com o HPFI, demonstrando que, em pelo menos uma parcela dos casos, principalmente naqueles de comportamento mais agressivo, o HPFI parece ser uma variante fenotípica do HPT-JT

6 - CONCLUSÕES

6. Conclusões:

No presente trabalho, identificamos uma mutação inativadora no gene *HRPT2* em um paciente portador de HPT-JT e uma mutação inédita em uma família portadora de HPFI. Essa mutação foi previamente descrita por Howell *et al* (2003) em uma família portadora de HPT-JT.

As mutações aqui descritas corroboram o papel do gene *HRPT2* na patogênese do HPT-JT e reforçam a associação do HPFI com o HPT-JT.

A identificação de uma mutação inativadora no gene *HRPT2* na família portadora de HPFI confirma que ela pode ser classificada como uma variante do HPT-JT.

É importante identificar a alteração genética nos casos de hiperparatireoidismo familiar, já que as várias síndromes descritas possuem características clínicas e genéticas próprias, com prognóstico e tratamento distintos.

O *HRPT2* parece estar associado a formas mais agressivas de hiperparatireoidismo e, portanto, é importante estar atento para a possibilidade diagnóstica, para que screening adequado seja feito nos pacientes suspeitos.

Estudos clínicos e genéticos em um maior número de famílias poderam contribuir cada vez mais para o esclarecimento da expressão clínica e história natural do HPT-JT e HPFI.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal SK, Guru SC, Heppner C, *et al.* Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell*. 1999; 96: 143-152
- Arnold A, Shattuck TM, Mallya SM, *et al.* Molecular pathogenesis of primary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res*. 2002; Suppl 2: N30-6.
- Arnold A, Staunton CE, Hyung GK, Gaz RD, Kronenberg HM. Monoclonality and abnormal parathyroid hormone genes in parathyroid adenomas. *N Engl J Med*. 1988; 318:658-662.
- Arnold A, Kim HG, Gaz RD, *et al.* Molecular cloning and chromosomal mapping of DNA rearranged with the parathyroid hormone gene in a parathyroid adenoma. *J Clin Invest*. 1989; 83:2034-2040.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1991;196(1):80-3.
- Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; 235:305-311.
- Bradley KJ, Hobbs MR, Buley ID, *et al.* Uterine tumours are a phenotypic manifestation of the hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *J Intern Med*. 2005;257(1):18-26.
- Carling T, Correa P, Hessman O, *et al.* Parathyroid MEN1 gene mutations in relation to clinical characteristics of nonfamilial primary hyperparathyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83(8): 2960-2963.

- Carling T, Szabo E, Bai M, *et al.* Familial hypercalcemia and hypercalciuria caused by a novel mutation in the cytoplasmic tail of the calcium receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 2042–2047.
- Carling T. Molecular pathology of parathyroid tumors. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12(2):53-8.
- Carpten JD, Robbins CM, Villablanca A, *et al.*. HRPT2, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *Nat Genet.* 2002;32(4) :676-80.
- Carrasco CA, Gonzalez AA, Carvajal CA, *et al.* Novel intronic mutation of MEN1 gene causing familial isolated primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):4124-9.
- Caudill R, Saltzman D, Gaum S, Granite E. Possible relationship of primary hyperparathyroidism and fibrous dysplasia: report of case. *J Oral Surg.* 1977;35(6):483-90.
- Cavaco BM, Barros L, Pannett AA, *et al.* The hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome in a Portuguese kindred. *QJM.* 2001;94(4):213-22.
- Cavaco BM, Guerra L, Bradley KJ, *et al.*. Hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome in Roma families from Portugal is due to a founder mutation of the HRPT2 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(4):1747-52.
- Cavenee W.K., Dryja T.P., and Phillips R.A. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma *Nature.* 1983;305: 779-784.

- Cetani F, Pardi E, Giovannetti A, *et al.*. Genetic analysis of the MEN1 gene and HPRT2 locus in two Italian kindreds with familial isolated hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;56(4):457-64.
- Cetani F, Pardi E, Borsari S, *et al.* Genetic analyses of the HRPT2 gene in primary hyperparathyroidism: germline and somatic mutations in familial and sporadic parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(11):5583-91
- Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, *et al.*. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science*. 1997; 276: 404-407
- Chen JD, Morrison C, Zhang C, Kahnoski K, Carpten JD, Teh BT. Hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *J Intern Med*. 2003;253(6):634-42.
- Cryns VC, Thor A, Xu HJ, *et al.* Loss of the retinoblastoma tumor suppressor gene in parathyroid carcinoma. *N Engl J Med*. 1994; 330:757-761.
- Farnebo F, Teh BT, Kytola S, *et al.* Alterations of the MEN1 gene in sporadic parathyroid tumours. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83(8): 2627-2630.
- Friedman E, Sakaguchi K, Bale AE, *et al.* Clonality of parathyroid tumors in familial multiple endocrine neoplasia type 1. *N Engl J Med*. 1989;321(4):213-8.
- Friedman E, De Marco L, Gejman PV, *et al.* Allelic loss from chromosome 11 in parathyroid tumors. *Cancer Res*. 1992;52(24): 6804-9.
- Garrett JE, Capuano IV, Hammerland LG, *et al.* Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *J Biol Chem*. 1995;270(21):12919-25.

- Goldman L, Smyth FS. Hyperparathyroidism in siblings. *Ann Surg.* 1936; 104: 971-981.
- Haven CJ, Wong FK, van Dam EW, *et al.* A genotypic and histopathological study of a large Dutch kindred with hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(4):1449-54
- Haven CJ, Howell VM, Eilers PH, *et al.* Gene expression of parathyroid tumors: molecular subclassification and identification of the potential malignant phenotype. *Cancer Res.* 2004;64(20):7405-11.
- Hobbs MR, Pole AR, Pidwirny GN, *et al.* Hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome: the HRPT2 locus is within a 0.7-Cm region on chromosome 1q. *Am J Hum Genet.* 1999;64(2):518-25.
- Hsi ED, Zukerberg LR, Yang WI, Arnold A. Cyclin D1/PRAD1 expression in parathyroid adenomas: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1736–1739.
- Heppner C, Kester MB, Agarwal SK, *et al.* Somatic mutation of the MEN1 gene in parathyroid tumours. *Nature Genetics* 1997; 16(4): 375-378.
- Heppner C, Bilimoria KY, Agarwal SK, *et al.* The tumour suppressor protein and inhibits NF-kappaBmediated transactivation. *Oncogene* 2001;20(36):4917–4925.
- Honda M, Tsukada R, Tanaka H *et al.* A novel mutation of the MEN 1 gene in a Japanese kindred with familial isolated hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 142: 138-143.

- Howell VM, Haven CJ, Kahnoski K, *et al.* HRPT2 mutations are associated with malignancy in sporadic parathyroid tumours. *J Med Genet.* 2003;40(9):657-63.
- Howell VM, Zori RT, Stalker HJ, William C, *et al.* A molecular diagnosis of hyperparathyroidism -jaw tumor syndrome in an adolescent with recurrent kidney stones. *J Pediatr.* 2004; 145: 567.
- Huang SM, Duh QY, Shaver J, Siperstein AE, Kraimps JL, Clark OH. Familial hyperparathyroidism without multiple endocrine neoplasia. *World J Surg.* 1997 Jan;21(1):22-8.
- Inoue H, Miki H, Oshimo K, *et al.* Familial hyperparathyroidism associated with jaw fibroma: case report and literature review. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1995;43(2):225-9.
- Kaji H, Canaff L, Lebrun JJ, Goltzman D, Hendy GN. Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type beta signalling. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(7):3837-2842.
- Kas K, Weber G, Merregaert J, *et al.* Exclusion of FAU as the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1) gene. *Hum Mol Genet.* 1993; 2: 349-353.
- Kassem M, Xu C, Brask S, Eriksen EF, Mosekilde L, Kruse T. Familial isolated primary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res* 7. 1992; (Suppl 1): S249.
- Kennett, S.; Pollick, H. Jaw lesions in familial hyperparathyroidism. *Oral Surg. Oral Med. Oral Path.* 1971;31(4):502-10.

-
- Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.* 1985;45(4):1437-3.
- Krogan NJ, Dover J, Wood A, *et al.* The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell.* 2003;11(3):721-9.
- Jackson, C. E. Hereditary hyperparathyroidism associated with recurrent pancreatitis. *Ann. Intern. Med.* 1958; 49: 829-836.
- Jackson CE, Norum RA, Boyd SB, *et al.* Hereditary hyperparathyroidism and multiple ossifying jaw fibromas: a clinically and genetically distinct syndrome. *Surgery.* 1990;108(6):1006-12.
- Larsson C, Shepherd J, Nakamura Y, *et al.* Predictive testing for multiple endocrine neoplasia type 1 using DNA polymorphism. *Journal of Clinical Investigation* 1992; 89: 1344-1349.
- Larsson C, Skogseid B, Oberg K, Nakamura Y, Nordenskjold M. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature.* 1988; 332 (6159): 85-7.
- Lewin B. *Genes VI.* Oxford University Press, Oxford. 1999.
- Lopez-Egido J, Cunningham J, BergM, ObergK, Bongcam-Rudloff E, Gobl A. Menin's interaction with glial fibrillary acidic protein and vimentin suggests a role for the intermediate filament network in regulating menin activity. *Exp Cell Res* 2002;278:175–183.
- Marx SJ. Hyperparathyroid and hypoparathyroid disorders. *N Engl J Med.* 2000; 343(25): 1863-75.

- Miedlich S, Krohn K, Paschke R. Update on genetic and clinical aspects of primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003; 59(5):539-54.
- Mihai R. Molecular influences in thyroid and parathyroid surgery. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001, 15(2):177-188.
- Moon SD, Park JH, Kim EM, *et al*. A Novel IVS2-1G>A Mutation Causes Aberrant Splicing of the HRPT2 Gene in a Family with Hyperparathyroidism-Jaw Tumor Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 ;90 (2): 878-83.
- Mulligan LM, Kwok JBJ, Healey CS, *et al*. Germline mutations of the RET protooncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*. 1993; 363: 458±460.
- Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, *et al*. Genotype±phenotype correlation in MEN2: report of the International RET Mutations Consortium. *Journal of Internal Medicine*. 1995; 238: 343±346.
- Ohye H, Sato M, Matsubara S, Miyauchi A, Imachi H, Murao K, Takahara J. Germline mutation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene in a family with primary hyperparathyroidism. *Endocr J*. 1998;45(6):719-23.
- Pannett AA, Kennedy AM, Turner JJ, *et al*. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) germline mutations in familial isolated primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003; 58 (5): 639-46.

-
- Pausova Z, Soliman E, Amizuka N, *et al.* Expression of the RET protooncogene in hyperparathyroid tissues: implications for the pathogenesis of the parathyroid disease in MEN2A. *Journal of Bone and Mineral Research (USA)* 1995; 10 (supplement 1): 249.
- Regezi JA, Kerr DA, Courtney RM. Odontogenic tumors: analysis of 706 cases. *J Oral Surg.* 1978;36(10):771-778.
- Rosen, IB; Palmer, JA Fibrous tumors of the facial skeleton in association with primary hyperparathyroidism: an endocrine syndrome or coincidence? *Am. J. Surg.* 1981;142: 494-498.
- Rosenberg CL, Wong E, Pett EM, *et al.* PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:9638-9641.
- Rozenblatt-Rosen O, Hughes CM, Nannepaga SJ, *et al.* The parafibromin tumor suppressor protein is part of a human paf1 complex. *Mol Cell Biol.* 2005;25(2):612-620.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239(4839):487-491.
- Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science.* 1981;214(4526):1205-1210.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3, 1989.

- Sato M, Matsubara S, Miyauchi A, Ohye H, Imachi H, Murao K, Takahara J. Identification of five novel germline mutations of the MEN1 gene in Japanese multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) families. *J Med Genet.* 1998;35(11):915-9
- Shane, E. Clinical review 122: parathyroid carcinoma. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2001; 86: 485-493.
- Soares, M.M.S. Mecanismos Moleculares de Oncogênese em Adenomas de Paratireóide. 2000. 126f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Shan L, Nakamura M, Nakamura M, Yokoi T, Kakudo K. Genetic alterations in primary and secondary hyperparathyroidism. *Pathol Int.* 1998; 48:569-574.
- Shattuck TM, Valimaki S, Obara T, *et al.* Somatic and germ-line mutations of the HRPT2 gene in sporadic parathyroid carcinoma. *N Engl J Med.* 2003;349(18): 1722-1729.
- Schussheim DH, Skarulis MC, Agarwal SK, *et al.* Multiple endocrine neoplasia type 1: new clinical and basic findings *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12(4):173-178.
- Simonds WF, Robbins CM, Agarwal SK, Hendy GN, Carpten JD, Marx SJ. Familial isolated hyperparathyroidism is rarely caused by germline mutation in HRPT2, the gene for the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(1):96-102.
- Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ, *et al.* Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature.* 1987; 328: 524-526
- Strachan T. and Read A.P. *in* “Human Molecular Genetics.” 1999.

-
- Szabo J, Heath B, Hill VM, *et al.* Hereditary hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome: the endocrine tumor gene *Am J Hum Genet.* 1995;56(4):944-950.
- Tan MH, Morrison C, Wang P, *et al.* Loss of parafibromin immunoreactivity is a distinguishing feature of parathyroid carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(19):6629-6637.
- Teh BT, Farnebo F, Kristoffersson U, *et al.* Autosomal dominant primary hyperparathyroidism and jaw tumor syndrome associated with renal hamartomas and cystic kidney disease: linkage to 1q21-q32 and loss of the wild type allele in renal hamartomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(12):4204-4211.
- Teh BT, Farnebo F, Twigg S, *et al.* Familial isolated hyperparathyroidism maps to the hyperparathyroidism-jaw tumor locus in 1q21-q32 in a subset of families. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(6):2114-2120.
- Teh BT, Esapa CT, Houlston R *et al.*, A Family with Isolated Hyperparathyroidism Segregating a Missense *MEN1* Mutation and Showing Loss of the Wild-Type Alleles in the Parathyroid Tumors. *Am. J. Hum. Genet.*, 1998; 63:1544-1549.
- Thakker RV, Bouloux P, Wooding C, *et al.* Association of parathyroid tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 with loss of alleles on chromosome 11. *N Engl J Med.* 1989;321(4):218-224.
- Thakker RV. Multiple Endocrine Neoplasia Type I. *Endocrinol and Metab Clin of North Am.* 2000;29:541-567.

-
- Thakker R.V. Genetics of Endocrine and Metabolic Disorders: Parathyroid Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders 2004;5:37-51.
- Thompson DB, Samowitz WS, Odelberg S, Davis RK, Szabo. Genetic abnormalities in sporadic parathyroid adenomas: loss of heterozygosity for chromosome 3q markers flanking the calcium receptor locus. J Clin Endocrinol Metab. 1995; 80: 3377-3380.
- Tischfield JA. Loss of heterozygosity or: how I learned to stop worrying and love mitotic recombination. Am J Hum Genet. 1997;61(5):995-999.
- Villablanca A, Wassif WS, Smith T, *et al.* Involvement of the MEN1 gene locus in familial isolated hyperparathyroidism. Eur J Endocrinol. 2002;147(3):313-322.
- Villablanca A, Calender A, Forsberg L, *et al.* Germline and de novo mutations in the HRPT2 tumour suppressor gene in familial isolated hyperparathyroidism (FIHP). J Med Genet. 2004;41(3):e32
- Warnakulasuriya, S. Markwell, B. D. Williams, D. M. Familial hyperparathyroidism associated with cementifying fibromas of the jaws in two siblings. Oral Surg. Oral Med. Oral Path. 1985;59: 269-274.
- Warner J, Epstein M, Sweet A, *et al.* Genetic testing in familial isolated hyperparathyroidism: unexpected results and their implications. J Med Genet. 2004;41(3):155-160.
- Wassif WS, Moniz CF, Friedman E, *et al.* Familial isolated hyperparathyroidism: A distinct genetic entity and increased risk of parathyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 1993;77: 1485-1489.

- Wassif WS, Farnebo F, Teh BT, *et al.* Genetic studies of a family with hereditary hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999; 50(2):191-6.
- Woodard GE, Lin L, Zhang JH, Agarwal SK, Marx SJ, Simonds WF. Parafibromin, product of the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome gene HRPT2, regulates cyclin D1/PRAD1 expression. *Oncogene*. 2004 Dec 06; [Epub ahead of print] PMID: 15580289 [PubMed]
- Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuda A, Sano T, Itakura M. Rare mutations of the Gs alpha subunit gene in human endocrine tumors. *Cancer*. 1993; 72: 1386-1393.

8 - ANEXOS

8 ANEXOS

ANEXO A - Mutações previamente identificadas no gene *HRPT2*

Exon	Nucleotídeo	Aminoácido	Tipo	Fenótipo	Referência
1	3G>A	M1L	germinativa	HPT-JT	Carpten <i>et al</i> , 2002
1	25C>T	R9X	germinativa somática	HPT-JT Ca esporádico	Carpten <i>et al</i> , 2002 Cetani <i>et al</i> , 2004
1	41 bp ins	frameshift	germinativa	HPT-JT +Ca	Carpten <i>et al</i> , 2002
1	34delAACATCC	frameshift	germinativa	HPT-JT	Carpten <i>et al</i> , 2002
1	30delG	frameshift	germinativa	HPT-JT	Carpten <i>et al</i> , 2002
1	39delC	frameshift	germinativa somática	HPT-JT +Ca Ca esporadico	Carpten <i>et al</i> , 2002 Shattuck <i>et al</i> , 2003
1	126del24	frameshift	somática	HPFI	Carpten <i>et al</i> , 2002
1	128G-A	W43X	somática	esporadico	Carpten <i>et al</i> , 2002
1	53delT	frameshift	somática	esporadico	Carpten <i>et al</i> , 2002
1	76delA	frameshift	ND germinativa	Ca esporadico HPT-JT +Ca	Howell <i>et al</i> , 2003 (2x)
1	82del4	frameshift28	somática	Ca esporadico	Shattuck <i>et al</i> , 2003
1	70G>T	E24X	somática	Ca esporadico	Shattuck <i>et al</i> , 2003
1	16delA	frameshift6	ND	Ca esporadico	Shattuck <i>et al</i> , 2003
1	60del10	frameshift20	ND	Ca esporadico	Shattuck <i>et al</i> , 2003
1	IVS1+1G>A		germinativa	FIHP	Cetani <i>et al</i> , 2004
1	IVS2-1G>A		germline	HPT-JT	Moon <i>et al</i> , 2005
1	85delG	frameshift	somática	HPT-JT +Ca	Moon <i>et al</i> , 2005
1	23TGCG>GTG	frameshift8	somática	Ca esporadico	Shattuck <i>et al</i> , 2003
2	165>G	Y55X	germinativa	HPT-JT +Ca	Carpten <i>et al</i> , 2002
2	191T>C	L64P	germinativa	HPFI	Carpten <i>et al</i> , 2002 Howell <i>et al</i> , 2003 Villablanca <i>et al</i> , 2004
2	162C>G	Y54X	ND somática	Ca esporadico	Howell <i>et al</i> , 2003 Shattuck <i>et al</i> , 2003
2	165C-A	Y55X	somática	Ca esporadico	Howell <i>et al</i> , 2003
2	165delC	frameshift	ND	Ca esporadico	Howell <i>et al</i> , 2003
2	226C>T	R76X	somática	Ca esporadico	Shattuck <i>et al</i> , 2003
2	IVS2-1G>C		germinativa	HPFI	Villablanca <i>et al</i> , 2004

2	195insT	frameshift	somática	Ca esporadico	Cetani <i>et al</i> , 2004
2	195insA	frameshift	somática	Ca esporadico	Cetani <i>et al</i> , 2004
3	306delGTgtgagtactttt	frameshift	germinativa	HPT-JT	Carpden <i>et al</i> , 2002
4	356delA	frameshift	germinativa	HPT-JT +Ca	Carpden <i>et al</i> , 2002
5	406A>T	K136X	germinativa	HPT-JT	Carpden <i>et al</i> , 2002
5	373insA	frameshift125	germinativa	Ca esporadico	Shattuck <i>et al</i> , 2003
6	IVS6-1delG		somática	Ca esporadico	Howell <i>et al</i> , 2003
7	636delT	frameshift	germinativa	HPT-JT	Carpden <i>et al</i> , 2002
7	679insAG	frameshift	germinativa	HPT-JT +Ca Ca esporádico HPFI + Ca HPT-JT	Carpden <i>et al</i> , 2002(2x) Shattuck <i>et al</i> , 2002 Simonds <i>et al</i> , 2004 Bradley <i>et al</i> , 2005
7	686delGATG	frameshift	somática	HPT-JT +Ca	Howell <i>et al</i> , 2003
7	679delAG	frameshift	germinativa	HPT-JT	Howell <i>et al</i> , 2003
7	669		germline	HPT-JT	Bradley <i>et al</i> , 2005
7	664C>T	R222X	germinativa	Ca esporadico	Shattuck <i>et al</i> , 2003
7	700C>T	R234X	ND germinativa germinativa	Ca esporádico HPT-JT Ca esporádico	Shattuck <i>et al</i> , 2003 Howell <i>et al</i> , 2004 Cetani <i>et al</i> , 2004
8	732delT	frameshift244	somática	Ca esporadico	Shattuck <i>et al</i> , 2003
8	746delT	frameshift249	somática	Ca esporadico	Shattuck <i>et al</i> , 2003
8	255delTG ou 256delGT	frameshift	germinativa	HPT-JT	Cavaco <i>et al</i> , 2004
14	1238delA	frameshift	germinativa	HPT-JT	Carpden <i>et al</i> , 2002
14	1230delC	frameshift14	ND	Ca esporadico	Shattuck <i>et al</i> , 2003

Ca: carcinoma; ND: informação não disponível; HPFI:hiperparatireoidismo familiar isolado; HPT-JT hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula ou maxila

ANEXO B: Exames laboratoriais do paciente portador de HPT-JT (Indivíduo II:3, fig 3)

Exames laboratoriais do paciente II:3 à época do diagnóstico

<i>Exames</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio	14,8 mg/dl	8,5 - 10,5 mg/dl
Fósforo	1,1 mg/dl	2,5 - 4,5 mg/dl
Osteocalcina	196 mg/dl	10 - 35 mg/dl
Magnésio	2,1 mg/dl	1,6 - 2,6 mg/dl
Creatinina	0,7 mg/dl	0,7 - 1,2 mg/dl
Glicose	82 mg/dl	60 - 99 mg/dl
Sódio	139 mEq/l	135 - 145 mEq/l
Potássio	4,3 mEq/l	3,7 - 5,6 mEq/l
Albumina	4,4 g/dl	3,5 - 5,5 g/dl
Globulina	2,2g/dl	1,4 - 3,2 g/dl
PTH intacto	489 pg/ml	10 - 65 pg/ml
T4 livre	1,0 ng/dl	0,8 - 2ng/dl
TSH	0,91 µU/ml	0,5 - 4 µU/ml

Exames laboratoriais da paciente II:3 para rastreamento de MEN1 e MEN2A

<i>Exames</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Calcitonina	8,1pg/ml	<100 pg/ml
Gastrina	43,2 pg/ml	<200 pg/ml
Prolactina	3,2 ng/ml	0,6 a 15 ng/ml

Outros exames solicitados revelaram:

- Raio X de crânio: tábua óssea reduzida, aspecto em *salt and pepper*.
- Raio X de mão: reabsorção subperiosteal e diminuição da densidade óssea.
- Raio X de seios da face: lesão sugestiva de tumor de partes moles em maxilar D.
- Ultra-som da região cervical: massa sólida hipocóica, heterogênea, de contornos regulares, medindo 3,8 por 2,2 cm.
- Ultra-som abdominal total sem alterações.

ANEXO C: Exames laboratoriais dos familiares do paciente com hiperparatireoidismo e tumor de mandíbula

- Indivíduo I:1: Cálcio iônico, 1,32 mmol/l (1,17 - 1,32 mmol/l); Fósforo, 3,0 mg%; Magnésio, 2,1 mg%; T4 livre, 1,09.
- Indivíduo II:2: Cálcio iônico, 1,29 mmol/l; Fósforo, 3,7 mg%; Magnésio, 2,1 mg%; TSH, 1,82 μ U/l
- Indivíduo II:5: Cálcio total, 9,0 mg %; Fósforo, 4,3 mg%; Magnésio, 2,1 mg%; TSH, 1,82 μ U/l; Albumina, 4,7 g/l; Globulina, 2,5 g/l.
- Indivíduo III:2 (6 anos de idade): Cálcio normal
- Indivíduo III:3 (3 anos de idade): ainda não investigada

ANEXO D: Exames laboratoriais da paciente II:12 (Hiperparatireoidismo familiar isolado)

Exames laboratoriais da paciente II:12 à época do diagnóstico

<i>Exames (1976)</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio	12,4 mg/dl	8,5 - 10,5 mg/dl
Fósforo	1,8 mg/dl	2,5 - 4,5 mg/dl
Fosfatase alcalina	201 UI/l	56 - 155 UI/l
PTH	1600 pg/ml	230 - 630 pg/ml

Exames laboratoriais da paciente II:12 para rastreamento de MEN1 e MEN2A

<i>Exames</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Calcitonina	72pg/ml	<100 pg/ml
Gastrina	30,1 pg/ml	<200 pg/ml
Prolactina	9,6 ng/ml	0,6 a 15 ng/ml

Exames laboratoriais da paciente II:12 colhidos para controle

<i>Exames (10/8/2003)</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio	9mg/dl	8,5 - 10,5 mgdl
Cálcio ionizado	4,8 mg/dl	4,7 - 5,28 mg/dl
Fósforo	3,2 mg/dl	2,5 - 4,5 mg/dl
Magnésio	1,8mg/dl	1,9 - 2,5 mg/dl
Glicemia	103 mg%	70 - 110 mg%
Calciúria (850ml) **	36,6 mg/24 horas	até 280 mg/24h
Natriúria	148 mEq/24 horas	27 - 287 mEq/24 horas
Clearance de creatinina	126 ml plasma/min	75 - 115 ml plasma/min
PTH intacto	68 pg/ml	10 - 65 pg/ml

** urina de 24 horas

ANEXO E: Exames laboratoriais da paciente II:15 (Hiperparatireoidismo familiar isolado)

Exames laboratoriais da paciente II:15 na época do diagnóstico

<i>Exames</i>	<i>Com dieta</i>	<i>Sem dieta</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio	11,8 mg/dl	12,0 mg/dl	8,5 - 10,5 mg/dl
Fósforo	1,8 mg/dl	2,5 mg/dl	2,5 - 4,5 mg/dl
Calciúria	455 mg/24h	294 mg/24h	com dieta <180 mg/24h sem dieta <280 mg/24h
Fosfatúria	596 mg/24h	859 mg/24h	400 a 1300 mg/24h
Ácido Úrico	4,4 mg/dl	4,5 mg/dl	2,4 - 6 mg/dl
Uricosúria	778 mg/24h	604 mg/24h	150 - 850 mg/24h
PTH		1,1 mg/dl	< 1,0mg/dl
TSH		2,4 □ U/ml	0,5 – 4 μU/ml

Exames laboratoriais da paciente II:15 para rastreamento de MEN1

<i>Exames</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Gastrina	63,4 pg/ml	<200 pg/ml
Prolactina	11,4 ng/ml	0,6 a 15 ng/ml

- Raio x de crânio e de mãos sem alterações
- Ultrassonografia cervical: nódulo na região póstero-medial do lobo esquerdo da tireóide, medindo 1,6 x 1,5 x 1,0 cm.

ANEXO F: Exames laboratoriais da paciente II:10 (Hiperparatireoidismo familiar isolado)

Exames laboratoriais da paciente II:10 na época do diagnóstico

<i>Exames (1992)</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio	11,8 mg/dl	8,5 - 10,5 mg/dl
Fósforo	2,3 mg/dl	2,5 - 4,5 mg/dl
Magnésio	2,7 mg/dl	1,6 - 2,6 mg/dl
Fosfatase alcalina	132 UI/l	56 - 155 UI/l
Glicose	80 mg/dl	60 - 99 mg/dl
Sódio	140 mEq/l	135 - 145 mEq/l
Potássio	4,1 mEq/l	3,7 - 5,6 mEq/l
Creatinina	0,6 mg/dl	0,7 - 1,2 mg/dl
Proteínas totais	6,9 g/dl	6,4 - 8,3 g/dl
TSH	1,1 µU/ml	0,5 - 4 µU/ml
T4	7,5 µg/dl	5 - 12 µg/dl
PTH	1.600 pg/ml	10 - 65 pg/ml

Exames laboratoriais da paciente II:10 para rastreamento de MEN1

<i>Exames</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Gastrina	23,8 pg/ml	<200 pg/ml
Prolactina	5,2 ng/ml	0,6 a 15 ng/ml

Outros exames realizados:

- Radiografias ósseas: osteopenia generalizada
- Ultrassonografia cervical: aumento de tamanho das paratireóides superiores (esquerda, 7,0 x 3,0 x 2,0 mm, direita, 8,0 x 4,3 x 2,5 mm) e uma imagem heterogênea, predominantemente cística, no polo inferior esquerdo da tireóide (2,8 x 2,4 x 2,0 mm).
- Tireograma: nódulo frio na região palpada
- Punção biópsia com agulha fina do nódulo no pólo inferior: células epiteliais acinares, com citoplasma finamente granuloso e eosinofílico, com hipótese diagnóstica de tumor paratireoideano

ANEXO G: Exames laboratoriais da paciente II:14 (Hiperparatireoidismo familiar isolado)

Exames bioquímicos da paciente II:14 à época do diagnóstico

<i>Exames (1993)</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio	13,0 mg/dl	8,5 - 10,5 mg/dl
Fósforo	1,2 mg/dl	2,5 - 4,5 mg/dl
Glicose	76 mg/dl	60 - 99 mg/dl
Sódio	136 mEq/l	135 - 145 mEq/l
Potássio	3,8 mEq/l	3,7 - 5,6 mEq/l
TSH	3,1 □ U/ml	0,5 - 4 μU/ml
T3	130 ng/μl	75 - 220 ng/μl
T4	12,8 μg/dl	5 - 12 μg/dl
Hemoglobina	13,6 g%	12 - 16 g%
Creatinina	0,6 mg/dl	0,7 - 1,2 mg/dl

Exames laboratoriais da paciente II:14 para rastreamento de MEN1

<i>Exames</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Gastrina	39,1 pg/ml	<200 pg/ml
Prolactina	7,2 ng/ml	0,6 a 15 ng/ml

- Ultra-som cervical: dois nódulos hipoecóicos (1,8 x 1,0 e 2,3 x 1,2 cm).

ANEXO H: Exames laboratoriais do paciente II:6 (Hiperparatireoidismo familiar isolado)

Exames bioquímicos do paciente II:6 colhidos antes da hospitalização

<i>Exames</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio	11,9 mg/dl	8,5 - 10,5 mg/dl
Fósforo	2,9 mg/dl	2,5 - 4,5 mg/dl
Glicose	95 mg/dl	60 - 99 mg/dl
Sódio	140 mEq/l	135 - 145 mEq/l
Potássio	3,5 mEq/l	3,7 - 5,6 mEq/l
Creatinina	3,0 mg/dl	0,7 - 1,2 mg/dl
Uréia	104 mg/dl	10-40 mg/dl
Ácido Úrico	9,8 mg/dl	3,4 - 7,0 mg/dl
Fosfatase Alcalina	101 UI/l	56 - 155 UI/l
Albumina	4,2 g/dl	3,5 - 5,5 g/dl
Globulina	2,6 g/dl	1,4 - 3,2 g/dl
PTH	525 pg/ml	10 - 65 pg/ml

Exames laboratoriais do paciente II:6 para rastreamento de MEN1

<i>Exames</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Gastrina	98,8 pg/ml	<200 pg/ml
Prolactina	8,8 ng/ml	0,6 a 15 ng/ml

- Ultra-som abdominal: cistos renais bilaterais

ANEXO I: Exames laboratorias do paciente II:3 (Hiperparatireoidismo familiar isolado)

Exames bioquímicos do paciente II:3

<i>Exames</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio iônico	1,24 mmol/l	1,17 – 1,32 mmol/l
Gastrina	98,8 pg/ml	<200 pg/ml
Prolactina	8,8 ng/ml	0,6 a 15 ng/ml

ANEXO J: Exames laboratorias do paciente III:4 (Hiperparatireoidismo familiar isolado)

Exames bioquímicos do paciente III:4 à época do diagnóstico

<i>Exames (2001)</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio ionizado	1,93 mmol/l	1,17 - 1,32 mmol/l
Fósforo	3,0 mg/dl	2,5 - 4,5 mg/dl
Magnésio	2,1mg/dl	1,6 -2,6 mg/dl
Glicose	86 mg/dl	60 - 99 mg/dl
TSH	2,45 µU/ml	0,5 - 4 µU/ml
Hemoglobina	16,0 g%	12 -16 g%
Creatinina	0,8 mg/dl	0,7 - 1,2 mg/dl
PTH	354 pg/ml	10 - 65 pg/ml
Calciúria 24h	358 mg/24 horas	até 280 mg/24h
Proteínas totais	6,99 g/dl	6,4 -8,3 g/dl
Albumina	4,4 g/dl	3,5 -5,5 g/dl

Exames do paciente III:4 mostrando recidiva do hiperparatireoidismo

<i>Exames (2003)</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio totalo	13,7 mg/dl l	8,5 - 10,5 mg/dl l
Fósforo	, 2,3 mg/d	2,5 - 4,5 mg/dl
PTH	360 pg/ml	10 - 65 pg/ml

- Cintilografia das paratireóides com sestamibi-Tc99: sem evidências cintilográficas de adenoma de paratireóide.
- Ultra-som cervical: nodulação sólida em região pósterio-inferior e medial ao lobo direito da tireóide, medindo cerca de 1,4 x 1,1 x 1,1 cm, com aspecto sugestivo de adenoma de paratireóide.

ANEXO K: Exames laboratoriais do paciente II:2 (Hiperparatireoidismo familiar isolado)

Exames bioquímicos do paciente II:2 à época do diagnóstico

<i>Exames (2002)</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio ionizado	7,0 mg/dl	4,0 - 5,4 mg/dl
Cálcio total	11,9 mg/dl	8,5 - 10,5 mg/dl
Fósforo	1,8 mg/dl	2,5 - 4,5 mg/dl
Magnésio	1,9 mg/dl	1,6 -2,6 mg/dl
PTH	664 pg/ml	10 - 65 pg/ml
Proteínas totais	6,5 g/dl	6,4 -8,3 g/dl

- Densitometria óssea: osteoporose no fêmur (colo femoral: DMO = 0,619 g/cm²; score T = -3,5; score Z=-1,4) osteoporose na coluna vertebral (L2-L4: DMO = 0,606 g/cm²; score T = -5,3; score Z = -3,4).
- Cintilografia das paratireóides com sestamibi-Tc99: compatível com a presença de adenoma de paratireóide localizada em porção inferior do lobo tireoidiano esquerdo.

ANEXO L: Exames laboratoriais do paciente III:6 (Hiperparatireoidismo familiar isolado)

Exames bioquímicos do paciente III:6 à época do diagnóstico

<i>Exames (2002)</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio ionizado	1,72 mmol/l	1,16 - 1,32 mmol/l
Cálcio total	12,1 mg/dl	8,5 - 10,5 mg/dl
Fósforo	2,0 mg/dl	2,5 - 4,5 mg/dl
Magnésio	1,9 mg/dl	1,6 - 2,6 mg/dl
PTH	132 pg/ml	10 - 65 pg/ml
Proteínas totais	6,5 g/dl	6,4 - 8,3 g/dl
Sódio	138 mEq/l	135 - 145 mEq/l
Potássio	4,3 mEq/l	3,7 - 5,6 mEq/l
Creatinina	1,1 mg/dl	0,7 - 1,2 mg/dl

- Densitometria óssea: osteopenia no fêmur (colo femoral: DMO = 0,7993 g/cm²; score T = - 2,1; score Z = -1,9) e osteoporose na coluna vertebral (L2-L4: DMO = 0,943 g/cm²; score T = - 2,5; score Z = -2,1).
- Cintilografia das paratireóides com sestamibi-Tc99: compatível com a presença de adenoma de paratireóide inferior esquerda.
- Raio X de mandíbula sem alterações.
- Ultra-som abdominal: sem alterações.
- Ultra-som cervical: evidência nódulo posterior à tireóide, no pólo inferior esquerdo, medindo 1,2 x 1,0 x 0,7 cm.

ANEXO M: Exames laboratorias da paciente I:1 (Hiperparatireoidismo familiar isolado)

Exames laboratoriais para rastreamento de hiperparatireoidismo na paciente I:1

<i>Exames</i>	<i>Resultados</i>	<i>Valor de referência</i>
Cálcio	8,6 mg/dl	8.5 - 10.5 mg/dl
Fósforo	3,1 mg/dl	2.5 - 4.5 mg/dl
Magnésio	2,1 mg/dl	1,6 -2,6 mg/dl
Fosfatase alcalina	236 U/l	< 270 U/l
Glicose	108 mg/dl	60 - 99 mg/dl
Creatinina	1,1 mg/dl	0,7 - 1,2 mg/dl
Uréia	37 mg/dl	10 -40 mg/dl
TSH	2,21 µU/ml	0,5 - 4 µU/ml
PTH intacto	62,9 pg/ml	12 - 72 pg/ml

ANEXO N: Soluções utilizadas para extração de DNA a partir de sangue periférico**Solução hipotônica EDTA/NaCl 10mM**

EDTA dissódico bihidratado	3,722g
Cloreto de sódio	0,584g
Água destilada autoclavada qsp.....	1.000ml

Suspensão de sílica

Dióxido de sílica.....	60g
Água destilada qsp.....	500ml

Em um cilindro graduado de 5cm de diâmetro com 27,5cm de coluna de água, sedimentar a suspensão por 24 horas. Descartar o sobrenadante (aproximadamente 440 ml), completar o volume para 500ml com água destilada e ressuspender. Sedimentar por 5 horas, descartar novamente o sobrenadante (aproximadamente 440ml) e adicionar ao restante 660µl de ácido clorídrico 32% (p/v) para ajustar o pH para 2. Aliquotar e autoclavar. A suspensão é estável por 6 meses, sendo armazenada à temperatura ambiente.

Tampão de lise (L6)

Cloridrato de guanidina	97g
Tris cloridrato 0,1M pH 6,4.....	100ml
EDTA 0,2M pH 8,0.....	22ml
Triton X-100.....	2,45ml

Tampão de Lavagem

Cloridrato de guanidina.....	97g
Tris cloridrato 0,1M ph 6,4.....	100ml

Tampão TE pH 8.0

Tris pH 7,4.....	10mM
EDTA pH 8,0.....	0,1mM
Água destilada qsp.....	100ml

ANEXO O: Iniciadores e condições de PCR utilizados na amplificação dos 17 exons do gene HRPT2.

Exon	Iniciadores (5'-3')	Temp. Anelamento (°C)	MgCl ₂ (mM)	Produto de Amplificação (pb)
1	F: 5'-TGC TGC TGT CGT AGG CGA GG-3' R: 5'-GGG AGG GGT TAA GAA AGA GG-3'	58/59		473
2	F: 5'-ACT GGA AAG GAA GGC CAA CC-3' R: 5'-GCT GCA CGT CGG ACA TAA A-3'	56	1,5	125
3	F: 5'-GTT GTG TAT CAT TGT TAT TC-3' R: 5'-AAT GTC TGT TTA AGA CTG G-3'	55	1,5	173
4 e 5	F: 5'-ACA TGT TTT TGC AGA GCT GC-3' R: 5'-AAA GCT CCT CAG GTT ACT GCA-3'	55	4	423
6	F: 5'-ACC TAG AAT TGT AGA GGT AG-3' R: 5'-ACG AAC TTA AGA GCA AAG AG-3'	56	4	351
7	F: 5'-TAT GAT ACA CTC CAG GAA TG-3' R: 5'-TAA CCA CAG ATT AAA CGC AC-3'	55	1,5	343
8	F: 5'-TAT GTA GTA GGG AAG AAT CG-3' R: 5'-TCT TCA ACG TTA CTA CAC TG-3'	56	2	281
9	F: 5'-ATG GTC ATG CTA CTG CAC TC-3' R: 5'-TAC TTT GCC AAC CCT TAC CC-3'	55	2	258
10	F: 5'-TGA ACC ATC ACA TTC AAT GTA G-3' R: 5'-TTT ACT TCA ACA TGT GCT ACT C-3'	57	1,5	236
11	F: 5'-AAG AGA CAG AGA GAT ATG G-3' R: 5'-AAA CTT GCA CTG TTA CGA TC-3'	55	2	213
12	F: 5'-AGT TAG TCA TAT GGG AAT ACA C-3' R: 5'-TAA ATC AGA ATG GAT ACC AAG C-3'	55	2	268
13	F: 5'-TGA TTT ATT AGT GCC CAA GC-3' R: 5'-ATA TCC TAC GTA CAG GAT AG-3'	55	1,5	320
14	F: 5'-ATC TTC CCA TTT TCA TCA CG-3' R: 5'-ACA ACA TTC ATT CTC TTG GG-3'	55	1,5	279
15	F: 5'-AAT GTT TAT GGG ACT GTT GC-3' R: 5'-TGA CAT ACA CAT CAT ATG GC-3'	55	1,5	303
16	F: 5'-TAT AAT ACG GCT TCA GTT GG-3' R: 5'-TAA GAC TGA CAA CTC TAT GG-3'	55	2	325
17	F: 5'-CCA GTT TTC TAG AAA ACA GC-3' R: 5'-AAG ATC AAT CTG TGA CCT TC-3'	55	2	262

ANEXO P: Soluções utilizadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**Solução de oligonucleotídeos (primers) 10 pmoles/ μ l****Solução de cloreto de magnésio 25mM****Tampão de incubação (10x)**

Cloreto de potássio.....	500mM
Tris cloridrato pH 9,0.....	100mM
Triton X-100.....	1%
Cloreto de magnésio.....	15 mM

Solução de dNTP

dATP.....	1,25 mM
dCTP.....	1,25 mM
dGTP.....	1,25mM
dTTP.....	1,25 mM

Taq DNA polimerase 5u/ μ l

ANEXO Q: Soluções utilizadas para Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)**- Solução de Acrilamida/Bisacrilamida 30%**

Acrilamida	29 g
Bisacrilamida	1 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

- Tampão TBE 10x pH 8,3

Tris base	60,50 g
Ácido bórico	30,85 g
EDTA dissódico bi-hidratado	3,72 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

- Gel de poliacrilamida a 6,5%

Solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1)	1,079 ml
TBE 10x	0,65 ml
Água destilada	3,22 ml
Persulfato de amônio 10%	40 µl
TEMED	4,0 µl

- Tampão TBE 1x

TBE 10x	10 ml
Água destilada q.s.p.	100 ml

- Tampão de amostra (*Gel loading buffer*)

Azul de bromofenol	0,25%
Xileno cianol	0,25%
Glicerol	30%
Água destilada q.s.p.	100 ml

ANEXO R: Soluções utilizadas na Coloração pela Prata**Solução de prata (estoque)**

Nitrato de prata.....	20,38g
Água destilada.....	1.000ml

Solução de prata (uso)

Solução de estoque.....	8ml
Água destilada.....	100ml
Formaldeído 37%.....	150µl

Revelador

Carbonato de sódio.....	2,97g
Água destilada qsp.....	100ml
Formaldeído 37%.....	150µl
Tiosulfato de sódio 10mg/ml.....	40µl

Deve ser utilizado quando em temperatura entre 10 e 18°C

Solução Fixadora

Ácido acético glacial.....	100ml
Água destilada qsp.....	1.000ml

Solução de Tiosulfato de sódio

Tiosulfato de sódio.....	10mg
Água destilada.....	1ml

ANEXO S: Soluções utilizadas para a reação de Sequenciamento***Terminator Ready Reaction Mix***

- “ A- Dye Terminator, marcado com dicloro[R6G]” ;
- “ C- Dye Terminator marcado com dicloro[ROX]”;
- “ G- Dye Terminator marcado com dicloro[R110];
- “ T- Dye Terminator marcado com dicloro[TAMPRA]”.
- Deoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dITP, dUTP)
- AmpliTaq DNA polymerase, FS, com estabilizador térmico
- MgCl₂
- Tris-HCl buffer, pH9.0

Tampão de diluição:

- 400mM de Tris-HCl pH 9, 10 mM de MgCl₂

ABI PRISM 310 Genetic Analyser Buffer with EDTA***Template Supression Reagent (TSR)*****Álcool isopropílico 75%****Etano 70%**

ANEXO T: Equipamentos utilizados

- PCT-100 – *Programmable Thermal Controller* – MJ Research, Inc. (PCR)
- Eppendorf Centrifuge 5417R (Microcentrífuga)
- Marathon 13 K/M – Fisher Scientific (Microcentrífuga)
- MINOR – MSE (Centrífuga)
- VORTEX-2 GENE- Scientific Industries (Máquina de vórtex)
- *Fisher Water Bath*- Fisher Scientific (Banho de água)
- Thermolyne Type 16500 – Dry-bath (Banho de areia)
- Mini-V 8.10 Vertical Gel Eletrophoresis Apparatus – Life Technologies (Cuba de eletroforese).
- ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Sequenciador automático)

ANEXO U: Sequência do gene HRPT2 e da proteína parafibromina

cDNA HRPT2 (Exons são mostrados alternadamente em azul e preto)

```

1  GCTACTGCCCTGCTGCTGTCGTAGGCGAGGACGGCTGTTAGTGCTGCTGCTGTTGGTTC
61  GTCGCGGCGGCGAAGGAGGAGGAGGAGGCGAGGCGACAAGAGAAGAAGGAGGCAGG
121 CGCGGCGGCGAGCGGCGGCGCCCCGAGCCGGCGGAGGCGAGGGGGGGGAAGATGGCGGACG
181 TGCTTAGCGTCTGCGACAGTACAACATCCAGAAGAAGGAGATTGTGGTGAAGGGGAGACG
241 AAGTGATCTTCGGGGAGTTCCTGGCCCAAGAATGTGAAGACCAACTATGTTGTTTGGG
301 GGACTGGAAAGGAAGGCCAACCCAGAGAGTACTACACATTGGATTCCATTTTATTTCTAC
361 TTAATAACGTGCACCTTCTCATCCTGTTTATGTCCGACGTGCAGCTACTGAAAATATTC
421 CTGTGGTTAGAAGACCTGATCGAAAAGATCTACTTGGATATCTCAATGGTGAAGCGTCAA
481 CATCGGCAAGTATAGACAGAAGCGCTCCCTTAGAAATAGTCTTCAGCGTACTCAAG
541 TCAAACGAGCTGCAGATGAAGTTTTAGCAGAAGCAAAGAAACCACGAATTGAGGATGAAG
601 AGTGTGTGCGCCTTGATAAAGAGAGATTGGCTGCCCGTTTGGAGGGTCACAAAGAAGGGA
661 TTGTACAGACTGAACAGATTAGGTCTTTGTCTGAAGCTATGTCAGTGGAAAAAATTGCTG
721 CAATCAAAGCCAAAATATGGCTAAGAAAAGATCTACTATCAAGACTGATCTAGATGATG
781 ACATAACTGCCCTTAAACAGAGGAGTTTTGTGGATGCTGAGGTAGATGTGACCCGAGATA
841 TTGTGAGCAGAGAGAGATGAGGAGACACGAACAACCTATCTTACAAAGCACAGGAAAGA
901 ATTTTTCCAAGAACATTTTGCATTTCTTCAATCTGTAAAAGCCAGAGAAGAAGGGCGTG
961 CACCTGAACAGCGACCTGCCCAATGCAGCACCTGTGATCCCACTTTGCGCACCAAAC
1021 AGCCTATCCAGCTGCCTATAACAGATACGATCAGGAAAGATTCAAAGGAAAAGAAGAAA
1081 CGGAAGGCTTCAAATGACACTATGGGAACCTACCATGGTATGACACTGAAATCTGTAA
1141 CGGAGGGTGCATCTGCCCGGAAGACTCAGACTCCTGCAGCCAGCCAGTACCAAGACCAG
1201 TTTCTCAAGCAAGACCTCCCCAATCAGAAGAAAGGATCTCGAACACCATTATCATAA
1261 TTCCTGCAGCTACCACCTCTTTAATAACCATGCTTAATGCAAAGACCTTCTACAGGACC
1321 TGAAATTTGTCCCATCAGATGAAAAGAAGAAACAAGGTTGTCAACGAGAAAATGAAACTC
1381 TAATACAAAGAAGAAAAGACCAGATGCAACCAGGGGCACTGCAATTAGTGTTACAGTAC
1441 CTTATAGAGTAGTAGACCAGCCCTTAAACTTATGCCTCAAGACTGGGACCGCGTTGTAG
1501 CCGTTTTTGTGCAGGGTCTGCATGGCAGTTCAAAAGGTTGGCCATGGCTTTTGCCTGATG
1561 GATCACCAGTTGATATATTTGCTAAAATTAAGCCTTCCATCTGAAGTATGATGAAGTTC
1621 GTCTGGATCCAAATGTTTCAGAAATGGGATGTAACAGTATTAGAAGTACAGCTATCACAAAC
1681 GTCATTTGGATAGACCAGTGTCTTACGGTTTTGGGAAACATTGGACAGGTACATGGTAA
1741 AGCATAAATCGCACTTGAGATTCTGAATTATTTGGCTCCTCCATTTCTGGAAATTGAGAC
1801 TCAAGCTTTATGAATTTATCAAGAACTTAAAAATGAAGAAGGTCACAGATTGATCTTTTA
1861 TAAGACCTTATTTGATGCTTTGTGCTTCAAGGAGATGATACCTGTCATCCATATAAGCAA
1921 ACTTTTTGGCTTACAACATTTTTTTTTAATATTAGCCTTCTAGTCTGTAATGGAAATTGTA
1981 TATTTTGATAGAAGTTTTTCTCCATTGGTTAAATTAGCATTACTTAAAATTTGTTTCTT
2041 TAGAAAATAAATGCAGGTTATAAATGTGTGTATATTTAGAGATTATAAGGCTCTCTGAGC
2101 CATCTTCTGATTTTTTTCATTGCTCTATAATTCTTTTTACTGAAAATACTATGTTATGAATG
2161 GTATTAATTTTAGTCTCTGGAACATCCAAAACCAAGCAAAGGGATGTGACTATTTTGAA
2221 TGAATCAGAATGTCAACTTGTATGTACACTATATCTACACTTACTCATTATTTAAAAAGA
2281 ATAATGAAAATCTAGATCAATTCCTCAATTTGATTGAACTGTTTCAGCCTTTTCAAGATT
2341 TCTTTATTTACAAATGATTACATTTAAATGAATGTACATTCCTTCTCACTGACTTTGGTGA
2401 TTTTGAAACCTAGAATGATGTGTTTCTATCTGTAATATCTTTCCATTTGAAAAAATCTC
2461 AAAACACAGATTAACCACAATAGGCTGTAGTATTTTTTATTTTGGGAGCCAGAGTATG
2521 ATTTGGGGGAAGAATATGTATCAGCCCTATTGCAGTATAACTTTAAGCTCCTTTTCTCTT
2581 TAGTCCACTTTTGAATTGTAATTTTTATGGTATAGGATTTTGAATCTTCTATTTTAGGCTT
2641 GTCAGTCTTGAGTTCCTATCTTCCATTATCCCTAAAATATTGATAAACTCCCAGGCACCA
2701 AAGAAAACATTTGCTTAATTTGTCTGAAAAGAAACAAGAGAAAACACTGGTATTTTTATG
2761 TCTGTATTCAATATGGTATAAAATATAAAAACTATATTTAACTTAGTGAAATATTTTAC
2821 TATTTCTCTACTTCAGACAAAATGTTGCATCCAAGGTACATCAAGTGACCATTTGCCTTG
2881 AACCTTGATTTCACTTTGTTTTTTTTTTTTTCTTAAAGGCAACTAGGAAGCTTTACTTTC
2941 CTAAAGTGTTTTTGCCATTTGGAATTTTTGCTGATCACAGT

```


Intron 5-6	2495 bp	gtaaagaaactgtatnttaacaatnttatnttatnttattgattgattgaaattgggattcctta gtaacaaggattccttgattgcagtaacctgaggagcttt.....tagaggtaggaaatnttggaaggaaaagtacatgtagcg tttttcttcctaaaagttcaataaaaatnttaaatgcattaaccagtggttatntccag
6	89 bp	GATGAAGAGTGTGTGCGCCTTGATAAAGAGAGATTGGCTGCCCGTTTGGAGGGTCACAAA GAAGGGATTGTACAGACTGAACAGATTAG
Intron 6-7	3676 bp	gtaagaattcctnttaagtagaaagtaggtagtttagatataatgtaaaagtataaggaaa aggaatataaaaatgctctccacatttacatttacctctt.....gtaagtgtntttaccagaaatnttataaatgtaacaaaata tnttatgatacactccaggaatgctgctgtgaaaatnttaaaaagaaattgctnttag
7	217 bp	GTCTTTGTCTGAAGCTATGTCAGTGGAAAAAATTGCTGCAATCAAAGCCAAAATTATGGC TAAGAAAAGATCTACTATCAAGACTGATCTAGATGATGACATAACTGCCCTTAAACAGAG GAGTTTTGTGGATGCTGAGGTAGATGTGACCCGAGATATTGTGAGAGAGAGAGAGATATG GAGGACACGAACAACCTATCTTACAAAGCACAGGAAAAG
Intron 7-8	5800 bp	gtaattaaatntttactcattcattgagtgagagagagagagagagagagtgctnttaa tctgtggttatagaattggtntaaactnttgctnttaggtgg.....aggaagaatcgatagtaagataacttagtctntaaattat caactaaatnttactatntgataatnttaagtggtntaattaaaatccattntatnttag
8	99 bp	AATTTTTCCAAGAACATTTTTGCAATTCTTCAATCTGTAAGCCAGAGAAGAAGGGCGT GCACCTGAACAGCGACCTGCCCAAATGCAGCACCTGTG
Intron 8-9	2338 bp	gtaagaatgctnttactgctnttacagtagatnttaagaagttgccactntatntgcagtg agtaacgntgaagacatntcacatnttaaatcagtga.....ttggctgcagtgagccatggtcatgctactgcactccagc acattaaataagtgacatnttaaaaatnttaacaagtaactcataatntntttttacag
9	79 bp	GATCCCACTTTGCGCACCAACAGCCTATCCAGCTGCCTATAACAGATACGATCAGGAA AGATTCAAAGGAAAAGAAG
Intron 9-10	1997 bp	gcaagttgctntaattcctntatcctntcccttagtggtggtntgntgaactntgagagggcagtg tggcctgatgnttaagggtaagggntggcaagtaagtgc.....gaaccatcacatntcaatgtagatnttactnttagatntgt tataggtcataagatacatgatctataaaaatnttaacaataagcctcctnttttttcgtag
10	65 bp	AAACGGAAGGCTTCAAAAATTGACACTATGGGAACCTACCATGGTATGACACTGAAATCTG TAACG
Intron 10-11	51350 bp	gtaagntaattntggctgtagatgntcctnttgntccagggatnttatgtgagtagcacatg ntgaagntaaatcctnttagtctctcatatntttttatnttcaa.....gaacaagagacagagagatatgagatntcctntggaataat ntaagntgnttattatgntaaagaactnttgatcctntatataatcaatntcctntnttaag
11	58 bp	GAGGGTGCATCTGCCCGAAGACTCAGACTCCTGCAGCCAGCCAGTACCAAGACCAG
Intron 11-12	8212 bp	gtagaaatatagaactnttgctntttgntttcctntcaaagatcgtaacagtgcaagntnt tagtatgctgntaatgctntgaacaaactntaaatnttact.....gggaatacacataatnttaaaaatntccctntatntgtaag nttgaaaataagaatntgntnttatgacacagagntgntgattntttttcctntttcacag
12	36 bp	TTTCTCAAGCAAGACCTCCCCAAATCAGAAGAAAAG
Intron 12-13	289 bp	gtgaggtntgcatatgattnttaactntaactnttaaaaagntaatgattgcaaaaccag cctgataatntcctntgntgcagctgntatcacatgntntgntgc.....aaaagntaaagntacaatnttataatcctnttaactnttagt agagaaagntaagntaattnttaataatataatnttctacctgntaaatntntgctnttatag
13	88 bp	GATCTCGAACACCCATTATCATAATTCCTGCAGCTACCACCTCTTAAATAACCATGCTTA ATGCAAAAAGACCTTCTACAGGACCTGAA
Intron 13-14	20515 bp	gtaagntaattnttaactntcctntgntacgtaggatnttgagataaccntggaaaatagnta gntactgntcagntactnttnttgntaaaacaaaatt.....actcgtctcaaaaaaaaatnttcaaatntatagntt atcctntccatntntcatcagntgntaatacattgactntttctcatcctgntntttcaag
14	162 bp	ATTTGTCCCATCAGATGAAAAGAAGAAACAAGGTTGTCAACGAGAAAATGAAACTCTAAT ACAAAGAAGAAAAGACCAGATGCAACCAGGGGGCACTGCAATTAGTGTACAGTACCTTA TAGAGTAGTAGACCAGCCCCTTAAACTTATGCCTCAAGACTG

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)