

HIPERPARATIROIDISMO PRIMÁRIO ESPORÁDICO
ESTUDO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM TUMORES
ESPORÁDICOS DAS GLÂNDULAS PARATIROIDES

MARIA ADÉLIA RODRIGUES MENDES

Dissertação de Mestrado em Oncologia Molecular

2012

Maria Adélia Rodrigues Mendes

Hiperparatiroidismo Primário Esporádico: Estudo de Alterações Moleculares em Tumores
Esporádicos Das Glândulas Paratiroides

Dissertação de Candidatura ao grau de
Mestre em Oncologia Molecular submetida
ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel
Salazar da Universidade do Porto

Orientador – Doutora Ana Paula Ferreira
Dias Soares

Categoria – Professora Auxiliar

Afiliação – Professora Auxiliar da FMUP e
Investigadora do Instituto de Patologia e
Imunologia da Universidade do Porto

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Dr. Paula Soares, por me ter acolhido no IPATIMUP, e no Cancer Biology. Obrigada por toda a orientação, mas sobretudo pela oportunidade de começar.

Um obrigado enorme à minha Maria Inês, o meu anjinho da guarda, mesmo no meio da serra! Obrigada por tudo! Sabes bem que as palavras não chegam para te agradecer tudo o que fizeste por mim, mesmo longe... Gosto muito de ti minha chefinha!:)

Obrigada a todos os meus amigos deste grande grupo que é o Cancer Biology! Em especial :à Diiiiinaaa, por todas as conversas, todas as piadas, toda a ajuda que sempre me deste, mesmo até ao fim! À Joana Nunes – a enciclopédia (que, já agora, tem umas roupinhas muito giras!) pela amizade, pelas brincadeiras, por tudo! À Joáná Silvá! Por me ensinares –à mim à todos – como é o verdadeiro sotáque do Porto! À Catarina Salgado, obrigada pela companhia durante este ano, que não foi fácil, pelas cusquices, pelos desabafos, pelas estupidezes que te saem por essa boca fora e que me fazem sentir que não estou sozinha neste mundo! :P Um obrigado à Ana Almeida, pela força, pela paciência para me ensinares, e porque ainda hoje te ouço a dizer convicta: “Funcionou, então tu não vês que funcionou?!” Ao João Vinagre e ao Ricardo Celestino, obrigada pela companhia, e por me fazerem rir e sorrir, todos os dias no laboratório. Obrigada pela ajuda que me deram, sempre que pedi!

Um grande obrigado aos meus companheiros dos almoços de Agosto: à Bábi, à Rita, ao Dani e à Inês. Sem vocês, este verão não teria sido a mesma coisa! Obrigada pelas nossas conversas (no mínimo surreais) durante almoços muito bem passados. Obrigada pelas gargalhadas sinceras que provocaram em mim ao longo deste mês comprido! Bábi, fico à espera que me envies o almoço de Manchester, via Fedex! :P

Quero também agradecer aos meus amigos: ao Elísio e à minha mana de sempre, Andreia. Obrigada por me aturarem, e eu prometo que agora que a tempestade passou, vou acordar para o mundo e voltar a ser a Adélia de antigamente! ;)

Um obrigado do tamanho do mundo aos meus pais. Não há palavras para exprimir a minha gratidão por tudo o que sempre fizeram por mim. Obrigada por acreditarem em mim e por me deixarem voar. Adoro-vos aos dois!

Gil, obrigada por seres o meu companheiro e amigo de todas as horas. Obrigada por me ajudares a crescer. Sabes bem que sem ti não seria igual (assim foi tipo...frango!).

Um obrigado do fundo do coração a todos os que me acompanharam neste caminho, que nem sempre foi fácil, mas que, sem dúvida, valeu a pena!

Adélia

ÍNDICE

Agradecimentos	v
Lista de Abreviaturas.....	9
Resumo.....	13
Abstract	14
1 Introdução	15
1.1 As Glândulas Paratiroides.....	17
1.2 Homeostasia do Cálcio	19
1.3 Hiperparatiroidismo	20
1.3.1 Hiperparatiroidismo Primário	21
1.4 As Três Entidades Tumorais na Paratiroide	22
1.5 Alterações Genéticas Associadas à Tumorigénese das Glândulas Paratiroides.....	24
1.5.1 Proto-Oncogenes.....	24
1.5.2 Genes supressores tumorais: o modelo dos dois eventos de Knudson.....	24
1.5.3 Hiperparatiroidismo Familiar Hereditário	25
1.5.4 Hiperparatiroidismo Primário Esporádico.....	32
1.5.5 Novos Genes Candidatos na Tumorigénese Paratiroideia	34
CaSR.....	34
1.6 Seguimento dos Pacientes com Hiperparatiroidismo Primário	37
1.7 Objetivos do Trabalho	39
2 Metodologia	41
2.1 Recolha de material biológico.....	43
2.2 Pesquisa de mutações somáticas nos genes <i>Men1</i> , <i>HRPT2</i> e <i>CDKN1B</i> através de PCR e sequenciação direta	43
2.2.1 Extração de DNA de leucócitos de sangue periférico	43
2.2.2 Extração de DNA de material Parafinado.....	44
2.2.3 Amplificação de DNA: Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction – PCR</i>)	44
2.2.4 Sequenciação Automática.....	45
2.3 Pesquisa de grandes deleções no gene <i>Men1</i> por <i>Multiple Ligation Probe Amplification (MLPA)</i>	46
2.4 Avaliação da expressão das proteínas Menina, Ciclina D1, Parafibromina, p27 ^{Kip1} e Ki-67 por imunohistoquímica	47
2.5 Previsão do efeito biológico das alterações genéticas.....	48
2.6 Análise estatística.....	48

3	Resultados	49
3.1	Pacientes	51
3.2	Alterações do gene do supressor tumoral <i>Men1</i> e na expressão de Menina.....	51
3.3	Ciclina D1.....	56
3.4	Expressão de Parafibromina e pesquisa de mutações no gene <i>CDC73/HRPT2</i>	59
3.5	Expressão de p27 ^{kip1} e pesquisa de mutações no gene <i>CDKN1B</i>	61
4	Discussão.....	67
4.1	Na paratiroide o gene <i>Men1</i> segue o modelo de Knudson para genes supressores tumorais	69
4.1.1	As mutações no gene <i>Men1</i>	69
4.1.2	A alteração mais frequente nos tumores esporádicos da paratiroide são as grandes deleções do supressor tumoral <i>Men1</i>	72
4.1.3	Expressão diferencial de Menina em lesões da paratiroide	74
4.2	A proteína Ciclina D1 encontra-se frequentemente sobre-expressa nos tumores da paratiroide, apesar do seu baixo índice de proliferação.....	76
4.3	A diminuição da expressão nuclear de Parafibromina é um indicador para a pesquisa de mutações no supressor tumoral <i>CDC73/HRPT2</i>	78
4.4	p27 ^{kip1} : o primeiro passo para a distinção entre adenoma e hiperplasia?	82
5	Conclusão e Perspetivas Futuras.....	87
6	Anexos.....	93
7	Referências.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

% (p/v)	Percentagem expressa em peso por volume
% (v/v)	Percentagem expressa em volume por volume
1,25(OH) ₂ D ₃	Calcitriol – forma biologicamente ativa da Vitamina D
11p	Braço curto do cromossoma 11
11q	Braço comprido do cromossoma 11
A	Base azotada Adenina
Ala	Resíduo de aminoácido Alanina
a.a	Aminoácido
ADMHPT	Hiperparatiroidismo Autossômico Ligeiro (do inglês <i>Autosomal Dominant Mild Hyperparathyroidism</i>)
Bp	Número de pares de resíduos de nucleótidos (do inglês <i>base pairs</i>)
C	Base azotada Citosina
Ca ²⁺ _{livre}	Cálcio ionizado no sangue
CaPO ₄	Fosfato de Cálcio
CaSR	Recetor do Cálcio (do inglês <i>Calcium Sensing Receptor</i>)
CCND1	Gene <i>Cyclin D1</i>
CDC73/HRPT2	<i>Cell Division Cycle 73 / Hyperparathyroidism 2</i>
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CDKN1B	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B</i>
CGH	Hibridação Genómica Comparativa (do inglês <i>Comparative Genomic Hybridization</i>)
CTNN1B	<i>Catenin (cadherin associated protein) beta 1</i>
Asp	Resíduo de aminoácido Aspartato
DAB	Diaminobenzidina
ddNTP	Dideoxiribonucleótido (do inglês <i>dideoxynucleotide-tri-phosphate</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos (do inglês <i>deoxynucleotide-tri-phosphate</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês <i>Ethylenediamine Tetra-Acetic Acid</i>)
FANCD2	<i>Fanconi Anemia Complementation Group 1</i>
FGF23	<i>Fibroblast Growth Factor 23</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FHH	Hipercalcemia Hipercalciúria Familiar (do inglês <i>Familial Hypercalcemia Hypocalciuria</i>)
FMTC	Carcinoma Medular da Tireoide Familiar (do inglês <i>Familial Medullary Thyroid Carcinoma</i>)
G	Base azotada Guanina
Gly	Resíduo de aminoácido Glicina
H&E	Coloração Hematoxilina e Eosina
H3K4	Metilação da Lisina 4 da Histona 3
HDAC	Histona Deacetilase
HGS	<i>Hepatocyte Growth-factor Regulated Tyrosine Kinase Substrate</i>
HPT	Hiperparatiroidismo
HPT-JT	Hiperparatiroidismo associado a tumor na mandíbula (do inglês <i>Hyperparathyroidism Jaw-Tumor syndrome</i>)
HPTP	Hiperparatiroidismo Primário
ins	Inserção

inv	Inversão
Kb	Kilobp (1000bp)
KHCO ₃	Hidrogenocarbonato de Potássio
LOH	Perda de Heterozigotia (do inglês <i>Loss of Heterozigosity</i>)
LRP5	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5</i>
MEN1	Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (do inglês <i>Multiple Endocrine Neoplasia Type 1</i>)
MEN2a	Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 2a (do inglês <i>Multiple Endocrine Neoplasia Type 2a</i>)
MEN2b	Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 2b (do inglês <i>Multiple Endocrine Neoplasia Type 2b</i>)
MEN4	Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 4 (do inglês <i>Multiple Endocrine Neoplasia Type 4</i>)
MENX	Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo X (do inglês <i>Multiple Endocrine Neoplasia Type X</i>)
miRNA	Micro RNA
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i>
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de amónio
NLS	Sinal de Localização Nuclear (do inglês <i>Nuclear Localization Signal</i>)
NSHPT	Hiperparatiroidismo Neonatal Severo (do inglês <i>Neonatal Severe Hyperparathyroidism</i>)
nt	Nucleótidos
OH	Grupo hidroxilo
Pro	Resíduo de aminoácido Prolina
P	Valor P
PAF-1	<i>Polymerase Associated Factor 1</i>
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PK	Proteinase K
PRAD1	<i>Parathyroid Adenomatosis 1</i>
PRLr	Recetor da prolactina (do inglês <i>Prolactin Receptor</i>)
PTH	Parathormona (do inglês <i>Parathyroid Hormone</i>)
Arg	Resíduo de aminoácido Arginina
r ²	Coefficiente de determinação de regressão linear
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
Rb	Proteína Retinoblastoma
RET	Rearranjado durante a Transfeção (do inglês <i>Rearranged during Transfection</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAP II	RNA Polimerase II
RPA2	<i>Replication Protein 2</i>
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	PCR em tempo Real (do inglês <i>Real-Time PCR</i>)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
sHPT	Hiperparatiroidismo Secundário
SNP ID	<i>Single Nucleotide Polymorphism Identification</i>
T	Base azotada Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris-HCl	Tris-Hidrocloro

Val	Resíduo de aminoácido Valina
VDR	Recetor da Vitamina D (do inglês <i>Vitamin D Receptor</i>)
WT	<i>Wild Type</i>

RESUMO

O Hiperparatiroidismo Primário (HPTP) é uma das endocrinopatias mais prevalentes nos países desenvolvidos, afetando sobretudo mulheres na quinta ou sexta década de vida. O desenvolvimento desta patologia deve-se ao aumento desregulado da produção de PTH pelas glândulas paratiroides, acompanhado por um aumento da sua massa celular (adenoma, hiperplasia ou carcinoma).

Os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de HPTP na sua vertente esporádica permanecem pouco conhecidos, não existindo até à data, alterações moleculares identificadas com impacto nas questões clínicas. Contudo, o conhecimento das formas familiares e das suas alterações moleculares possibilitou o início do estudo das formas esporádicas da doença.

O objetivo geral do presente trabalho é o estudo de uma série de casos HPTP e a caracterização de alterações moleculares que possam estar associadas ao desenvolvimento de tumores esporádicos nas glândulas paratiroides.

O estudo genético permitiu verificar que a alteração mais frequente nas lesões da paratiroide estudadas são as grandes deleções do *Men1*. Identificámos também duas mutações somáticas na região codificante deste supressor tumoral. Verificou-se que a expressão nuclear de menina nas lesões é quase sempre menor do que na paratiroide normal, sugerindo um papel fundamental desta proteína na tumorigénese paratiroideia. A proteína Ciclina D1 é sobre-expressa numa percentagem significativa das lesões, o que não se traduz no aumento da sua proliferação, como foi avaliado pela expressão de Ki-67. Também foi detetada uma mutação somática no supressor tumoral *CDC73/HRPT2*, acompanhada da diminuição acentuada da expressão de parafibromina numa lesão aparentemente benigna. Não foram detetadas alterações na região codificante do inibidor do ciclo celular *CDKN1B*, no entanto verificou-se diminuição significativa da expressão de p27^{kip1} das lesões multiglandulares relativamente às lesões singulares.

A distinção entre as várias entidades tumorais da paratiroide representa atualmente um desafio aos clínicos, dada a ausência de marcadores histopatológicos e moleculares. A expressão diferencial de p27^{kip1} sugere um mecanismo alternativo de proliferação nas lesões multiglandulares da paratiroide, o que poderá representar um potencial biomarcador desta patologia.

Palavras-chave

Hiperparatiroidismo Primário; Hiperplasia; Adenoma; *Men1*; p27^{kip1}

ABSTRACT

Primary Hyperparathyroidism (PHPT) is one of the most prevalent endocrinopathies in developed countries, mostly affecting women in their 50th or 60th decades of life. The development of this pathology is due to a deregulated increase in the production of PTH by the parathyroids, along with an increase of its cellular mass (adenoma, hyperplasia or carcinoma).

The mechanisms underlying the development of sporadic PHPT remain poorly understood, and there are no identified molecular alterations with a clinical impact. However, the knowledge of the familial forms and their molecular alterations allowed the study of the sporadic form of the disease.

The main goal of the present work is the study of a series of cases of PHPT and the characterization of molecular alterations associated with the development of sporadic tumors in parathyroid glands.

Genetic screening allowed us to verify that the most frequent alteration in parathyroid lesions are *Men1* large deletions. We also detected two mutations in the coding region of this tumor suppressor gene. Menin nuclear expression was frequently decreased in parathyroids lesions, when compared with normal tissue, which suggests a fundamental role of this protein in parathyroid tumorigenesis. Cyclin D1 overexpression was detected in a significant portion of cases and was not correlated with an increase in the proliferation, as assessed by Ki-67 expression. It was also detected a somatic mutation in the tumor suppressor gene *CDC73/HRPT2* together with a marked decrease in parafibromin expression in the same case. No mutations were detected in the coding region of the cell cycle inhibitor *CDKN1B*. However, we observed a significant decrease in p27^{kip1} expression in multiglandular lesions, when compared with their single counterparts.

The distinction between the three tumorigenic entities of the parathyroid remains a challenge, given the absence of molecular and histopathological markers. The differential expression of p27^{kip1} suggests an alternative mechanism of proliferation in parathyroid multiglandular lesions, which may represent a potential biomarker in this pathology.

Key-words

Primary Hyperparathyroidism; Hyperplasia; Adenoma; *Men1*; p27^{kip1}

1 INTRODUÇÃO

1.1 As Glândulas Paratiroides

A primeira descrição das glândulas paratiroides remonta ao ano de 1850 por Richard Owen que, durante a autópsia de um Grande Rinoceronte Índio (*Rhinoceros unicornis*), descreveu “um corpo glandular pequeno, amarelo e compacto, adjunto à tiroide no ponto de onde emergem as veias” [1]. O reconhecimento destas glândulas em seres humanos ocorreu anos mais tarde, por Ivar Sandström [1; 2]. Na evolução da medicina e da endocrinologia, as glândulas paratiroides foram os últimos órgãos a ser identificados até à data, bem como as suas patologias associadas [2]. A extirpação das paratiroides de cães por Eugene Gley na década de 1890 revelou a sua importância biológica quando este fisiologista francês verificou que, após paratiroidectomia, os animais morriam de tétano. Anos mais tarde, o patologista Jacob Erdheim concluiu que o desenvolvimento de tétano após a remoção das glândulas paratiroides se devia à ocorrência de hipocalcemia severa nestes animais [3].

Como parte de um organismo multicelular, o sistema endócrino tem uma função vital na comunicação entre os diferentes órgãos e na coordenação dos diferentes sistemas do organismo em resposta às condições ambientais internas e externas [4]. As paratiroides são glândulas endócrinas responsáveis pela síntese e secreção da hormona da paratiroide, ou paratormona (PTH). Nos seres humanos existem normalmente 2 pares de glândulas paratiroides, localizadas na superfície posterior da tiroide (**Figura 1A**).

Embriologicamente, as paratiroides desenvolvem-se a partir das bolsas faríngeas III e IV [5]. Por vezes verifica-se a presença de tecido paratiroideu ectópico, localizado entre o pescoço e o mediastino, sobretudo na superfície do timo, devido à separação incompleta entre estas estruturas durante o desenvolvimento embrionário [6; 7].

Histologicamente, as paratiroides são compostas por dois tipos de células: as células principais e as células oxifílicas (**Figura 1B**). As células principais, mais abundantes, são responsáveis pela produção de PTH, que é armazenada em grânulos eosinófilos no citoplasma, caracteristicamente vacuolizado, rico em lípidos e organelos essenciais à síntese proteica. As células oxifílicas surgem durante a puberdade, vão aumentando com a idade e a sua função permanece até hoje pouco conhecida. Estudos de microscopia eletrónica revelaram que estas células não possuem organelos essenciais para a síntese de proteínas, mas evidenciaram um elevado número de mitocôndrias aberrantes no citoplasma, conferindo às células uma coloração eosinófila intensa [5; 8]. Por vezes, é possível observar células com características de transição entre os dois tipos anteriores. As paratiroides têm também um conteúdo variável de adipócitos, que está relacionado com a sua atividade secretora de PTH, mas também com a idade e constituição física dos indivíduos [9].

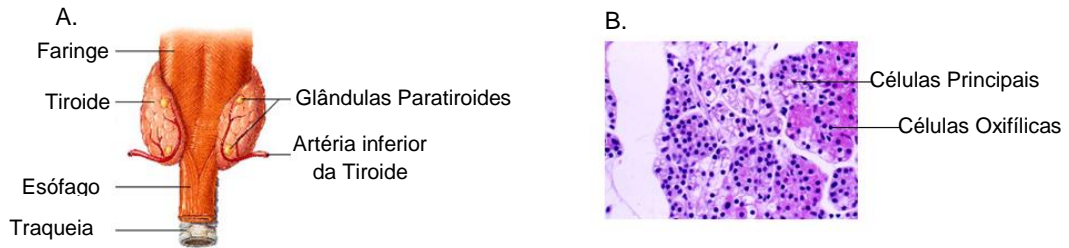


Figura 1: A. Localização anatômica das glândulas paratiroides [adaptado de: www.mhhe.com]; B. Componentes celulares das glândulas paratiroides (coloração de H&E) [adaptado de: www.pathology.mc.duke.edu]

A produção de PTH pelas paratiroides é fundamental para a regulação da homeostasia do cálcio, mas também do fósforo e do magnésio [4; 10]. A estabilidade da concentração fisiológica de cálcio no sangue é essencial para a realização de diversos processos fisiológicos como a função neuromuscular, a manutenção da permeabilidade das células, a coagulação sanguínea e a integridade de vias de sinalização celulares [11; 12]. A síntese e secreção de PTH pelas paratiroides é um processo finamente regulado pelos níveis de cálcio no sangue.

O gene PTH está localizado no braço curto do cromossoma 11 (11p15.2), e a proteína por ele codificada possui um total de 115 aminoácidos (a.a), correspondendo à forma imatura da hormona da paratiroide: pre-proPTH (**Figura 2**). A remoção dos 29 a.a iniciais da cadeia polipeptídica produz a forma ativa da PTH com 84 a.a [PTH (1-84)], cuja função biológica reside essencialmente nos primeiros 34 a.a. Clivagens sucessivas da cadeia produzem formas truncadas da hormona com pouca ou nenhuma ação fisiológica. Uma vez sintetizada, a PTH é armazenada em vesículas exocíticas e libertada após o estímulo apropriado [7; 13].

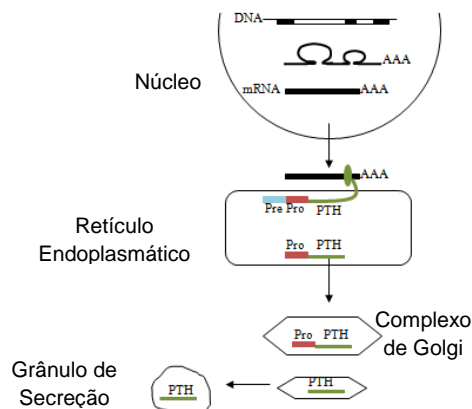


Figura 2: Representação esquemática da síntese de PTH pelas células principais da paratiroide

1.2 Homeostasia do Cálcio

A concentração normal de cálcio no sangue é cerca de 2.2-2.6mmol/L, no entanto apenas uma parte (cerca de 1mmol/L) existe na forma ionizada ($\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$). A maioria do cálcio sanguíneo encontra-se associada a proteínas séricas ou a iões. Existe um equilíbrio finamente regulado entre os níveis de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$ e as formas não livres deste mineral. Assim, fatores como a diminuição das proteínas séricas ou aumento do pH levam a uma redução do nível de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$ [14]. As variações na concentração de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$ são detetadas pelo recetor do cálcio CaSR (*Calcium Sensing Receptor*) nas células principais da paratiroide regulando a síntese e secreção da PTH através de um mecanismo de *feedback* negativo entre os níveis de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$ e síntese de PTH [7].

O CaSR é um recetor transmembranar que pertence à família de recetores acoplados a proteínas G; a sua expressão nas células principais da paratiroide permite a deteção dos níveis de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$ e a ativação de vias de sinalização intracelulares modulando a produção de PTH [3; 7; 12; 15]. Quando há um aumento de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$, este liga-se ao recetor nas células das paratiroides, iniciando uma cascata de eventos que conduzem à inibição da síntese de PTH (**Figura 3**).

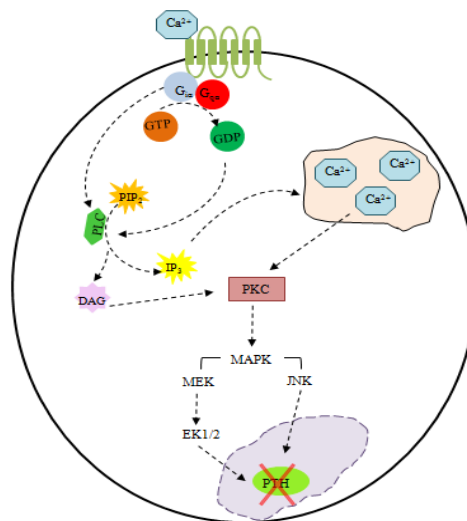


Figura 3: Representação esquemática da modulação da síntese de PTH pela ativação do CaSR após ligação de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$.

Uma vez secretada para a corrente sanguínea, a PTH atua em três alvos principais: 1) osso, 2) rins e 3) sistema gastrointestinal. No osso, a PTH atua diretamente nos osteoblastos, essenciais à ativação dos osteoclastos, cuja função principal é a reabsorção óssea, pela dissolução de cristais de fosfato de cálcio, libertando Ca^{2+} para a corrente sanguínea [16]. Nos rins, a PTH tem duas ações distintas, mas complementares: promove a reabsorção de cálcio nos túbulos renais e inibe a sua excreção na urina, e

estimula a ativação da 1- α -hidroxilase, enzima responsável pela conversão da vitamina D na sua forma biologicamente ativa 1,25(OH) $_2$ D $_3$. Uma vez convertida, a 1,25(OH) $_2$ D $_3$ atua no sistema gastrointestinal, nomeadamente no intestino delgado, e promove o aumento da absorção do cálcio da dieta (**Figura 4**) [12].

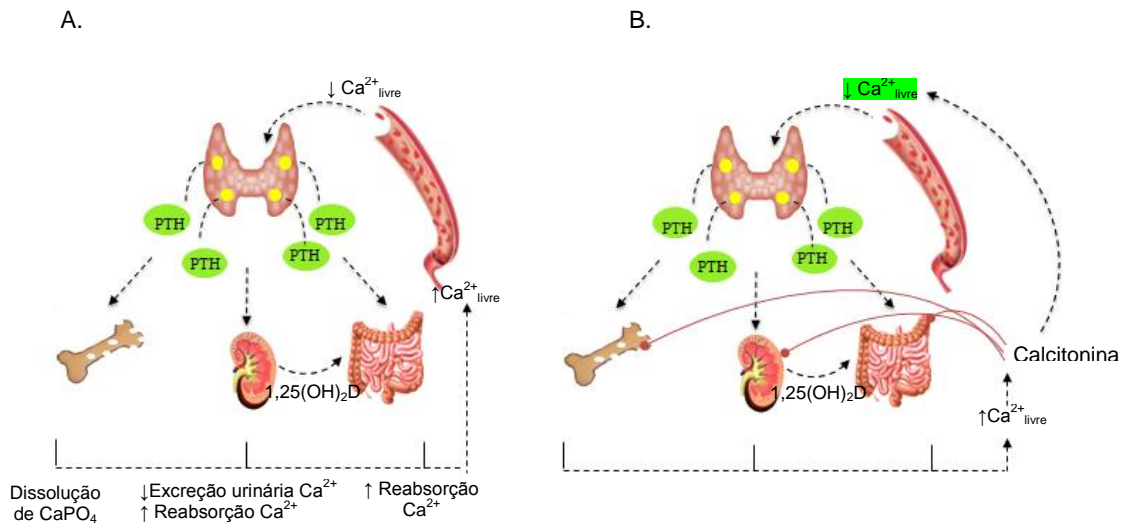


Figura 4: Mecanismo de *feedback* negativo entre a libertação da PTH e os níveis $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$. A) Principais alvos de atuação da PTH. B) Inibição da síntese de PTH e ação antagonista da calcitonina.

Os processos anteriormente descritos conduzem ao aumento do $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$ no plasma. A expressão de CaSR é mais elevada nas células da paratiroide, no entanto também se verifica em outros tecidos como a tiroide, o cérebro e o estômago. Na tiroide, a ativação do CaSR nas células C é um estímulo à produção de calcitonina. Esta é uma hormona peptídica com um efeito inibitório da reabsorção óssea pelos osteoclastos. Um estudo recente sugere que a calcitonina (e não a PTH) é, em condições de normocalcemia, o principal regulador da transcrição da enzima 1- α -hidroxilase, responsável pela formação de 1,25(OH) $_2$ D $_3$, que regula negativamente a síntese de PTH [17; 18].

O balanço entre os níveis de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$ e a síntese e libertação de PTH é essencial à homeostasia do organismo. Várias patologias podem afetar o papel da hormona paratiroideia na regulação dos níveis de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$ no sangue. Entre elas, o hiperparatiroidismo surge com uma das mais frequentes endocrinopatias nos países desenvolvidos [19].

1.3 Hiperparatiroidismo

O hiperparatiroidismo (HPT) é uma patologia da paratiroide que se caracteriza pela produção e secreção excessiva – inapropriada – de PTH por uma ou mais glândulas paratiroides. Nos indivíduos afetados o mecanismo de *feedback* negativo que controla a

secreção de PTH em resposta aos níveis de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$ está comprometido e, por isso, não há inibição da síntese hormonal, conduzindo a um estado permanente de hipercalcemia [7; 13].

Os primeiros casos de hiperparatiroidismo reportados na história da medicina apresentavam sintomas severos de grave hipercalcemia, descalcificação óssea (com desenvolvimento de osteíte fibrosa cística nos doentes mais graves), deficiência renal e nefrolitíase [20]. No entanto, com a introdução de exames laboratoriais de rotina, como a determinação dos níveis séricos de cálcio, atualmente a maioria dos doentes é diagnosticada numa fase assintomática ou apresentando apenas sintomatologia ligeira [21]. Sintomas gastrointestinais como diarreia e náuseas, assim como sintomas do foro psicológico como depressão e cansaço, podem fazer parte do quadro clínico dos pacientes com HPT [22]. Esta patologia pode surgir na forma primária, secundária ou terciária e ao contrário das duas últimas formas o hiperparatiroidismo primário (HPTP) desenvolve-se devido ao funcionamento autónomo e desregulado das glândulas paratiroides, como será descrito mais adiante.

Em circunstâncias fisiológicas é comum ocorrerem situações transientes de hipocalcemia, ativando o CaSR, que estimula a síntese e libertação de PTH para repor o equilíbrio homeostático dos níveis de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$ (**Figura 3**). Deficiências na reabsorção de cálcio (como acontece em pacientes com doença renal crónica) ou na sua absorção a partir da dieta (provocada por carência alimentar em vitamina D, por exemplo) são um estímulo à síntese e libertação de PTH pelas células principais da paratiroide. Por vezes, apesar do aumento da síntese hormonal, o organismo não consegue repor os níveis normais de cálcio no sangue devido a falhas em outros órgãos de regulação deste mineral. Desta forma, os indivíduos desenvolvem hipocalcemia permanente que promove a síntese constitutiva de PTH. Nestes pacientes, em que a produção excessiva de PTH é provocada por estímulos externos à paratiroide, diz-se que desenvolveram Hiperparatiroidismo Secundário (sHPT). Em situações de sHPT de longa duração (sendo a causa mais comum a doença renal crónica), a produção de PTH torna-se, por vezes, independente dos estímulos externos que lhe deram origem [22; 23]. Estes pacientes desenvolvem um estado de hiperparatiroidismo hipercalcémico, uma vez que a produção de PTH se torna independente dos níveis elevados de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$ (provocados por um aumento inadequado da reabsorção óssea, por exemplo). A esta condição é dado o nome de Hiperparatiroidismo Terciário [22].

1.3.1 Hiperparatiroidismo Primário

O HPTP é uma forma de hiperparatiroidismo na qual se verifica um aumento desregulado da síntese de PTH independentemente dos níveis séricos de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$. Esta

patologia surge associada ao desenvolvimento de tumores ou hiperplasia nas glândulas paratiroides [4; 13; 22; 24; 25; 26].

O HPTP é uma das mais frequentes endocrinopatias em países desenvolvidos, afetando cerca de 25 em cada 100 000 indivíduos, com variações estatísticas inerentes à população estudada [25; 27]. As mulheres, sobretudo após a menopausa, são as principais afetadas pela doença, no entanto existem outros fatores de risco como a idade avançada e a radiação cervical em idade jovem. Um aumento da incidência da doença foi observado em sobreviventes da bomba atômica e vários estudos apontam para um aumento do risco de desenvolvimento de hiperparatiroidismo em pacientes submetidos a radioterapia em idade jovem [28].

A presença de um adenoma numa das quatro glândulas paratiroides é a causa mais comum de HPTP, estando na origem de cerca de 85% dos casos. A segunda causa mais frequente de HPTP é o desenvolvimento de hiperplasia em duas ou mais glândulas, contribuindo para cerca de 15% dos casos. Muito raramente (em menos de 1% dos casos), a ocorrência de HPTP deve-se ao desenvolvimento de um carcinoma da paratiroide [26].

1.4 As Três Entidades Tumorais na Paratiroide

A distinção entre adenoma, adenoma múltiplo e hiperplasia é o principal desafio no diagnóstico diferencial da patologia paratiroideia. Tipicamente, os adenomas paratiroideus são envolvidos por uma cápsula fibrosa, com um anel de tecido normal, com ausência de tecido adiposo na lesão. Histologicamente, os adenomas da paratiroide são compostos por células principais ou por uma mistura de células principais e oxifílicas [13]. Uma pequena percentagem destes tumores é composta quase exclusivamente por células oxifílicas sendo por isso denominados por adenomas oxifílicos (*Figura 6: A-C*) [13; 24]. Quando se verifica o envolvimento de duas ou mais glândulas paratiroides na lesão, o diagnóstico mais frequente é de hiperplasia, apesar de não se poder descartar à partida a hipótese de se tratar de adenomas múltiplos (*Figura 6: D*). Atualmente, o diagnóstico diferencial dos tumores paratiroideus é feito com critérios que vão além da histologia. A diminuição dos níveis de PTH durante a paratiroidectomia, assim como o retorno ao estado normocalcémico permanente após remoção de uma glândula afetada, é geralmente diagnóstico de adenoma uniglandular paratiroideu. O ensaio de medição da PTH intraoperativa é também uma ferramenta de diagnóstico de doença multiglandular, quando após remoção de uma lesão aparentemente uniglandular, não se verifica a rápida diminuição dos níveis de PTH [29].

O carcinoma da paratiroide é raro, e o seu diagnóstico é frequentemente feito com base em parâmetros macroscópicos: os carcinomas da paratiroide são normalmente

maiores do que os tumores benignos, sendo por vezes possível sentir uma massa palpável no pescoço dos pacientes. Também se observa um aumento dos níveis de PTH superior ao dos pacientes com adenoma ou hiperplasia da paratiroide. Por essa razão, a hipercalcemia nos pacientes com carcinoma é mais acentuada do que nos pacientes com tumores benignos. A presença de invasão do tecido adjacente é diagnóstica de carcinoma paratiroideu [30; 31]. Os achados histológicos neste tipo de tumor envolvem um índice mitótico superior aos tumores benignos e invasão capsular e/ou vascular. Também se verifica a presença de pleomorfismo e atipia celular, incluindo mitoses atípicas bem como a ocorrência de trabéculas fibróticas [32] (*Figura 6*:F-H). No entanto nenhum destes achados é, até à data, considerado patognomónico de carcinoma paratiroideu [24]. A presença de adenomas atípicos tem sido documentada em vários estudos [31; 32; 33]. Estes tumores partilham várias características, histológicas e não histológicas, com os carcinomas paratiroideus, e por isso é difícil distinguir claramente entre estas duas entidades (*Figura 6*: E) [32; 34].

A dificuldade no diagnóstico diferencial entre as diversas entidades tumorais da paratiroide por critérios macro e microscópicos tornou evidente a necessidade da pesquisa de marcadores moleculares que possam ser utilizados na clínica para melhorar o diagnóstico diferencial entre pacientes.

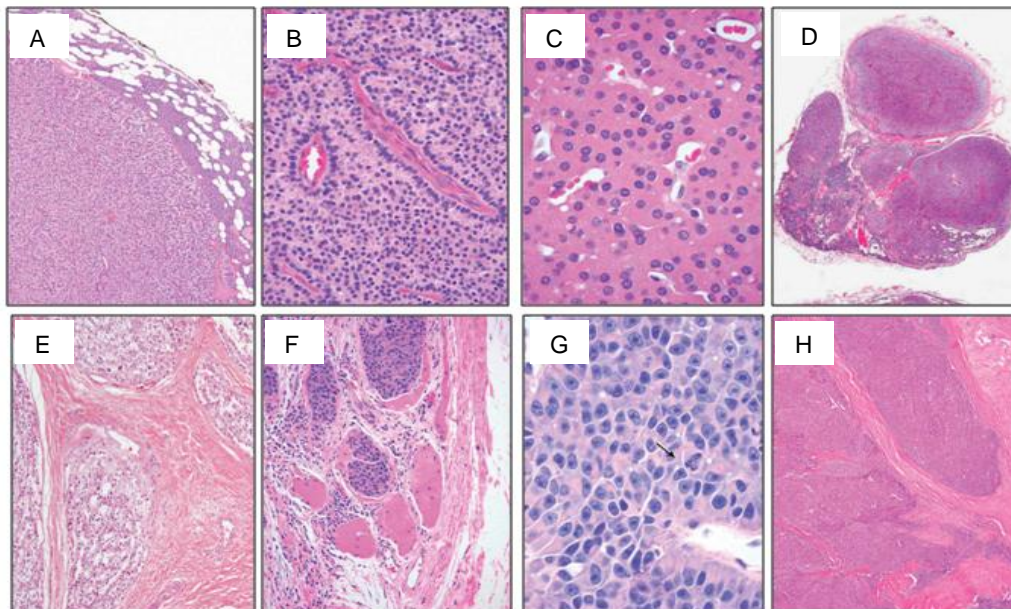


Figura 5: As diferentes entidades da paratiroide (Coloração de H&E): A e B: Adenoma de células principais; C: Adenoma de células oxifílicas; D: hiperplasia multinodular; E: adenoma atípico F a H: carcinoma (adaptado de [35; 36])

1.5 Alterações Genéticas Associadas à Tumorigênese das Glândulas Paratiroides

1.5.1 Proto-Oncogenes

No processo de tumorigênese são protagonistas vários fatores que levam ao controlo do crescimento e/ou proliferação celular promovendo o desenvolvimento das neoplasias.

Os proto-oncogenes são importantes promotores do crescimento e divisão celular normal. Quando são afetados por mutações, convertem-se em oncogenes capazes de induzir transformação celular. A ativação de apenas um oncogene não é aparentemente suficiente para causar cancro, no entanto pode ser suficiente para desregular o ciclo celular, conduzindo a um aumento da taxa mitótica da célula. Quando a célula perde a capacidade de controlo sobre a sua divisão celular, pode adquirir um fenótipo tumorigénico e tal significar o início do desenvolvimento de uma neoplasia [37; 38].

1.5.2 Genes supressores tumorais: o modelo dos dois eventos de Knudson

Os genes supressores tumorais são uma classe de genes cuja inativação produz, na célula, uma vantagem de sobrevivência e/ou proliferação relativamente às células normais. Esta classe de genes geralmente codifica proteínas que funcionam como reguladores negativos do ciclo celular [39].

Em 1971, Knudson descreveu pela primeira vez o modo de inativação destes genes usando como modelo o retinoblastoma (tumor maligno com origem nas células da retina). Knudson verificou que o desenvolvimento deste tumor maligno era mais precoce em pacientes em que um dos progenitores também o tivesse desenvolvido, e que a sua transmissão estava de acordo com o modelo de transmissão dominante mendeliano. Knudson propôs que a mutação genética herdada de um dos pais não era suficiente para desenvolver a doença, mas tornava o alelo normal mais suscetível à ocorrência de mutações somáticas. Segundo este autor, apenas a inativação bialélica dos genes supressores tumorais era capaz de levar à formação de tumores. Nas síndromes hereditárias, o alelo mutado (primeiro evento) é herdado de um dos progenitores e portanto está presente em todas as células do indivíduo. No entanto, no caso de genes supressores tumorais canónicos, o alelo normal (herdado do outro progenitor) é suficiente para manter a produção da quantidade normal de proteína, assegurando assim a sua função fisiológica. É apenas quando ocorre uma mutação somática neste alelo (segundo evento) que a função normal da proteína deixa de estar assegurada. Desta forma, as células perdem um inibidor do ciclo celular e ganham uma vantagem proliferativa e/ou de crescimento relativamente às células que não adquiriram o segundo evento [40]. Em formas de cancro esporádicas, isto é, em que não existe transmissão hereditária, o

desenvolvimento tumoral é mais tardio. Nestes casos a inativação bialélica dos genes supressores tumorais ocorre a nível somático durante a vida do indivíduo e portanto, ambos os eventos devem ocorrer na mesma célula somática para que esta adquira um fenótipo tumoral.

1.5.3 Hiperparatiroidismo Familiar Hereditário

Cerca de 5% de todos os casos de HPT surgem associados a síndromes familiares hereditárias [22]. Apesar de representarem uma pequena percentagem de casos, o estudo de síndromes familiares associadas ao desenvolvimento de hiperparatiroidismo constituiu o ponto de partida para um maior conhecimento da tumorigénese paratiroideia nos casos esporádicos.

1.5.3.1 Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo-1: o gene *Men1*

A causa familiar mais frequente de HPT, representando cerca de 2% de todos os casos, é a síndrome Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (MEN1 – *Multiple Endocrine Neoplasia Type 1*) que resulta de alterações germinativas no gene *Men1* [41]. Este gene é um supressor tumoral que obedece ao modelo proposto por Knudson, e por isso os pacientes MEN1 revelam a presença de uma alteração germinativa numa cópia do gene acompanhada de uma alteração somática que consiste usualmente na perda do alelo normal – perda de heterozigotia (LOH – *Loss Of Heterozygosity*) [42].

Tumores na glândula pituitária e no pâncreas endócrino constituem, junto com os tumores nas paratiroides, a manifestação mais comum de MEN1 [43]. A síndrome é transmitida de forma autossómica dominante e possui um elevado grau de penetrância: cerca de 90% dos pacientes MEN1 desenvolvem HPTP devido à ocorrência de tumores benignos nas paratiroides por volta da quinta década de vida [44].

O gene *Men1*, descrito pela primeira vez em 1997, localiza-se no braço longo do cromossoma 11, na região 11q13, tem uma extensão superior a 9Kb e a sua região codificante é composta por 10 exões, 9 dos quais codificantes [45]. O principal transcrito deste gene é um mRNA de 2.8Kb, no entanto 14 transcritos alternativos já foram documentados [45; 46]. A proteína codificada pelo *Men1* possui 610 a.a, tem o nome de Menina e é ubiquamente expressa. A Menina é uma proteína predominantemente nuclear em células quiescentes, estando também presente no citoplasma de células em divisão [47]. Esta proteína é conservada entre espécies, no entanto a sua estrutura primária não revela homologia com outras proteínas, pelo que a sua exata função biológica continua a ser um alvo de intenso estudo por vários grupos [46; 48]. A Menina é uma proteína *scaffold*, com diversos parceiros de ação envolvidos na regulação da transcrição, estabilidade genómica, divisão celular e proliferação. Esta proteína tem um papel

fundamental na regulação da transcrição, em parte através da modelação da cromatina, formando complexos com MLL2 (*Mixed Lineage Leukemia 2*). Os complexos Menina-MLL possuem atividade histona metiltransferase (HMT) específica para a Lisina 4 da Histona 3 (H3K4), ativando a transcrição de genes alvo. Em 2005 um grupo de investigadores verificou que a formação destes complexos induz a transcrição dos inibidores do ciclo celular p27^{Kip1} e p18^{INK4c}, contribuindo para a sua ação como supressor tumoral [49]. O papel da Menina na regulação da transcrição passa ainda pela sua associação com histona deacetilases (HDAC – *Histone Deacetylase*). A interação de menina com HDAC1 e HDAC2 é essencial para a sua ligação com o fator de transcrição JunD e em 2003 Kim *et al* verificou que a supressão da transcrição de genes alvo deste fator de transcrição era revertida pela adição de um inibidor de HDACs [48; 50]. JunD é um fator de transcrição que existe naturalmente associado a Menina podendo, no entanto, existir na forma livre. Quando associado à Menina, JunD funciona como inibidor do crescimento celular, enquanto à disrupção da ligação está associado o fenótipo MEN1[51].

Para além do papel na regulação da transcrição, a proteína Menina tem também uma função importante na inibição da proliferação celular: a expressão ectópica desta proteína é capaz de inibir a proliferação de células NIH3T3 oncogénicas (com sobre expressão do oncogene *RAS*) e de inibir a formação de tumores em ratinhos transplantados com essas células [52]. Além disso, foi também demonstrado que a Menina induz a expressão da caspase 8, um componente essencial da via extrínseca da apoptose [53; 54].

Estudos de co-imunoprecipitação verificaram a associação de Menina com as proteínas de reparação do DNA RPA2 e FANCD2. A proteína RPA2 (*Replication Protein 2*) é essencial na replicação, recombinação e reparação do DNA, assim como na regulação da apoptose e transcrição [55]. A proteína FANCD2 (*Fanconi Anemia Complementation group D2*) está envolvida na reparação do DNA associada à via *BRCA-1* (*Breast Cancer-1*) e a sua ligação a Menina é potenciada pela exposição a raios-γ. Os pacientes MEN1 apresentam um aumento de quebras no DNA, o que sugere um papel importante da ligação Menina-FANCD2 no desenvolvimento da patologia [56].

Para além dos estudos que mostram a associação da Menina com proteínas essenciais na manutenção da estabilidade celular, estudos de ratinhos heterozigóticos com LOH no gene *Men1* verificaram que estes apresentam um espectro de tumores semelhante aos pacientes com MEN1 [57; 58].

Apesar de o gene *Men1* não apresentar *hot spots* mutacionais, desde a sua identificação até à atualidade já foram descritas mais de 400 mutações associadas ao desenvolvimento de MEN1, distribuídas por toda a região codificante [58].

Apesar do grande número de alterações genéticas descritas não é possível estabelecer uma relação genótipo/fenótipo nos indivíduos portadores de mutações neste gene. Deleções *frameshift* são o tipo mais frequente de alteração, representando cerca de 37% de todas as mutações conhecidas, seguidas de mutações *missense* que representam 25% [59]. As mutações que atingem o *Men1* são geralmente inativantes ou provocam uma perda parcial da função da proteína. Muitas vezes resultam em formas truncadas de Menina, com perda de domínios funcionais como os Sinais de Localização Nuclear (NLS – *Nuclear Localization Signal*) que são essenciais para direcionar a proteína para o núcleo, mas também para outros processos biológicos, como a ativação da caspase 8 [53]. Outras vezes, o mRNA transcrito é demasiado instável e rapidamente degradado [58]. Por outro lado, os estudos de Yaguchi *et al* mostraram que algumas mutações *missense* do gene *Men1* podem afetar a.a essenciais à sua atividade *scaffold*, enquanto outras marcam a proteína para degradação por mecanismos pós-tradução, como por exemplo através da via ubiquitina-proteassoma. As mutações estudadas por este grupo de investigadores não provocaram diminuição dos níveis de mRNA, e por isso os autores sugerem que a inibição da transcrição não é um mecanismo de silenciamento do *Men1* [60].

1.5.3.2 Hiperparatiroidismo Associado a Tumor da Mandíbula: o gene *CDC73/HRPT2*

Outro gene supressor tumoral associado à tumorigénese das glândulas paratiroides é o gene *CDC73/HRPT2* (*Hyperparathyroidism-2*). Alterações germinativas no *CDC73/HRPT2* levam ao desenvolvimento de HPT familiar associado ao desenvolvimento de tumores na mandíbula (HPT-JT – *Hyperparathyroidism Jaw-Tumor*) [61]. Esta síndrome familiar tem como principais sintomas a ocorrência de adenomas atípicos ou carcinomas na paratiroide, associados ao desenvolvimento de fibromas ossificantes na mandíbula, embora possam ocorrer em outras zonas do esqueleto. A ocorrência de pólipos uterinos bem como quistos renais e hamartomas tem sido documentada em vários estudos em famílias com HPT-JT [62]. Cerca de 80% dos indivíduos afetados apresenta hiperparatiroidismo e cerca de 15% desenvolve um carcinoma na paratiroide [24; 63].

O gene *CDC73/HRPT2* é um supressor tumoral clássico, sendo necessária a inativação dos dois alelos para produzir um efeito na célula [64]. A primeira associação deste gene com o desenvolvimento de HPT-JT foi feita em 1996, quando um grupo de investigadores estudou duas famílias com HPT-JT e verificou a presença de LOH na região 1q25-32 [65]. O *CDC73/HRPT2* possui 17 exões e codifica uma proteína nuclear de 531 a.a, ubiquamente expressa chamada Parafibromina [61]. A sua estrutura primária não revela homologia com outras proteínas conhecidas. Apenas um fragmento de cerca

de 200bp na zona C-terminal da Parafibromina apresenta uma discreta homologia com a proteína *cdc73*, presente em levedura, com funções ao nível da regulação da transcrição [66]. Estudos de imunoprecipitação demonstraram que a Parafibromina se associa ao complexo PAF-1 (*Poyimerase Associated Factor 1*) e às formas fosforiladas da RNAP II (RNA polimerase II). Os mesmos estudos sugerem um papel central da Parafibromina nos processos de regulação da transcrição e tradução mediados pelo complexo PAF-1 e RNAP II. A análise de formas mutadas da Parafibromina, verificou ainda que estas apresentam deleções na região C-terminal, responsável pela ligação da Parafibromina a estes dois complexos, o que sugere que esta associação pode ter um papel na atividade de supressão tumoral da Parafibromina [66; 67]. Estudos em linhas celulares demonstraram que a Parafibromina endógena, em associação com o complexo PAF-1, reprime a expressão do proto-oncogene *c-myc* por ligação à sua região promotora, inibindo a sua ação proliferativa [68]. A Parafibromina possui um NLS na região N-terminal responsável pela sua sinalização para o núcleo. A sobre-expressão da forma normal (WT – *Wild Type*) da proteína conduziu a um aumento da apoptose em células transformadas, por comparação às células com mutação na região N-terminal da Parafibromina, evidenciando assim o papel fundamental do NLS na função anti-tumoral da Parafibromina [69].

Tal como o *Men1*, o gene *CDC73/HRPT2* não apresenta *hot-spots* mutacionais. As mutações descritas até a data percorrem toda a região codificante, no entanto está descrita uma maior incidência de mutações nos exões 1, 2 e 7 [64]. Apesar disso, não é possível estabelecer uma relação genótipo/fenótipo a partir da determinação do estudo de mutações no *CDC73/HRPT2*.

1.5.3.3 Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2a: o gene *RET*

O processo de tumorigénese pode ser desencadeado por oncogenes que representam formas alteradas ou sobre-expressas de proto-oncogenes [37; 38].

Alterações germinativas no proto-oncogene *RET* (*REarranged during Transfection*) são responsáveis pela ocorrência de três fenótipos neoplásicos hereditários: Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2a (MEN 2a – *Multiple Endocrine Neoplasia type 2a*) e 2b (MEN 2b) e carcinoma medular da tiroide familiar (FMTC – *Familial Medullary Thyroid Cancer*). O HPT surge no contexto da síndrome MEN 2a, associado a carcinoma medular da tiroide e feocromocitoma. Nestes pacientes o fenótipo de HPT é ligeiro e geralmente associado ao desenvolvimento de tumores benignos na paratiroide [70]. A proteína c-RET, codificada pelo gene *RET*, é uma tirosina cinase ubiquamente expressa. Ao contrário do que acontece nos genes *Men1* e *CDC73/HRPT2* as mutações germinativas do gene *RET* permitem estabelecer uma relação

genótipo/fenótipo nos indivíduos afetados. Cerca de 85% dos casos de MEN 2a apresentam uma mutação *missense* no codão 634 deste gene [71; 72].

1.5.3.4 Hipercalcemia Familiar: o gene *CaSR*

Um dos componentes chave do metabolismo do cálcio no organismo é, como já foi referido, o recetor do cálcio na paratiroide, *CaSR*. Alterações germinativas neste gene estão na base de três fenótipos associados a hipercalcemia [72]. A síndrome de Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar (FHH – *Familial Hypercalcemia Hypocalciuria*) é provocada por mutações heterozigóticas no *CaSR*. Esta patologia caracteriza-se por uma ligeira elevação do nível de Ca^{2+}_{livre} necessário para iniciar a síntese de PTH, e por isso os indivíduos afetados apresentam hipercalcemia. Quando as mutações no *CaSR* ocorrem em homozigotia desenvolve-se a síndrome Hiperparatiroidismo Neonatal Severo (NSHPT – *Neonatal Severe Hyperparathyroidism*). Os pacientes afetados por NSHPT necessitam de níveis mais elevados de Ca^{2+}_{livre} para iniciar a síntese de PTH do que os pacientes com FHH, e apresentam por isso um estado de hipercalcemia severa. Em 2000, Carling *et al* descreveram uma família com um fenótipo de hipercalcemia e hipercalcúria, diferente de FHH e NSHPT, cujos testes genéticos revelaram a presença de uma mutação inativante na região intracelular do *CaSR*. A síndrome foi chamada de Hiperparatiroidismo Autossómico Dominante Ligeiro (ADMHPT – *Autosomal Dominant Mild Hyperparathyroidism*), e ao contrário dos pacientes com FHH e NSHPT, a sua hipercalcemia é reversível através de tratamento [73].

1.5.3.5 MENX e MEN4: dos Ratinhos aos Pacientes

Em 2006 um grupo de investigadores reportou o desenvolvimento espontâneo de múltiplos tumores endócrinos numa colónia de ratinhos. Os animais apresentavam adenomas da glândula pituitária, feocromocitomas bilaterais, paragangliomas, hiperplasia das células C da tiroide, hiperplasia da paratiroide e hiperplasia do pâncreas endócrino. Esta síndrome multi-tumoral foi chamada de MENX uma vez que o seu fenótipo era transversal ao das Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 e Tipo 2 [74]. Por estudos de *linkage* e clonagem, o mesmo grupo verificou que o *locus* associado a MENX se localizava no cromossoma 4 do ratinho, excluindo assim o envolvimento de genes chave responsáveis pelas síndromes de Neoplasia Endócrina Múltipla, *Men1* e *RET*. Foi identificado o gene *Cdkn1b* como responsável pela patologia e a pesquisa de mutações mostrou que estes animais apresentavam uma duplicação de 8nt no exão 2 do gene, causando uma mudança na grelha de leitura [74].

No ser humano o gene *CDKN1B* localiza-se no cromossoma 12 e tem 3 exões, sendo apenas dois deles codificantes. O seu produto é uma proteína de 198 a.a com

ação inibidora do ciclo celular chamada p27^{Kip1} [Uniprot]. A p27^{Kip1} pertence à família de inibidores de complexos formados entre ciclinas (proteínas com papel na ativação do ciclo celular) e cinases dependentes de ciclinas (CDK – *Cyclin Dependent Kinases*): complexos Ciclina-CDK. Um dos fatores mais importantes na função da p27^{Kip1} é a sua sub-localização celular. Enquanto proteína nuclear, a p27^{Kip1} é um inibidor dos complexos Ciclina A-CDK2, Ciclina E-CDK2 [75]. Os alvos da CDK2 são proteínas da família da proteína retinoblastoma (pRb), que uma vez fosforiladas ficam inativas e libertam fatores de transcrição da família E2F. Uma vez ativos estes fatores promovem a transcrição de genes responsáveis pela progressão do ciclo celular. A ligação da p27^{Kip1} a complexos Ciclina A-CDK2 inibe, portanto, a progressão no ciclo celular e mantém as células na fase G1 do ciclo. No citoplasma, a p27^{Kip1} é fundamental na associação dos complexos Ciclina D-CDK4,6 que promovem a progressão no ciclo celular [76]. Ainda no citoplasma, a p27^{Kip1} desempenha funções independentes do ciclo celular relacionadas com apoptose e mobilidade, no entanto, estas funções são dependentes do tipo de célula e os mecanismos que as medeiam não são ainda totalmente conhecidos [75].

Cerca de 30% dos pacientes com fenótipo MEN1 não apresentam mutações germinativas na região codificante do *Men1*, o que se pode dever à localização de mutações em regiões intrónicas, ou alterações no promotor (regiões que normalmente não são analisadas), mas também pode sugerir que esses pacientes são portadores de mutações em outros genes, ainda por identificar. O espectro de tumores destes pacientes é transversal a MEN1 e MEN2, tal como acontece nos modelos animais estudados por Pellegata *et al*, e considera-se que estes indivíduos representam uma nova síndrome de neoplasia endócrina múltipla: Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 4 (MEN4). Desde 2006 até hoje, quatro estudos descreveram diferentes alterações germinativas no gene *CDKN1B* em pacientes com Neoplasia Endócrina Múltipla sem mutação no *Men1* ou no *RET* [74; 77; 78; 79]. No estudo de Pellegata *et al*, os investigadores verificaram a presença de uma mutação *nonsense* germinativa na região codificante do *CDKN1B*, resultando na produção de uma proteína truncada, com um codão STOP prematuro no resíduo 76 [74]. Em 2007, outro grupo de investigação observou uma mutação germinativa cujo resultado é a produção de uma proteína truncada com menos 69 a.a relativamente à proteína normal [78]. Em conjunto, estes resultados apoiam o papel de supressor tumoral do *CDKN1B*.

Para além da pesquisa de mutações na região codificante do gene, vários têm sido os polimorfismos do *CDKN1B* estudados bem como a sua associação ao desenvolvimento e prognóstico de várias neoplasias, em particular o polimorfismo V109G (SNP ID: rs2066827). Nesta variante ocorre a troca de um resíduo Valina por um resíduo

Glicina no a.a 109 devido a uma transição T→C na posição 326 da região codificante [80; 81]. Em 2011, um estudo analisou a distribuição deste polimorfismo em 84 pacientes com carcinoma medular da tiroide e verificou que a presença da variante T (WT) estava significativamente associada a pior prognóstico [80]. Por outro lado, vários estudos apontam para uma associação da variante G com pior prognóstico nos pacientes com neoplasias da próstata, mama e pulmão [80; 81]. A associação deste polimorfismo com o processo tumorigénico da paratiroide ainda não é totalmente compreendida.

Mais recentemente foi descrita a inativação bialélica do *CDKN1B* em adenomas da paratiroide, demonstrando o potencial do *CDKN1B* como um gene de suscetibilidade na tumorigénese paratiroideia [77]. Para além disso, vários estudos verificaram alterações na expressão de p27^{Kip1} em tumores da paratiroide e permitiram a observação de diferenças de expressão entre tumores benignos e malignos, com uma diminuição mais acentuada da expressão de p27^{Kip1} em carcinomas da paratiroide relativamente a adenomas e hiperplasias [82]. Nos trabalhos anteriormente referidos, os tumores com mutação no *CDKN1B* apresentaram perda de expressão de p27^{Kip1}. No entanto, o estudo dos níveis de mRNA nas diferentes lesões permitiu verificar que estes são idênticos ao tecido normal, sugerindo que os mecanismos responsáveis pela inibição da expressão de p27^{Kip1} atuam ao nível pós-transcrição [74; 77; 78; 79].

Como já foi referido, a transcrição de p27^{Kip1} é promovida pela associação Menina-MLL. Por outro lado, a relação deste inibidor do ciclo celular com o gene *RET*, responsável pelo desenvolvimento de MEN2a, ainda não é totalmente compreendido. Sabe-se que em células de carcinoma medular da tiroide a ativação oncogénica do *RET* está associada à sub-expressão de p27^{Kip1} bem como ao aumento da expressão de Ciclina D1, uma proteína envolvida no crescimento e proliferação celular [83]. Assim, os estudos parecem apontar para a p27^{Kip1} como um ponto de convergência das vias de regulação da proliferação de células neuroendócrinas.

A **Tabela 1** sumariza as síndromes familiares associadas ao desenvolvimento de HPTP, bem como as alterações genéticas que lhes estão associadas.

Tabela 1: Principais síndromes familiares associadas ao desenvolvimento de HPTP e respetivas localizações

Síndrome Familiar	Gene Responsável	Localização
MEN 1	<i>Men1</i>	11q13
MEN 2a	<i>RET</i>	10q11.2
HPT-JT	<i>HRPT2</i>	1q25
FHH	<i>CaSR</i>	3q13
ADMH	<i>CaSR</i>	3q13
NSHPT	<i>CaSR</i>	3q13
MEN 4	<i>Cdkn1b</i>	12p13

1.5.4 Hiperparatiroidismo Primário Esporádico

A vasta maioria (cerca de 90%) dos casos de HPTP ocorre na forma esporádica [84]. As síndromes familiares com presença de HPTP foram o ponto de partida para o estudo destes casos.

1.5.4.1 Mutações no Gene *Men1* Representam a Alteração mais Frequente em Pacientes com HPTP Esporádico

A presença de LOH envolvendo a região 11q13 foi observada em 5 até 50% de tumores endócrinos esporádicos, chamando a atenção para o envolvimento do gene *Men1* na patogênese destes tumores [58]. Cerca de 20 a 30% dos casos de HPTP esporádico apresentam mutações no gene *Men1*. Um estudo recente mostrou, através de *Whole-Exome Sequencing*, que a taxa de mutações nestes tumores pode chegar até 35% [85]. Tal como acontece nos casos familiares, nos indivíduos com HPTP esporádico não se verificam *hot-spots* mutacionais no gene *Men1*. Mais de 200 mutações somáticas no *Men1* foram já associadas ao desenvolvimento de neoplasias esporádicas [86]; destas cerca de 40% são *frameshift*, 29% são *missense*, 18% são *nonsense*, 7% são mutações no *splice-site* e 6% são deleções ou inserções *in-frame*. Na maioria dos tumores estudados, a presença de mutação numa cópia do gene é acompanhada de LOH no alelo normal restante, indicando que na paratiroide o *Men1* obedece ao modelo de Knudson para genes supressores tumorais [58].

1.5.4.2 Ação oncogénica da Ciclina D1 nos tumores esporádicos da paratiroide

Em 1989 um grupo de investigadores descreveu pela primeira vez o rearranjo cromossômico inv 11(p15)(q13) em tumores da paratiroide. Este rearranjo coloca o gene *CCND1* sob o controlo direto do promotor do gene *PTH* [87] (*Figura 7*). Este gene foi descrito pela primeira vez por clonagem posicional a partir de DNA de um adenoma da paratiroide, pelo que o seu nome original é *PRAD1* (*Parathyroid Adenomatosis 1*). O seu produto é uma proteína com 295 a.a chamada Ciclina D1. A Ciclina D1 é um componente central da regulação do ciclo celular, promovendo a progressão de G1 para a fase S. A Ciclina D1 liga-se à CDK4 e CDK6 formando complexos ciclina-CDK com capacidade para fosforilar a Rb. Uma vez fosforilada a Rb liberta o fator de transcrição E2F iniciando a transcrição de genes chave para a entrada na fase S do ciclo celular [88].

O rearranjo inv 11(p15)(q13) é detetado em cerca de 5% dos adenomas da paratiroide, no entanto é observada sobre-expressão de Ciclina D1 em cerca de 30% dos casos, o que pode indicar outros mecanismos moleculares responsáveis pelo papel oncogénico da Ciclina D1 nestes tumores. Para aprofundar esta questão um grupo de investigadores gerou ratinhos transgênicos com sobre-expressão de Ciclina D1,

mimetizando o rearranjo entre a Ciclina D1 e o promotor do gene PTH (Ciclina D1/PTH). Neste modelo os animais apresentaram hiperplasia das glândulas paratiroides e mantiveram a sua capacidade de produção de PTH [89]. A manutenção da secreção de PTH nestes animais pode dever-se ao aumento do número de células produtoras ou a um mecanismo de compensação do alelo normal devido à perda do promotor no outro alelo.

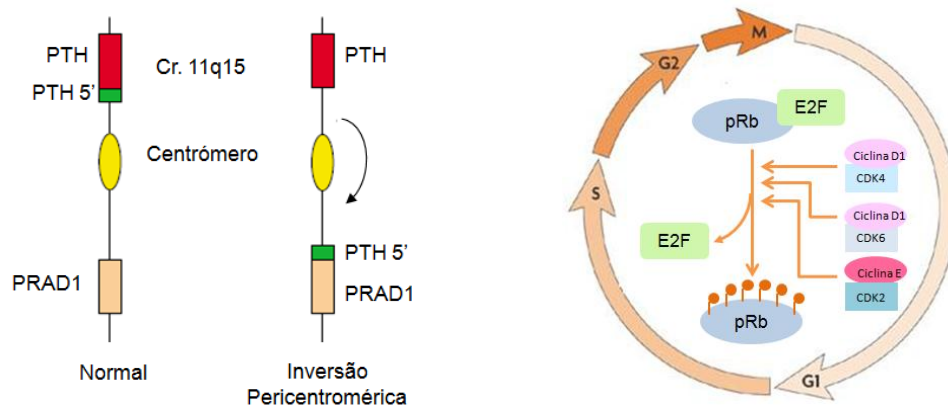


Figura 6: Rearranjo entre a região promotora do gene *PTH* e o gene *CCND1* [inv11(p15)(q13)]; papel da proteína Ciclina D1 na progressão do ciclo celular mediada por fosforilação da proteína Rb.

1.5.4.3 As alterações no gene *CDC73/HRPT2* são patognomónicas de carcinoma da paratiroide?

O carcinoma da paratiroide é uma entidade tumorigénica rara, sendo responsável por cerca de 1% de todos os casos de HPT [26]. Como referido anteriormente, alterações germinativas do gene *CDC73/HRPT2* são responsáveis pelo desenvolvimento da síndrome familiar HPT-JT cujos pacientes apresentam um risco aumentado de desenvolver carcinoma da paratiroide [61]. Este facto fez com que vários grupos de trabalho levassem a cabo a pesquisa de mutações neste gene em carcinomas paratiroideus aparentemente esporádicos. Como resultado, os estudos têm verificado que a taxa de mutações do *CDC73/HRPT2* nestes tumores é elevada, tendo sido encontradas alterações em mais de 70% dos casos estudados [64; 90]. Para além disso, a realização destes estudos tem permitido verificar que a presença de mutações no *CDC73/HRPT2* em lesões benignas esporádicas da paratiroide é muito rara [64; 91].

A perda de expressão nuclear de Parafibromina tem sido defendida, por alguns autores, como critério no diagnóstico diferencial de carcinomas paratiroideus, uma vez que os estudos apontam para a perda da sua expressão na vasta maioria dos tumores avaliados [92; 93]. No entanto, alguns adenomas da paratiroide também podem apresentar perda de expressão desta proteína, e há estudos que descrevem tumores invasivos da paratiroide que mantêm a expressão de Parafibromina [91]. Todas estas observações fazem com que o uso da marcação nuclear imunohistoquímica da

Parafibromina seja ainda um assunto em debate e controverso no diagnóstico diferencial de tumores da paratiroide.

1.5.5 Novos Genes Candidatos na Tumorigênese Paratiroideia

Mutações em genes candidatos, escolhidos pelo seu papel conhecido no desenvolvimento das glândulas paratiroides ou na secreção hormonal, têm sido estudados quanto a um possível papel na tumorigênese paratiroideia.

CaSR

Apesar do seu papel fundamental na homeostasia do cálcio e no equilíbrio entre os níveis deste mineral e os níveis de PTH, até hoje ainda não foram detetadas alterações somáticas no *CaSR*. Um estudo recente averiguou a associação entre a expressão deste recetor, a expressão de Parafibromina e a presença de mutações (germinativas e/ou somáticas) no *CDC73/HRPT2* em carcinomas esporádicos da paratiroide. Os autores verificaram que a perda de expressão de *CaSR* e de Parafibromina em conjunto com mutações (germinativas e/ou somáticas) no *CDC73/HRPT2* são fortes indicadores de mau prognóstico para os pacientes, estando associados a um menor tempo livre de doença e menor sobrevivência. Apesar de apenas verificarem perda de expressão em cerca de 30% dos tumores analisados, os autores verificaram que esta alteração estava associada a um risco 16 vezes superior de desenvolver recorrência local ou metástases à distância [94]. Contudo, os mecanismos subjacentes a tal associação ainda estão por elucidar.

VDR

No rim a PTH induz a produção de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ que atua no trato gastrointestinal promovendo o aumento da absorção de cálcio da dieta. Os efeitos inibitórios de $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ (administrado oral ou intravenosamente) na produção de PTH têm sido observados em vários pacientes com sHPT, alguns dos quais evidenciaram diminuição do tamanho da hiperplasia paratiroideia após tratamento [95]. Em 1989, Kremer e seus colaboradores, mostraram, numa cultura primária de células da paratiroide, que o efeito antiproliferativo de $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ se devia à inibição da expressão do proto-oncogene *c-myc*, e conseqüentemente, a um atraso na proliferação das células [96]. No entanto, os mecanismos através dos quais ocorre tal inibição não são totalmente compreendidos e por essa razão o recetor de $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ na paratiroide, VDR (*Vitamin D Receptor*), tem sido alvo de estudo por parte de alguns grupos de investigação. Até à data não foram encontradas mutações neste recetor nos tumores de pacientes com HPTP, no entanto algumas variantes polimórficas têm sido associadas ao desenvolvimento de HPTP. Um estudo recente propõe que o aumento do nível de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$ estimula a expressão do VDR

na paratiroide através da ativação da via ERK1/2-MAPK e que a ligação de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a este recetor exerce um efeito inibitório sobre a transcrição do gene PTH [97]. Em 1997 Carling *et al* observaram a associação entre 2 polimorfismos no gene *VDR* e a presença de HPTP esporádico em mulheres após a menopausa. A mesma associação não foi verificada em pacientes com hiperparatiroidismo associado a MEN1 ou a doença renal – sHPT [98]. Em 2000, os mesmos autores verificaram uma diminuição nos níveis de mRNA do *VDR* em adenomas paratiroideus de pacientes com HPTP e em glândulas hiperplásticas de pacientes com sHPT. A diminuição observada atingia valores entre os 28–50% relativamente ao tecido normal com valores semelhantes entre os dois tipos de lesão [99]. Assim, a perda de expressão de *VDR* na paratiroide tem sido associada ao aumento da proliferação celular, no entanto esta diminuição não parece ser o resultado de mutações no gene mas talvez de mecanismos de regulação da transcrição.

CDKN1B

A descoberta da nova síndrome MENX em ratinhos, por Pellegata *et al*, constituiu o início do estudo do gene *CDKN1B* no contexto da tumorigénese na paratiroide. Em 2011, Costa-Guda e seus colaboradores descreveram pela primeira vez a presença de mutações no *CDKN1B* em pacientes com HPTP esporádico. Neste estudo foram observadas três mutações germinativas e uma mutação *frameshift* somática (c.582del25) acompanhada de LOH [77].

Alterações na via de sinalização *Wnt* têm sido associadas a várias neoplasias. O aumento da expressão nuclear de β -catenina, codificada pelo gene *CTNNB1* e a presença de mutações truncantes no seu recetor, *LRP5*, têm sido descritos em algumas séries de tumores paratiroideus, nomeadamente em carcinomas [100; 101]. Por outro lado, a pouca consistência dos resultados relativos à expressão de β -catenina em tumores paratiroideus tem descartado a hipótese de esta via ter um papel fundamental na tumorigénese da paratiroide. Esta é uma matéria muito debatida e ativamente estudada atualmente, dado o potencial do recetor *LRP5* como alvo terapêutico [100].

Recentemente o eixo PTH→FGF23 tem sido alvo de estudo por vários grupos. O FGF23 (*Fibroblast Growth Factor 23*) é expresso em vários tecidos do organismo, nomeadamente nos osteócitos e osteoblastos. Quando os osteoblastos são ativados expressam FGF23, e os seus órgãos alvo são tecidos que expressam FGFRs (*Fibroblast Growth Factor Receptors*) em conjunto com a isoforma α ou β do co-recetor Klotho. Na paratiroide é expresso o complexo α -Klotho/FGFR1, essencial para a ligação do FGF23. Alguns estudos indicam que o FGF23 regula negativamente os níveis de mRNA de PTH *in vitro* e *in vivo*. No entanto, também se verifica que em pacientes com doença renal crónica se desenvolve sHPT associado a elevados níveis de FGF23 no plasma, o que

contradiz o efeito supressor do FGF23 na síntese de PTH. Os resultados ainda não são conclusivos, uma vez que existem estudos que verificam que estes pacientes apresentam uma redução dos níveis de Klotho/FGFR1 [102]. Num estudo recente Björklund *et al* verificou que a expressão de Klotho era significativamente menor (ou ausente) numa série de adenomas esporádicos da paratiroide, quando comparados com tecidos normais. Para além disso, este grupo de investigadores verificou ainda que os níveis de Klotho se correlacionavam inversamente com os níveis de cálcio no plasma, no entanto os autores não foram capazes de encontrar uma associação entre a produção de PTH e a expressão de Klotho [103]. Os mecanismos de regulação da produção de PTH e dos níveis de cálcio no sangue pelo FGF23 e pelo seu co-recetor Klotho são ainda largamente desconhecidos, pelo que mais estudos deverão ser relevantes na elucidação do seu papel na tumorigénese paratiroideia.

A maior incidência de HPTP esporádico nas mulheres pode ser um indicador do papel das hormonas femininas na origem da patologia. Por este motivo, um grupo de investigadores abordou recentemente a distribuição do recetor da prolactina em tumores esporádicos da paratiroide [104]. Durante a gravidez, a esta hormona suprime os efeitos da Menina nas células β -pancreáticas, aumentando a sua proliferação. Para além disso, sabe-se também que a prolactina tem efeitos calciotrópicos nos mesmos órgãos alvo da PTH. Os autores verificaram que o recetor da prolactina (PRLr – *Prolactin Receptor*) era significativamente mais expresso na paratiroide do que em outros tecidos normais, e que a sua expressão, assim como a sua localização subcelular, eram variáveis em adenomas esporádicos da paratiroide. Após tratamento de células tumorais de paratiroide com prolactina os autores observaram um aumento da secreção de PTH, dentro do intervalo fisiológico, no entanto não verificaram alterações na concentração de Ca^{2+} intracelular, o que pode ser indicativo de uma nova via de estímulo à síntese de PTH independente dos níveis de cálcio intracelular [104].

Estudos de Hibridação Genómica Comparativa (CGH – do inglês *Comparative Genomic Hybridization*) permitiram observar perdas e ganhos cromossomais em regiões específicas, o que sugere a presença, nestes locais, de genes supressores tumorais e oncogenes ainda por identificar e com um papel potencial na tumorigénese paratiroideia. As principais regiões onde se verificaram perdas cromossomais em lesões paratiroideias são 1p, 6q, 9p, 11q e 13q. Potenciais oncogenes podem estar localizados nas regiões 9q, 16p, e 19p, onde se verificaram maiores ganhos de material genético em tumores da paratiroide. Em 2002, Garcia *et al* sugeriram que a elevada percentagem de aberrações cromossómicas detetadas em adenomas paratiroideus contrasta com estudos que mostram que este tipo de alteração está associado com grau de malignidade em outros

tumores endócrinos, sugerindo que os mecanismos de oncogénese podem não ser idênticos nos diferentes órgãos endócrinos [105]. Os desequilíbrios cromossomais são um mecanismo aceite de modelação da expressão de micro-RNAs (miRNAs). Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes capazes de regular a expressão e a estabilidade de mRNAs alvo. Em 2010, um grupo de investigadores descreveu pela primeira vez um perfil de expressão de miRNAs em carcinomas da paratiroide. Através de *microarray* e RT-PCR os autores verificaram que a expressão de 3 miRNAs era significativamente diferente entre carcinomas e adenomas da paratiroide (miR-296, miR-222 e miR-503) e que o perfil de expressão de miRNAs permitia distinguir tumores de tecidos normais. Os mesmos autores verificaram que a expressão do mRNA de p27^{Kip1} e HGS (*Hepatocyte Growth factor-receptor regulated tyrosine kinase Substrate*) se correlacionava negativamente com a expressão dos mesmos miRNAs [106]. Estudos adicionais são necessários para esclarecer a relevância biológica destes achados.

A **Tabela 1** apresenta o resumo das principais alterações genéticas descritas no desenvolvimento de tumores esporádicos nas glândulas paratiroides, assim como as síndromes familiares hereditárias que lhe estão associadas.

Tabela 2: Resumo das principais alterações moleculares associadas ao desenvolvimento de tumores da paratiroide familiares e esporádicos (adaptado de [107])

	Men1	CCND1	HRPT2	RET	CaSR
Mutações Germinativas	Mutações Inativas LOH	----	Mutações Inativas LOH	Mutações ativantes	Mutações Inativas
Síndrome Familiar Benignos	MEN1	----	HPT-JT	MEN2A	NSHPT/FHH
Mutações somáticas	Mutações Inativas LOH	Ativação; Inv(11) (p15;q13)	Mutações Inativas	N	N
Prevalência da alteração somática	20 – 30%	~5%	2-4%	---	---
Expressão proteica (%)	Sub-expressão (20 – 40%)	Sobre-expressão (30-40%)	Sub-expressão ND	ND	Sub-expressão (até 90%)
Malignos					
Mutações somáticas	Mutações nativantes	ND	Mutações Inativas, LOH	N	ND
Prevalência da alteração somática	~13%	ND	70-100%	---	---
Expressão proteica (%)	ND	Sobre-expressão ~90%	Sub- expressão ou perda (70-100%)	ND	Sub-expressão (~30%)

N: Negativo; ND: Não Determinado

1.6 Seguimento dos Pacientes com Hiperparatiroidismo Primário

O HPT é uma das endocrinopatias para a qual os estudos clínicos controlados produziram mais progressos reais no diagnóstico e terapia dos pacientes. A implementação de testes laboratoriais de rotina permitiu diagnosticar os pacientes em estados mais precoces da doença, e a apresentação clássica dos pacientes com elevada descalcificação óssea ou nefrolitíase tornou-se rara. Hoje em dia, cerca de 80% dos pacientes são assintomáticos ou apresentam apenas sintomas ligeiros [21].

Quando um paciente se apresenta ao clínico com elevados níveis de PTH associados a concentrações elevadas de $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$, é essencial excluir a presença de doença renal e deficiência em vitamina D antes de diagnosticar HPT. A presença de hipercalcemia, por si só, não é diagnóstica de HPT. A hipercalcemia surge frequentemente associada a alguns tumores sólidos, situação que deve ser também excluída pelo médico. Nestas situações existe normalmente supressão da produção de PHT, que pode ser avaliada através de testes laboratoriais [108].

As técnicas mais utilizadas para a localização de adenomas da paratiroide (a causa mais frequente de HPT) são a ultrassonografia e a cintilografia com $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi) [108]. A ultrassonografia é o primeiro método utilizado para a localização de glândulas anormais, uma vez que é a técnica menos invasiva para o paciente, é suficientemente precisa na deteção de glândulas anormais e apresenta um custo mais acessível [21; 109]. Recentemente, um grupo de investigadores estudou o uso da elastografia como meio de distinção entre adenomas singulares e hiperplasia das glândulas paratiroides. A elastografia é uma técnica, baseada na ultrassonografia, que permite avaliar em tempo real a elasticidade dos tecidos. Este grupo verificou que, no grupo de pacientes avaliados, a elastografia permitiu diferenciar entre as duas lesões com base na elasticidade do tecido, apresentando os adenomas uma elasticidade significativamente menor que as hiperplasias ($P < 0.001$) [110]. A elastografia representa, por isso, uma potencial ajuda ao cirurgião na decisão do tipo de técnica operativa a usar nos pacientes.

A cintilografia com $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ utiliza um radioisótopo do tecnécio ($\text{Tc}^{99\text{m}}$) acoplado ao Metoxi-IsoButil-Isonitrilo (MIBI). O MIBI é rapidamente incorporado nas paratiroides pós injeção intravenosa. Após 2 horas da administração, é esperado que as glândulas normais tenham eliminado todo o complexo das suas células. As mitocôndrias das células oxífilas das glândulas anormais retêm o $\text{Tc}^{99\text{m}}$ -MIBI durante mais tempo, sendo visíveis no exame por raios- γ . Esta técnica mostrou ser altamente sensível na deteção de adenomas (sobretudo na deteção de adenomas oxífilos), o que não se verificou no caso de doença multiglandular (hiperplasia ou adenomas múltiplos)[22; 111].

O único tratamento que se traduz numa cura efetiva do HPT é a cirurgia. Os avanços nas técnicas de imagiologia permitiram que a paratiroidectomia se tornasse menos invasiva, diminuindo por isso a morbilidade associada a esta cirurgia [108].

Nos pacientes com adenoma singular da paratiroide a sua excisão, sem remoção das restantes glândulas, é suficiente para eliminar os sintomas. Por outro lado, quando os pacientes apresentam hiperplasia (doença multiglandular) a opção cirúrgica é a

paratiroidectomia total, com autotransplante imediato de tecido paratiroideu no antebraço [112].

Após paratiroidectomia, todos os pacientes devem ser regularmente monitorizados. Cerca de 10-20% dos pacientes com HPT apresentam sinais de recorrência ou persistência dos sintomas após paratiroidectomia [21]. O diagnóstico de HPT recorrente ou persistente deve ser acompanhado de um alargamento progressivo do tecido paratiroideu, carcinoma paratiroideu, ou o desenvolvimento de um segundo adenoma (condição rara, presente em pacientes com história de irradiação cervical em idade precoce) [21].

Cerca de 2 a 10% de todos os pacientes com HPT revelam falhas no tratamento devido a um diagnóstico inicial incorreto [21]. A distinção entre as três entidades tumorigênicas na paratiroide é ainda hoje feita com base na experiência do cirurgião / patologista, dada a ausência de critérios morfológicos micro ou macroscópicos que permitam a realização de um diagnóstico definitivo dos tumores paratiroideus. Para além disso, apenas 5% dos casos ocorrem no contexto familiar, associados a síndromes hereditárias para as quais é possível determinar a alteração genética responsável, permitindo o tratamento destes doentes, bem como o seu seguimento e dos seus familiares. Cerca de 95% de todos os casos de HPT ocorrem na forma esporádica e para estes casos, ainda não foram encontrados marcadores morfológicos, histológicos ou moleculares com impacto na clínica. Assim, torna-se necessária a pesquisa de alterações genéticas ou fenótipos (expressão proteica) que possam ajudar quer no diagnóstico quer nas decisões terapêuticas para os doentes.

1.7 Objetivos do Trabalho

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

O objetivo geral do presente trabalho é a caracterização de alterações moleculares que possam estar associadas ao desenvolvimento de tumores esporádicos nas glândulas paratiroides. Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho são:

1. Pesquisa de mutações somáticas nos genes *Men1*, *CDC73/HRPT2* e *CDKN1B* numa série de casos de hiperparatiroidismo primário através de PCR e sequenciação direta;
2. Pesquisa de grandes deleções no gene *Men1* por *Multiple Ligation Probe Amplification* (MLPA);

3. Avaliação da expressão das proteínas Menina, Ciclina D1, Parafibromina, p27^{Kip1} e Ki-67 por imunohistoquímica.

2 METODOLOGIA

2.1 Recolha de material biológico

A partir de uma base de dados existente no Hospital São João, referente ao período entre 1999 e 2006, foi efetuada a revisão retrospectiva da casuística de doentes tratados por HPTP no Serviço de Endocrinologia do Hospital São João.

Foi elaborado o desenho do estudo, em colaboração com uma endocrinologista deste hospital. O estudo foi apresentado ao Conselho de Administração e Comissão de Ética do referido hospital tendo sido aprovado pelas referidas entidades em 2007.

Foi autorizada a abertura de um período de consulta, com a denominação específica de “Hiperparatireoidismo Primário”. Amostras de sangue periférico e de tecidos tumorais conservados em parafina foram obtidas no Hospital São João.

2.2 Pesquisa de mutações somáticas nos genes *Men1*, *HRPT2* e *CDKN1B* através de PCR e sequenciação direta

2.2.1 Extração de DNA de leucócitos de sangue periférico

A extração de DNA de leucócitos de sangue periférico foi realizada segundo o procedimento descrito por Miller e colaboradores em 1988 com algumas alterações [113].

Após a recolha da amostra de sangue procede-se à lise dos eritrócitos pela ação de uma solução hipotónica: AKE 1X (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1 mM EDTA, pH 7.4) que provoca a lise dos eritrócitos, mantendo a integridade dos leucócitos. A solução AKE 1X é adicionada à amostra de sangue, atuando por cerca de 1 hora a 4°C. Segue-se uma centrifugação a 2500 rpm durante 20 minutos para separação dos eritrócitos rebentados do precipitado de leucócitos. Após remoção do sobrenadante procede-se a duas lavagens: incubação 5 minutos com AKE1X seguido de centrifugação a 2500 rpm, 20 minutos. Após obtenção do precipitado de leucócitos, promove-se a lise destas células por ação de um detergente: *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 20%. Adiciona-se ainda uma solução de Proteinase K (PK), uma enzima com atividade proteolítica que evita a contaminação do DNA por proteínas. O pH ótimo de atuação da PK é 7,5-12, que é mantido pela adição de SE (75nM NaCl, 25nM EDTA). A mistura resultante é incubada durante a noite a 55°C, temperatura ótima de atuação da PK, com agitação.

Após digestão completa, adiciona-se NaCl aquecido e clorofórmio à solução e deixa-se atuar durante 30 minutos, à temperatura ambiente, com agitação (300rpm). Centrifuga-se de seguida a 2500rpm durante 10 minutos a 4°C. A adição de NaCl tem por objetivo a neutralização das cargas negativas da cadeia de DNA, diminuindo a sua solubilidade em água. O clorofórmio, por outro lado é um solvente orgânico capaz de desnaturar proteínas e de solubilizar componentes indesejáveis como os lípidos. Após centrifugação obtêm-se duas fases distintas separadas por uma camada visível de restos

celulares. Devido à sua densidade ($1,483 \text{ g/cm}^3$), após centrifugação o clorofórmio (bem como os componentes nele dissolvidos) forma a fase inferior (orgânica) da solução. A fase superior (aquosa), que contém o DNA, é removida cuidadosamente para outro recipiente e é-lhe adicionado isopropanol, promovendo a precipitação do DNA. Transfere-se o DNA precipitado para microtubos e procede-se às lavagens com etanol 70% para a remoção de sais e pequenas moléculas orgânicas. Finalmente o DNA é ressuspenso em água desionizada ou em tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0).

2.2.2 Extração de DNA de material Parafinado

Os tecidos removidos cirurgicamente foram fixados em formaldeído e embebidos em parafina, o que possibilita a distinção de áreas de tecido normal e tumoral.

Para a extração de DNA são feitos cortes de $10\mu\text{m}$ e remove-se por dissecção o tecido tumoral, transferindo-o para microtubos. Após dissecção é adicionado xilol a cada amostra, para remover a parafina do tecido. Deixa-se atuar 5 minutos e centrifuga-se a 12000rpm durante 2 minutos à temperatura ambiente e despreza-se o sobrenadante. Lava-se com etanol absoluto, e centrifuga-se novamente, mantendo o precipitado e removendo o sobrenadante. Adiciona-se solução de lise (Puregene), agitando várias vezes e vortexando um pouco. Finalmente adiciona-se PK, homogeneiza-se e deixa-se atuar durante a noite a 55°C com agitação.

Após digestão completa do material biológico pela PK, deixa-se arrefecer os tubos à temperatura ambiente. Adiciona-se solução de precipitação de proteínas (Puregene), e agitam-se as amostras vigorosamente durante cerca de 20 segundos. Colocam-se as amostras em gelo durante pelo menos 5 minutos e procede-se a uma centrifugação a 12000rpm, 0°C durante 3 minutos. Desta forma as proteínas e os restos celulares precipitam no fundo dos microtubo e o DNA permanece em solução. Transfere-se o sobrenadante para o novo tubo *ependorf* e adiciona-se glicogénio e isopropanol, promovendo a precipitação do DNA. A quantidade de DNA resultante da extração de tecidos parafinados é normalmente inferior à quantidade de DNA resultante da extração a partir de sangue periférico. Por isso, é necessária uma centrifugação para sedimentar o DNA precipitado pela ação do glicogénio e do isopropanol: 12000rpm, 15°C , 15minutos. Descarta-se o sobrenadante, e procede-se às lavagens com etanol 70% para remover sais e pequenas moléculas orgânicas. Finalmente o DNA é ressuspenso em água desionizada ou em tampão TE.

2.2.3 Amplificação de DNA: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*)

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis na década de 1980 [114]. Esta técnica, revolucionária da biologia molecular,

permite a amplificação exponencial *in vitro* de sequências de DNA de interesse para estudo posterior. A técnica de PCR baseia-se na capacidade da DNA polimerase de sintetizar novas cadeias de DNA a partir de uma cadeia molde. O volume final de cada reação de PCR neste trabalho é de 25µL: 100ng DNA, 0.24µM de *primer forward*, 0.24µM de *primer reverse*, PCR *buffer* 1X (Promega), 0.2mM dNTPs (desoxinucleótidos) (BIORON), 2.5mM MgCl₂ (Promega), 0,02U/µL *Taq DNA Polymerase* (Promega), e água desionizada para perfazer o volume final. Para cada corrida de PCR efetua-se sempre duas reações de controlo: controlo positivo – a mesma mistura anterior com substituição do DNA da amostra por DNA de uma linha celular previamente testado no laboratório com resultados positivos e reproduzíveis na técnica de PCR; controlo negativo – a mesma mistura anterior, substituindo o DNA da amostra por um volume equivalente de água desionizada. No termociclador (Applied Biosystems), são testadas e aplicadas as condições ótimas para cada reação de PCR: 5 minutos a 94°C (desnaturação inicial do DNA) seguido de 35 ou 40 ciclos (DNA extraído de sangue periférico: 35 ciclos; DNA extraído de parafinas: 40 ciclos): 10 segundos a 94°C, 30 segundos à temperatura ótima de hibridação de cada par de *primers* (**Anexos 1, 2 e 3**), 45 segundos a 72°C. Segue-se um ciclo de 7 minutos a 72°C (extensão final das cadeias de DNA sintetizadas). A avaliação da eficácia da reação de PCR é feita por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v), que separa os produtos de amplificação por peso molecular. Ao gel de agarose é adicionado *Gel Star* (Cambrex) um análogo não carcinogénico do brometo de etídio que se liga ao DNA permitindo a sua visualização com luz Ultra-Violeta (*software* Chemidoc, Applied Biosystems).

2.2.4 Sequenciação Automática

Após amplificação da região de interesse, todas as amostras são submetidas a uma purificação enzimática por Exonuclease e Fosfatase Alcalina durante 20 minutos a 37°C. A enzima exonuclease remove os *primers* residuais bem como pequenos fragmentos de DNA em cadeia simples resultantes da reação de PCR. Por outro lado, a enzima Fosfatase Alcalina inativa os dNTPs em excesso, que podem interferir com a reação de sequenciação do DNA previamente amplificado.

A técnica de sequenciação de DNA foi inicialmente desenvolvida por Frederick Sanger e baseia-se no emparelhamento de ddNTPs (didesoxinucleótidos) às cadeias de DNA amplificado por PCR [115]. Nesta técnica a polimerização de DNA ocorre na presença de dNTPs e ddNTPs, estes últimos são análogos dos dNTPs que não possuem o grupo 3'-OH, e por isso funcionam como terminadores da reação, uma vez que não permitem a formação da ligação fosfodiéster ao nucleótico seguinte na direção 3'. No final da reação formam-se cadeias oligonucleotídicas de tamanho determinado pelo *primer*

utilizado e pelos ddNTPs que promovem a terminação precoce da síntese de DNA. Cada ddNTP está marcado com um fluorocromo diferente dos restantes ddNTPs. Quando os produtos são corridos numa coluna, ficam separados de acordo com o tamanho de cada fragmento prematuramente terminado pela incorporação de ddNTPs. Com um *software* apropriado, os comprimentos de onda de cada fluorocromo dos ddNTPs são “lidos” e representados num eletroferograma de picos de cores diferentes correspondendo à sequência nucleotídica do fragmento de DNA anteriormente amplificado por PCR.

2.3 Pesquisa de grandes deleções no gene *Men1* por *Multiple Ligation Probe Amplification* (MLPA);

A técnica de MLPA é utilizada para o estudo de várias alterações genéticas que provocam variação do número de cópias de DNA, como aneuploidia, deleções ou amplificação de DNA genómico [116]. A reação de MLPA divide-se em 5 etapas principais: desnaturação de DNA, hibridação das sondas de MLPA, reação de ligação, reação de PCR e separação dos produtos de amplificação.

A primeira fase do processo é a desnaturação das cadeias de DNA, por incubação a 98°C durante 5 minutos. Uma vez desnaturado, a temperatura diminui para que se possa adicionar à mistura as sondas de MLPA. Durante cerca de 16 horas esta mistura é incubada a 60°C para que haja hibridação das sondas ao DNA. De seguida adiciona-se a enzima responsável pela ligação das sondas, a Ligase-65. Nos locais em que houve a correta hibridação a enzima vai ligar as sondas, e só nestes locais vai ocorrer a sua amplificação exponencial por reação de PCR. Nos locais do DNA em que se verifica a presença de deleções as sondas não hibridizam e por isso não ocorre amplificação por PCR. A quantidade de produto de ligação amplificada é portanto uma medida do número de cópias de cada região alvo na amostra.

No final da reação de MLPA, os produtos de amplificação são separados por eletroforese capilar usando o *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (Perkin – Elmer) e o *software* GeneMapper® v4.1 que transforma os sinais de fluorescência em eletroferogramas. Os dados obtidos no GeneMapper® são sujeitos a análise através do *software* – *MRC Coffalyser MLPA-DAT* (www.old.mlpa.com/coffalyser). O *kit* de MLPA usado neste trabalho foi o SALSA MLPA KIT P017-B1 MEN1 (MRC Holland, Amsterdam, the Netherlands) e todos os passos descritos anteriormente foram efetuados segundo as instruções fornecidas pelo fabricante. Após o término da reação de MLPA, 1µL do produto final foi misturado com 0.5 µL de LIZ 500 (marcador de peso molecular – Applied Biosystems) e 14.4 µL de formamida desionizada. Como a análise dos resultados do MLPA se baseia em alteração da intensidade de sinais de uma ou mais sondas, foram

usadas como controlo três amostras de referências, como recomendado pelo fabricante, provenientes de dadores de sangue.

O *software Coffalyzer MLPA data analysis* permite determinar o valor dos rácios das sondas ligadas ao DNA entre as amostras de referência e as amostras a analisar, apresentando os valores sob a forma de um quociente: *Dosage Quotient – DQ (Anexo 6)*.

2.4 Avaliação da expressão das proteínas Menina, Ciclina D1, Parafibromina, p27^{Kip1} e Ki-67 por imunohistoquímica

A deteção por imunohistoquímica consiste na ligação de um anticorpo primário não conjugado, ao seu antigénio (proteína em estudo) nas células do tecido. Na técnica usa-se também um anticorpo secundário biotinilado, que se irá ligar ao anticorpo primário. Seguidamente, a adição de um cromogéneo permite a visualização da proteína em estudo. Os cortes de 3µm foram desparafinados e seguidamente hidratados em soluções alcoólicas de concentração decrescente. A recuperação antigénica foi efetuada usando uma solução adequada a cada anticorpo testado, em micro-ondas, durante 15 minutos (*Anexo 4*). Uma vez que o método de deteção tira partido da ação da enzima peroxidase, foi necessário realizar o bloqueio da peroxidase presente nos tecidos (endógena). Para o bloqueio da peroxidase endógena usou-se uma solução de peróxido de hidrogénio a 3% (v/v) em metanol. Para evitar ligações não específicas com imunoglobulinas endógenas foi feito o bloqueio do tecido usando uma solução de bloqueio (*Ultra V Block – Lab Vision Corporation*) durante 10 minutos. Os anticorpos primários diluídos numa solução de diluição (*Large Volume UltrAb Diluent – Lab Vision Corporation*) foram incubados nas secções de tecido durante o tempo adequado, em função do anticorpo (*Anexo 4*). Seguidamente, o anticorpo secundário biotinilado (*Biotinylated Goat Anti-Polivalent – Lab Vision Corporation*) foi incubado com os cortes durante 10 minutos. Após este período de incubação, o complexo streptavidina – peroxidase (*Streptavidin Peroxidase – Lab Vision Corporation*) foi adicionado e deixado a incubar durante 10 minutos. Para finalizar, os cortes foram incubados com a solução de DAB, que consiste no cromogéneo DAB (Diaminobenzidina) diluído no seu diluente (40 µL/mL) (*UltraVision Detection System – Lab Vision Corporation*). Os cortes foram lavados em água corrente, seguindo-se a coloração nuclear com hematoxilina de Mayer, desidratação em soluções alcoólicas de concentração crescente dos cortes e montagem das lâminas. Estas foram observadas ao microscópio e numa ampliação de 400x para a avaliação dos padrões de marcação das células.

A *Tabela 3* sumariza os critérios utilizados na avaliação da expressão das diferentes proteínas por imunohistoquímica.

Tabela 3: Critérios de avaliação da marcação imunohistoquímica das proteínas Menina e Parafibromina

		Fraca	Moderada	Forte			Fraca	Moderada	Forte
		[1]	[2]	[3]			[1]	[2]	[3]
0%	[0]	0	0	0	0%	[0]	Perda de Expressão		
<25%	[1]	1	2	3	<25%	[1]	Expressão Fraca		
x25-50%	[2]	2	4	6	25-50%	[2]	Expressão Moderada		
50-75%	[3]	3	6	9	50-75%	[3]	Expressão Forte		
75-100%	[4]	4	8	12	75-100%	[4]			

2.5 Previsão do efeito biológico das alterações genéticas

A previsão do efeito biológico das alterações genéticas não sinónimas encontradas foi feita através do *software online* Polyphen (www.genetics.bwh.harvard.edu), uma ferramenta automática para a previsão do possível impacto da substituição de um aminoácido na estrutura e função de uma proteína humana. A previsão é feita com base na aplicação de regras empíricas que são aplicadas à sequência, filogenia e informação estrutural da proteína, caracterizando assim a substituição [117]. Os resultados da previsão bioinformática são apresentados na forma de *score*, que pode variar entre 0 e 1. Um *score* de 0 corresponde a uma alteração benigna. Quanto mais próximo de 1 for o *score* obtido para uma dada alteração, maior é a probabilidade de esta ser classificada como patogénica.

A previsão do efeito de alterações *frameshift* foi feita recorrendo ao *software online* ExPasy (www.web.expasy.org/translate/). Esta ferramenta permite determinar as alterações na grelha de leitura da cadeia de DNA, indicando também a posição de codões STOP prematuros, gerados pela mutação [118].

2.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi feita recorrendo ao programa GraphPad Prism 5, Recorrendo aos testes *Mann-Whitney* e qui-quadrado. Um valor de $P < 0.05$ foi considerado significativo.

3 RESULTADOS

3.1 Pacientes

Para a realização do presente estudo foram obtidas lesões de paratiroide de 25 doentes com diagnóstico clínico de hiperparatiroidismo primário esporádico. Em 8 pacientes foi possível obter uma amostra de sangue, para extração de DNA da linhagem germinativa. A **Tabela 4** resume as características dos pacientes estudados neste trabalho.

Tabela 4: Características clínicas dos pacientes estudados

Paciente #	Sexo	Idade	Nº glândulas afetadas	Outras lesões	Diagnóstico
1	Fem.	60	1		Adenoma
2	Mas.	45	3		Suspeito de malignidade
3	Fem.	56	1	PTC metastático	Adenoma
4	Fem.	76	1		Adenoma
5	Mas.	63	4		Suspeito de malignidade
6	Fem.	59	1		Adenoma / Hiperplasia
7	Fem.	58	1		Adenoma
9	Fem.	56	1	Bócio multinodular; tiroidite linfocítica / tiroidite de hashimoto	Hiperplasia
10	Fem.	46	1		Adenoma
11	Fem.	41	3*		Adenoma / Hiperplasia
12	Fem.	54	1		Hiperplasia
13	Mas.	52	3		Adenoma / Hiperplasia
14	Fem.	54	2		Adenoma / Hiperplasia
15	Fem.	87	1		Hiperplasia
16	Fem.	71	1		Adenoma / Hiperplasia
17	Fem.	48	1		Adenoma / Hiperplasia
18	Fem.	53	1		Adenoma / Hiperplasia
19	Fem.	49	1		Adenoma / Hiperplasia
20	Mas.	48	2		Hiperplasia
21	Fem.	56	1		Adenoma / Hiperplasia
22	Mas.	51	1		Adenoma
25	Fem.	57	1		Adenoma / Hiperplasia
26	Fem.	34	1		Hiperplasia
28	Fem.	43	1		Adenoma
29	Fem.	81	1		Adenoma

*Das 3 lesões paratiroideias removidas cirurgicamente, apenas uma foi disponibilizada para o estudo.

3.2 Alterações do gene do supressor tumoral *Men1* e na expressão de *Menina*

O gene *Men1* (OMIM: 131100) foi estudado por PCR e sequenciação direta em toda a sua região codificante (exões 2 – 10) e regiões de *splicing*. No total foram identificadas três alterações (2/24; 8% dos pacientes): uma mutação *missense* no exão 8 [(Ala373Asp), paciente 6], uma *frameshift*, no exão 2 [(c.254_255insT), paciente 22] e a variante sinónima D418D (SNP ID: rs2071313) no exão 9.

A mutação *missense* encontrada consiste numa transversão C→A (GCC→GAC) no codão 373 do gene (posição 1103 da região codificante), que resulta na modificação de um resíduo Alanina (A) para um resíduo Aspartato (D) – Ala373Asp.

A variante Ala373Asp já se encontra descrita na literatura, tendo sido observada num estudo de famílias MEN1 em 2002 [119]. Os indivíduos portadores apresentavam

fenótipo MEN1, com HPTP em conjunto com tumor no pâncreas endócrino e adenoma na pituitária [119]. No decorrer deste estudo não foi possível obter uma amostra de sangue da paciente pelo que não foi possível excluir a presença desta variante na linhagem germinativa. Apesar de a variante Ala373Asp já ser conhecida, não existem estudos funcionais sobre as consequências biológicas desta alteração. Recorrendo ao *software* online *Polyphen* foi feita a previsão do efeito da alteração Ala373Asp e o *score* obtido através desta ferramenta bioinformática foi de 0.993, atribuindo a classificação de “provavelmente patogénica” a esta variante.

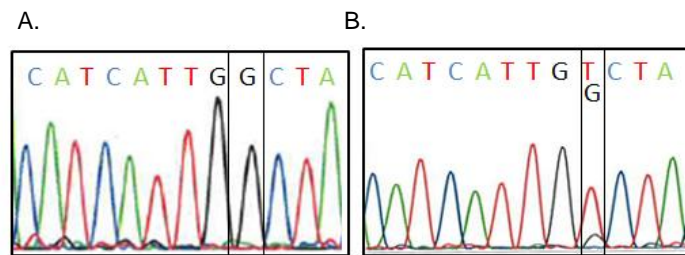
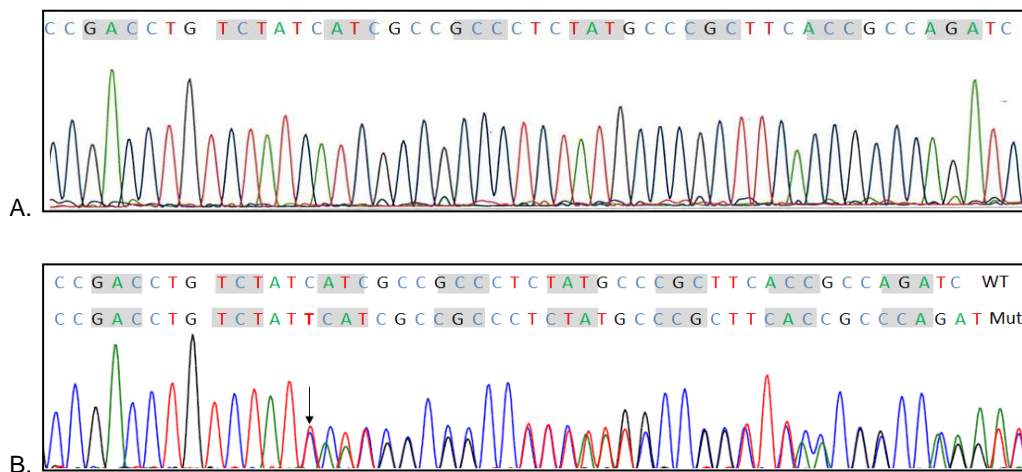


Figura 7: Eletroferograma de sequenciação com o *primer reverse* do exão 8 do gene *Men1*: A: Sequência de referência *Men1*. B: sequência com evidência da variante Ala373Asp (CGG→CTG – Sequência *forward*: GCC→GAC) (paciente 6).

A outra mutação encontrada no gene *Men1* foi a inserção de um T entre os nucleótidos 254 e 255, no exão 2 (c.254_255insT). Uma vez que esta alteração não se encontra descrita na literatura, foi feito o estudo do seu efeito na sequência peptídica recorrendo ao *software* online *ExPASy*. Verificou-se que é provocada uma mudança na grelha de leitura (**Figura 8**), levando à formação de um codão STOP prematuro na posição 116 (TGA). Assim, prevê-se que esta alteração no DNA conduza à formação de uma forma truncada da proteína Menina. Esta mutação não está presente no DNA da linhagem germinativa tratando-se por isso de uma mutação somática.



GAC CTG TCT ATC ATC GCC GCC CTC TAT GCC CGC (...) GAA GGG GGT GTC TCC AGC CGT GAG
 D L S I I A A L Y A R (...) E G G V S S R E
 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 (...) 109 110 111 112 113 114 115 116

GAC CTG TCT ATT CAT CGC CGC CCT CTA TGC CCG (...) AGA AGG GGG TGT CTC CAG CCG TGA
 D L S I H R R P L C P (...) G C P P R P V STOP
 C. 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 (...) 109 110 111 112 113 114 115 116

Figura 8: A: Sequenciação de DNA germinativo, com sequência WT (Exão 2, *Men1*); B: Sequenciação de DNA somático: inserção de um nucleótido T na posição assinalada pela seta; C: Sequência de aminoácidos da proteína WT e mudança na grelha de leitura dando origem a um codão STOP prematuro.

A sequenciação da região codificante do *Men1* permitiu também observar a presença da variante Asp418Asp (rs2071313), já descrita na literatura (**Figura 9**) [58]. Não foi possível detectar esta variante nas lesões de 3 pacientes (pacientes 11, 12 e 20) devido à escassez de material biológico. Assim, dos 22 pacientes analisados verificou-se a seguinte distribuição de frequências genotípicas: CC: 0,33 (7 pacientes), CT: 0,38 (8 pacientes) e TT: 0,29 (6 pacientes). O paciente 7 não foi contabilizado nesta análise, uma vez que o estudo por MLPA da sua lesão mostrou deleção do exão 9, e a ausência de DNA germinativo não permitiu fazer a determinação deste polimorfismo no paciente.

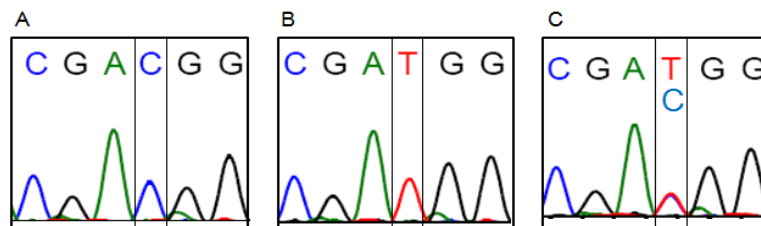


Figura 9: Eletroferogramas de sequenciação mostrando as variações genotípicas para o polimorfismo D418D no exão 9 do gene *Men1*. A: variante homocigótica CC; B: variante homocigótica TT; C: variante heterocigótica TC;

Como já foi referido, a maioria dos tumores da paratiroide apresenta deleções na região 11q [105]. Por essa razão foi efetuado o estudo do gene *Men1* por MLPA nesta série de lesões paratiroideias. Cada lesão paratiroideia foi sujeita a uma análise em triplicado, exceto os casos com escassez de material, os quais foram analisados em duplicado. Esta técnica permitiu identificar 6 pacientes (27%) com perda de material genético em um ou mais exões do gene *Men1* (**Anexo 6**). Comparando os eletroferogramas, é possível verificar a redução da área dos picos nos eletroferogramas do DNA dos doentes relativamente ao DNA de referência (**Figura 10**). Deste estudo foram excluídas as lesões de 3 pacientes, devido à escassez de material biológico (pacientes 12, 21 e 28).

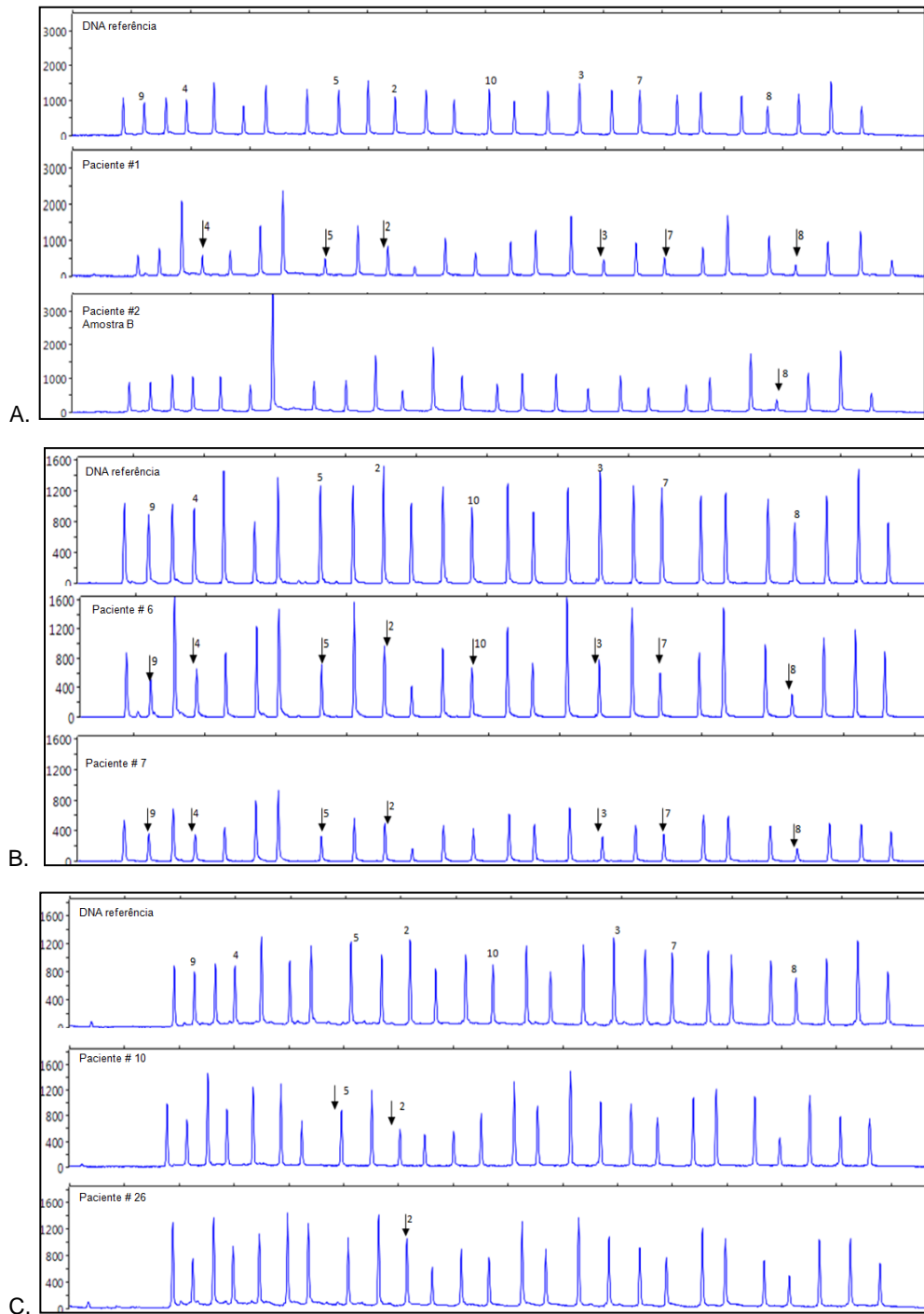


Figura 10: Eletroferogramas de MLPA das lesões que evidenciaram deleção no gene *Men1*. Os números indicam os exões do gene *Men1*, e as setas apontam para as regiões indicadas pela técnica como estando perdidas.

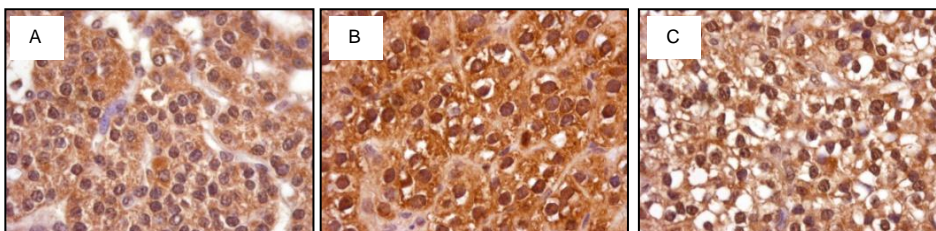
O paciente 1 apresentou deleção contínua do exão 2 até ao exão 8; o paciente 2 apresentou deleção do exão 8 numa das três glândulas analisadas (lesão 2B); o paciente 6 apresentou deleção do intrão 1 e de toda a região codificante do *Men1*; no paciente 7 verificou-se a perda de material genético no intrão 1 e nos exões 2 a 9, inclusive; o paciente 10 apresentou deleção da região 5'UTR bem como do exão 2 e do exão 5. Este

foi o único paciente a evidenciar deleções descontínuas nesta região cromossômica, o que pode indicar que há uma deleção em cada um dos alelos, em regiões diferentes do *Men1*. Finalmente, o paciente 26 mostrou uma deleção do intrão 1 bem como do exão 2. Nas lesões dos pacientes 6 e 7, o padrão hemizigótico do polimorfismo D418D confirma a deleção do exão 9 verificada pela técnica de MLPA em ambos os casos.

Além do estudo genético e da pesquisa de mutações na região codificante do gene, foi também analisada a expressão de Menina nas lesões. Os critérios para a avaliação da marcação imunohistoquímica da Menina nos tecidos estão evidenciados na **Tabela 3**. O controlo positivo utilizado foi paratiroide normal (n=2), com evidência de marcação nuclear forte em mais de 75% das células. A avaliação da marcação imunohistoquímica da Menina foi semi-quantitativa e teve em conta a localização da marcação (nuclear vs citoplasmática), a intensidade da marcação nuclear (fraca / moderada / forte) e a percentagem de células marcadas. Em todos os casos, a marcação imunohistoquímica foi específica, com reatividade nas células paratiroideias e sem marcação do tecido adiposo e conjuntivo ou dos vasos sanguíneos (**Figura 11**).

O estudo por imunohistoquímica permitiu observar diferenças de expressão de Menina entre as lesões e o tecido normal. Dos 31 tecidos avaliados, apenas 4 (13%) apresentaram um *score* igual ou superior a 8, que indica expressão moderada ou forte de Menina em mais de 75% das células, idêntico à paratiroide normal. Em 13 (42%) destes tumores verificou-se expressão moderada de Menina, com um *score* de 4 ou 6. Detetou-se expressão fraca de Menina em 13 (42%) tumores, o que corresponde a um *score* de 1, 2 ou 3. Em um dos casos (3%) observou-se perda total de Menina em todo o tumor, com *score* de 0.

Foi realizado um teste *Mann-Whitney* para avaliar as possíveis diferenças na expressão da proteína Menina entre os casos de doença multiglandular e os casos de doença uniglandular. Verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas na expressão de menina entre os dois tipos de lesão (P=0.7292) (**Figura 11**).



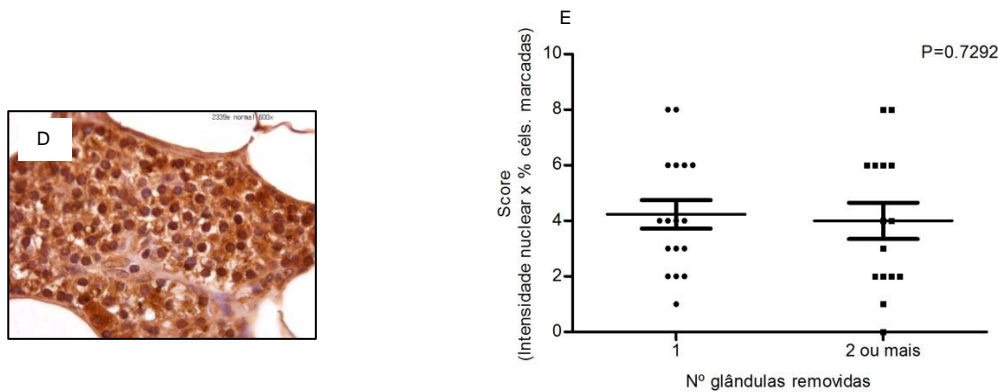


Figura 11: Expressão de Menina em lesões da paratiroide (ampliação: 600x). A: perda de expressão nuclear de Menina no tecido tumoral (paciente 6, score 3); B: tumor paratiroideu com expressão forte de Menina no núcleo (paciente 12, score 8); C: tumor paratiroideu com expressão moderada de Menina no núcleo (paciente 10, score 6); D: Paratiroide normal com marcação forte de Menina no núcleo (controlo positivo); E: comparação da expressão nuclear de Menina entre lesões uniglandulares e multiglandulares (imunohistoquímica).

Apesar de a maioria das lesões apresentarem uma diminuição da expressão de Menina, não se verificaram diferenças significativas entre a expressão desta proteína entre as lesões com deleção do gene *Men1* e aquelas sem deleção, ou cuja análise através do software *Coffalyser MLPA-DAT* apresentou valores de DQ equívocos ($P=0.9566$) (**Figura 12**).

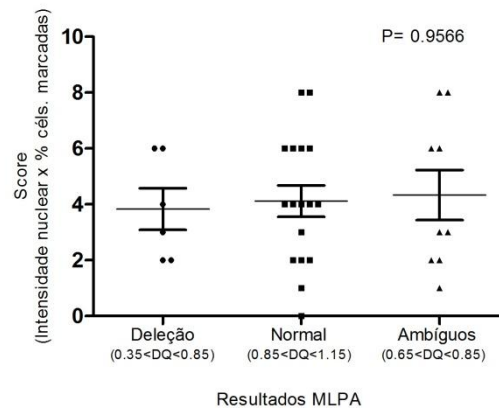


Figura 12: Comparação da expressão nuclear de Menina entre lesões com evidência de deleção no gene *Men1* (identificada pela técnica de MLPA) e lesões em deleção. A categoria “Ambíguos” refere-se a todos os casos que apresentaram um DQ inferior ao normal, mas superior ao valor de DQ a partir do qual o software *Coffalyser MLPA-DAT* considera que existe perda de material genético.

3.3 Ciclina D1

A expressão de Ciclina D1 foi estudada por imunohistoquímica. A avaliação da expressão foi feita pela determinação da percentagem de células tumorais com marcação

nuclear. Em todos os casos, a marcação imunohistoquímica foi específica, com reatividade nuclear nas células paratiroideias e sem marcação do tecido adiposo e conjuntivo ou dos vasos sanguíneos. Tendo em conta o padrão de marcação de paratiroides normais (expressão em menos de 10% das células), considerou-se que os tumores com expressão de Ciclina D1 em mais de 10% das células apresentavam sobre-expressão da proteína. Verificou-se que 10 lesões (29.4%) mostraram sobre-expressão de Ciclina D1. Os restantes tumores analisados (70.6%) apresentaram expressão de Ciclina D1 em menos de 10% das células contabilizadas. Nos pacientes com doença multiglandular (pacientes 2, 5, 13, 14 e 20), a expressão de Ciclina D1 foi concordante entre todas as glândulas do mesmo indivíduo: os pacientes 2 e 5 apresentaram sobre-expressão de Ciclina D1 em todas as glândulas. Os pacientes 13, 14 e 20 apresentaram expressão de Ciclina D1 inferior a 10% de células marcadas em todos os tecidos analisados.

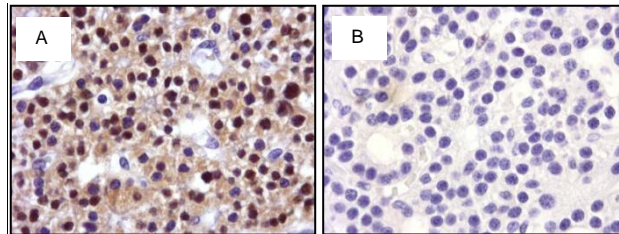


Figura 13: Expressão de Ciclina D1 em lesões da paratiroide (ampliação de 600x). A: caso com sobre-expressão de Ciclina D1 (paciente 15, 81%); B: Caso negativo para a expressão de Ciclina D1.

Tabela 5: Expressão de Ciclina D1 em tumores da paratiroide

Classificação	% Células positivas	Frequência	
		Pacientes	Lesões
Negativo	0% - 10% (1.60±2.54)	20/25 (80%)	24 /34 (70.6%)
Positivo	> 10% (35.19±20.91)	5/25 (20%)	10/34 (29.4%)

Os resultados indicam a média da percentagem de células marcadas entre os tumores ± desvio padrão

Foi realizado um teste *Mann-Whitney* para avaliar as possíveis diferenças na expressão da proteína Ciclina D1 entre os casos de doença multiglandular e os casos de doença uniglandular. Esta análise permitiu verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas na expressão de Ciclina D1 entre os dois tipos de lesão na série estudada ($P=0.4323$) (**Figura 14**).

3.4 Expressão de Parafibromina e pesquisa de mutações no gene *CDC73/HRPT2*

A expressão de Parafibromina, produto do gene supressor tumoral *CDC73/HRPT2* foi estudada por imunohistoquímica. Os critérios para a avaliação da marcação imunohistoquímica da Parafibromina nos tecidos estão evidenciados na **Tabela 3**. O controlo positivo utilizado foi paratiroide normal (n=2), com um padrão de marcação nuclear forte e difuso. Em todos os casos, a marcação imunohistoquímica foi específica, com reatividade nas células paratiroideias e sem marcação do tecido adiposo e conjuntivo ou dos vasos sanguíneos. A avaliação da marcação imunohistoquímica da Parafibromina foi semi-quantitativa e teve em conta a localização da marcação (nuclear vs citoplasmática), a intensidade da marcação nuclear (fraca / moderada / forte) e a percentagem do número de células marcadas. Desta forma verificou-se expressão nuclear fraca de Parafibromina em 7 dos 33 casos avaliados (9.09%) com um *score* de 1, 2 ou 3. Em 13 casos (57.57%) verificou-se expressão nuclear moderada, correspondendo a um *score* de 4 ou 6. Os restantes 11 casos (33.33%) apresentaram expressão normal de parafibromina, idêntica à paratiroide normal, o que corresponde a um *score* de 8, 9 ou 12.

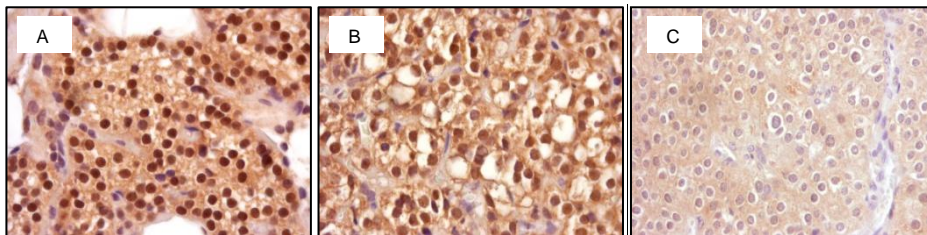


Figura 16: Expressão de Parafibromina em lesões da paratiroide (ampliação de 600x). A: Paratiroide normal (controlo positivo); B: Hiperplasia da paratiroide com expressão moderada de Parafibromina (paciente 5, amostra C, *score* 6); C: Tumor com perda de expressão nuclear de Parafibromina (paciente 18, *score* 1).

A Parafibromina é um supressor tumoral capaz de inibir a transcrição dos proto-oncogenes *Ciclina D1* e *c-myc* (genes alvo da via de sinalização *Wnt*) através do recrutamento da HMT SUV39H1 [122]. Por essa razão, foi investigada a relação entre a expressão de Parafibromina e *Ciclina D1* na série de lesões paratiroideias deste estudo. Apesar disso, não foi observada uma relação significativa entre as expressões de ambas as proteínas (**Figura 17**).

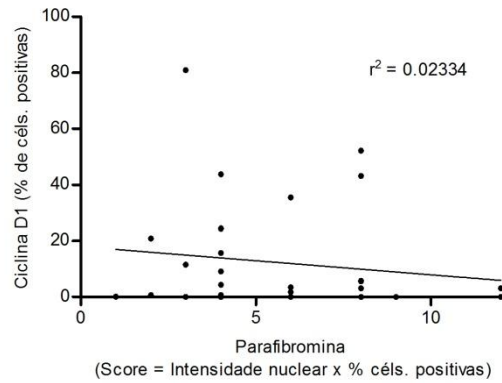


Figura 17: Relação entre a expressão de Parafibromina e Ciclina D1.

Recorrendo ao *software* online COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) determinou-se que, a maioria das mutações somáticas reportadas no gene *CDC73/HRPT2* se localizam nos exões 1 e 2 (**Figura 18**). Pela técnica de PCR e sequenciação direta foi feita a pesquisa de mutações nestes exões nos casos cuja marcação nuclear foi classificada como negativa ou fraca (**Tabela 9**).

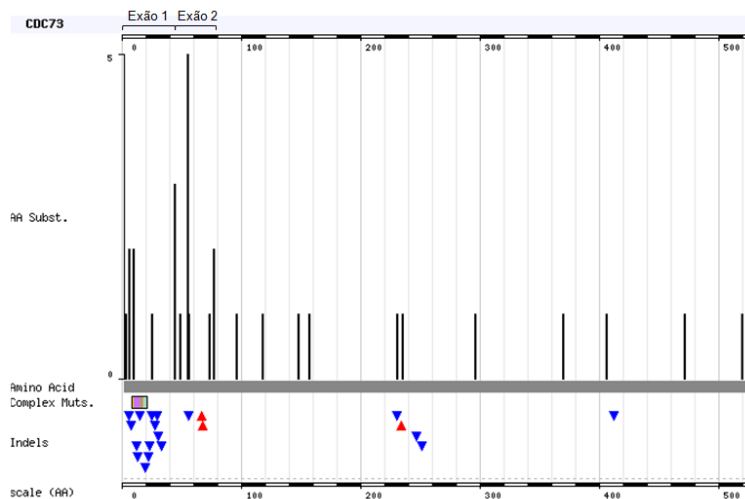


Figura 18: Distribuição de mutações somáticas pela região codificante do gene *CDC73/HRPT2* (adaptado de www.sanger.ac.uk)

Foi encontrada uma mutação *missense*, não descrita na literatura disponível, no exão 2 do *CDC73/HRPT2* na lesão do paciente 18. Esta mutação não está presente no DNA da linhagem germinativa tratando-se por isso de uma mutação somática. A alteração encontrada consiste transversão G→C na posição 230 da região codificante. Esta alteração resulta na troca de um resíduo Arginina (Arg) por um resíduo Prolina (Pro) na posição 76 da cadeia peptídica, (Arg76Pro). Recorrendo ao *software* online *Polyphen* foi feita a previsão do efeito da alteração Arg76Pro. O *score* obtido através desta ferramenta bioinformática foi de 0.993, atribuindo a classificação de “provavelmente

patogênica” a esta variante. O estudo imunohistoquímico revelou que esta lesão paratiroideia apresentava perda de expressão nuclear de parafibromina, tendo-lhe sido atribuído um *score* de 1. No entanto, na análise histológica da lesão não se verificou a presença de características que sugerissem malignidade, como invasão da cápsula, invasão vascular, proliferação elevada (avaliada pela expressão de Ki-67), bandas fibrosas ou padrão de crescimento trabecular.

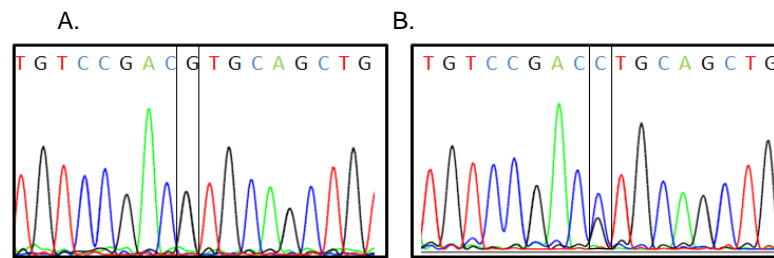


Figura 19: Eletroferograma de sequenciação, Exão 2: A: Sequência de referência *CDC73/HRPT2*. B: R76P (CGT→CCT) (paciente 18).

3.5 Expressão de p27^{kip1} e pesquisa de mutações no gene *CDKN1B*

A região codificante do gene *CDKN1B*, composta por 2 exões, foi estudada por PCR e sequenciação direta. Não foram encontradas mutações em nenhuma das lesões estudadas, no entanto verificou-se a presença de uma variante já descrita na literatura, que resulta da transversão T→G no nucleótido 326 da região codificante do gene *CDKN1B* (**Figura 20**). Esta substituição provoca a troca de um resíduo Valina (Val) por um resíduo Glicina (Gly) na posição 109 da cadeia peptídica, resultando na variante Val109Gly (rs2066827) do inibidor do ciclo celular p27^{kip1}.

Devido à escassez de material biológico este estudo excluiu 4 pacientes (pacientes 11, 12, 13 e 21). Observou-se a seguinte distribuição de frequências genotípicas: TT: 0.48 (10 pacientes), TG: 0.48 (10 pacientes), GG: 0.04 (1 paciente).

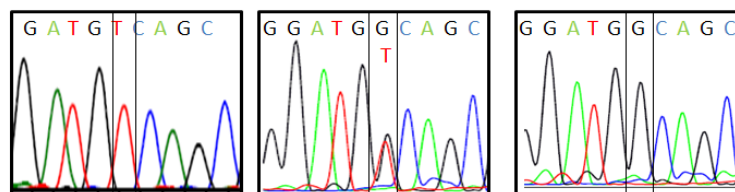


Figura 20: Eletroferogramas de sequenciação mostrando as variações genotípicas encontradas no exão 1 do gene *CDKN1B* (rs2066827).

Para verificar se a distribuição deste polimorfismo se correlacionava com a ocorrência de doença na paratiroide a sua presença também foi analisada numa

população controlo de 102 dadores de sangue. Recorrendo ao *software* GraphPad Prism 5 realizou-se um teste Qui-Quadrado e foi possível observar que as diferenças encontradas entre as duas populações estudadas não são estatisticamente significativas ($P=0.4770$).

Tabela 6: Distribuição genotípica do polimorfismo V109G e frequência dos alelos T e G nas populações de doentes e controlos

	Genótipo			Alelos	
	TT	TG	GG	T	G
Pacientes	10	10	1	30	12
Frequência	0.48	0.48	0.04	0.71	0.29
Controlos	58	35	9	151	53
Frequência	0.57	0.34	0.09	0.74	0.26

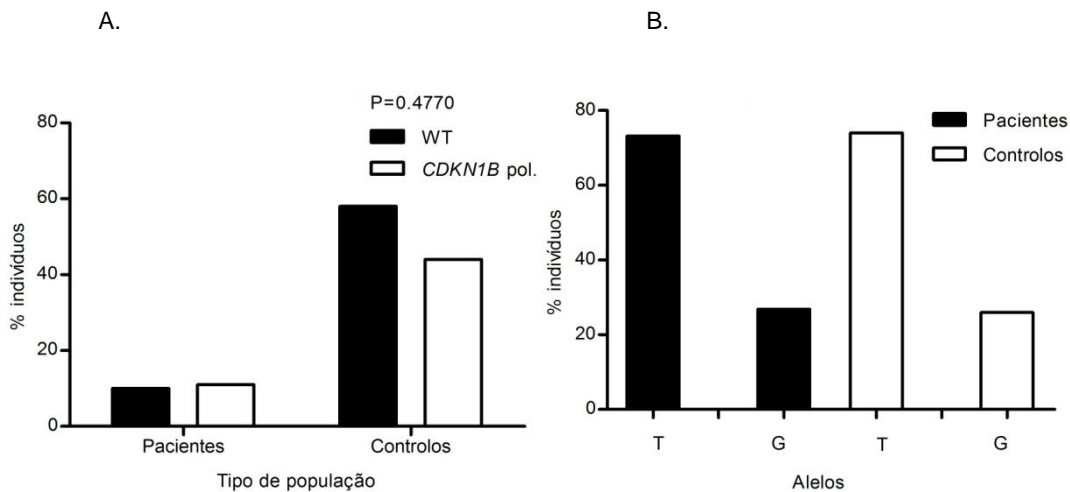


Figura 21: A: Distribuição do polimorfismo V109G (*CDKN1B* pol.) na população de pacientes e na população controlo; B: Frequência dos alelos T e G nas populações de casos e de controlos.

A expressão da proteína codificada pelo gene *CDKN1B*, $p27^{kip1}$, foi estudada por imunohistoquímica. Foi feita uma avaliação quantitativa da expressão nuclear de $p27^{kip1}$. O controlo positivo utilizado foi, à semelhança do que foi feito anteriormente, paratiroide normal ($n=2$), com um padrão de expressão nuclear forte e difuso nas células paratiroideias. Em todos os casos, a marcação imunohistoquímica foi específica, com reatividade nuclear nas células paratiroideias e sem marcação do tecido adiposo e conjuntivo ou dos vasos sanguíneos. Neste estudo verificou-se perda total de expressão nuclear de $p27^{kip1}$ em 5 das 33 lesões estudadas (15%). Nos restantes casos verificou-se expressão nuclear de $p27^{kip1}$, com intensidade variada. 5 lesões (15%) apresentaram menos de 10% de células positivas, com uma média de 4.38% de células marcadas. Nos

restantes 23 casos (70%), verificou-se que a média de células marcadas era de 49.71% variando entre 11.5% e 89.42% de células positivas.

Foi realizado um teste *Mann-Whitney* para avaliar as diferenças na expressão da proteína p27^{kip1} entre os casos de doença multiglandular e os casos de doença uniglandular. Verificou-se que as lesões paratiroideias multiglandulares apresentavam expressão significativamente menor de p27^{kip1} no núcleo do que as lesões singulares (P= 0.0067) (**Figura 22**).

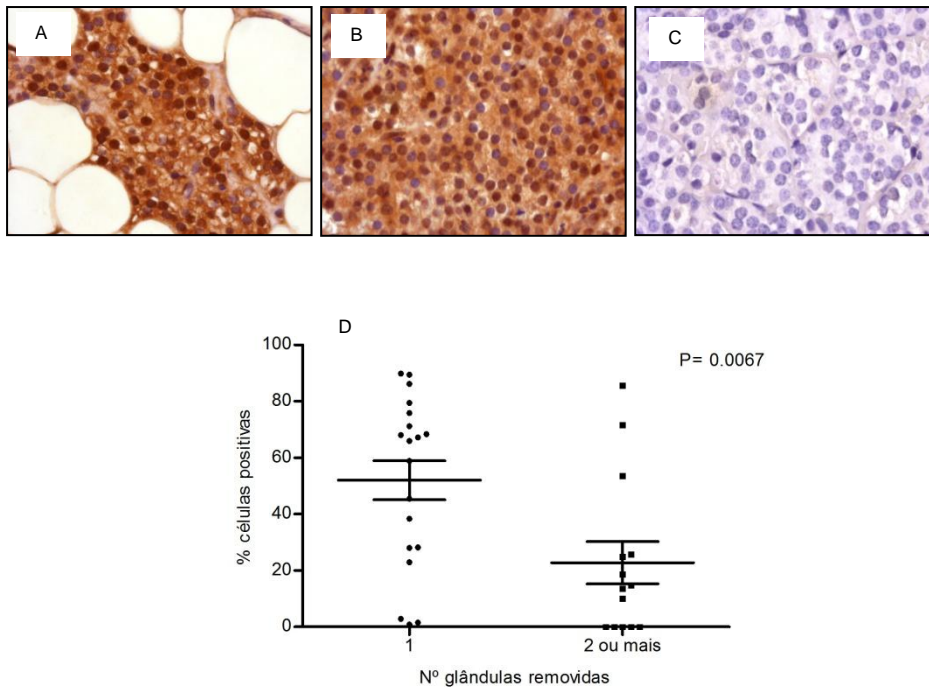


Figura 22: Expressão de p27^{kip1} na paratiroide. A: Paratiroide normal (controlo positivo); B: Adenoma da paratiroide com expressão normal de p27^{kip1}. [paciente12] C: Hiperplasia da paratiroide com expressão negativa de p27^{kip1} [paciente 14]; D: comparação da expressão nuclear de Menina entre lesões uniglandulares e multiglandulares (imunohistoquímica).

A **Tabela 9** sumariza todos os resultados obtidos na série de lesões da paratiroide estudada, com evidência das alterações moleculares observadas.

Tabela 7: Sumário dos resultados obtidos no estudo molecular da série de 25 pacientes com diagnóstico clínico de HPTP

Paciente	Lesão	Diagnóstico	Análise Genética				Expressão de Proteína					
			Men1		HRPT2	CDKN1B	Menina	Ciclina D1	Parafibromina	Ki-67	p27 ^{KIP1}	
			Mutações	MLPA	Mutações	Mutações	score	% céls. pos.	score	% céls. pos.	% céls. pos.	Int.
1		Adenoma	N	Del.: Exões 2 – 8	N	N	4	0	3	0	66.0	+
2	A	Suspeito de malignidade	N	Normal	Nd	N	6	52.17	8	0	0	-
	B		N	Del.: Exão 8	Nd	N	2	24.54	4	0	10	+
	C		N	Ambíguo	Nd	N	3	15.7	4	0	0	-
3		Adenoma	N	Normal	N	N	4	11.5	3	0	45.5	+
4		Adenoma	N	Normal	Nd	N	4	0.68	4	0	28.2	+
5	A	Suspeito de malignidade	N	Ambíguo	Nd	N	1	24.41	4	0.19	6.9	+
	B		N	Ambíguo	Nd	N	6	20.87	2	0	53.9	+
	C		N	Normal	Nd	N	2	35.56	6	0	85.6	+
	D		N	Ambíguo	Nd	N	2	43.76	4	0	71.8	+
6		Adenoma / Hiperplasia	Ala373Asp	Del.: Intrão 1; Exões 2 – 10	Nd	N	3	9.13	4	0	Nd	Nd
7		Adenoma	N	Del.: Intrão 1; Exões 2 – 9	Nd	N	2	3.09	8	0	75.9	++
9		Hiperplasia	N	Ambíguo	Nd	N	2	0	9	0	3.5	+
10		Adenoma	N	Del.: 5'UTR – Exão 2; Exão 5	Nd	N	6	0	4	0	67.2	++
11		Adenoma / Hiperplasia	N	Normal	Nd	N	4	0	6	0	13.6	+
12		Hiperplasia	N	Normal	Nd	N	8	0	12	0	79.4	+++
13	A	Adenoma / Hiperplasia	N	Normal	Nd	N	2	4.34	4	0	11.5	+
	B		N	Ambíguo	Nd	N	8	0	3	0	14.8	+
	C		N	Normal	Nd	N	4	0	4	0	25.8	+
14	A	Adenoma / Hiperplasia	N	Normal	Nd	N	8	0	8	0	0	-
	B		N	Normal	Nd	N	6	0	Nd	0	0	-
15		Hiperplasia	N	Normal	N	N	2	80.97	3	0	13.4	+

Hiperparatiroidismo Primário Esporádico: Estudo de Alterações Moleculares em Tumores Esporádicos da Paratiroide

16		Adenoma / Hiperplasia	N	Normal	N	N	1	0.69	2	0	22.9	+
17		Adenoma / Hiperplasia	N	Ambíguo	Nd	N	3	0	8	0	28.9	+
18		Adenoma / Hiperplasia	N	Normal	R77P	N	3	0.11	1	0	Nd	++
19		Adenoma / Hiperplasia	N	Ambíguo	Nd	N	8	5.77	8	0	86.2	++
20	A	Hiperplasia	N	Normal	Nd	N	0	1.8	6	0	18.7	++
	B		N	Ambíguo	Nd	N	6	0	6	0	0	+++
21		Adenoma / Hiperplasia	N	Normal	Nd	N	Nd	Nd	6	Nd	68.4	++
22		Adenoma	c.254_255 insT	Ambíguo	Nd	N	Nd	3.09	12	0.4	2.8	++
25		Adenoma / Hiperplasia	N	Normal	Nd	N	6	3.49	6	0	71.2	++
26		Hiperplasia	N	Del.:Intrão 1; Exão 2	Nd	N	6	43.2	8	0	38.4	++
28		Adenoma	N	Nd	Nd	N	6	0	12	0	89.4	+
29		Adenoma	N	Normal	Nd	N	4	5.65	8	0	0.90	++

Intensidade da marcação nuclear de p27^{kip1}: Negativa (-), Fraca (+), Moderada (++), Forte (+++); N: Negativo; Nd: Não determinado

4 DISCUSSÃO

4.1 Na paratiroide o gene *Men1* segue o modelo de Knudson para genes supressores tumorais

4.1.1 As mutações no gene *Men1*

Cerca de 30% de todos os casos de HPTP esporádico apresentam uma mutação somática no gene *Men1*, representando a alteração conhecida mais frequente nestes pacientes [85]. No presente trabalho foi feita a pesquisa de mutações neste supressor tumoral por PCR e sequenciação direta em pacientes com diagnóstico clínico de HPTP e aos quais foi removida cirurgicamente uma ou mais glândulas paratiroides. A pesquisa de mutações compreendeu toda a região codificante do gene assim como as regiões de *splicing*. Observaram-se três alterações genéticas: duas mutações, uma das quais não descrita na literatura, e o polimorfismo Asp418Asp (rs2071313).

Uma das alterações observadas consiste numa mutação *missense* que resulta de uma transversão C→A no tripleto 373 da região codificante do gene (GCC→GAC), provocando a substituição de um resíduo Alanina por um resíduo Aspartato – variante Ala373Asp (**Figura 7**). Devido à ausência de amostra de sangue não foi possível excluir a presença desta mutação no DNA constitucional. A mutação Ala373Asp foi descrita por um grupo de investigadores, em 2002, num estudo de famílias MEN1, na linhagem germinativa dos indivíduos afetados. Os pacientes apresentavam HPTP em conjunto com tumor no pâncreas endócrino e adenoma na pituitária [119]. A paciente na qual observámos a alteração tem 59 anos e foi submetida a cirurgia para remoção de um adenoma paratiroideu. Recomenda-se a análise do DNA germinativo visto que a paciente pertence à faixa etária com maior probabilidade de desenvolver fenótipo MEN1 e foi submetida a cirurgia para remoção de um adenoma paratiroideu, característico desta síndrome hereditária [25; 27]. Contudo, não existe uma relação genótipo-fenótipo nos portadores de mutações no *Men1*, e a ausência de história familiar pode indicar que, neste caso, a variante Ala373Asp é somática. Apesar de já ter sido observada antes, não foi feito um estudo funcional que permitisse determinar as consequências biológicas desta alteração genética. Por essa razão fez-se um estudo de previsão do efeito desta variante através do *software* online *Polyphen*. De acordo com esta ferramenta bioinformática a variante Ala373Asp foi classificada como “provavelmente patogénica” (score 0.993), o que significa, com elevado grau de confiança, que a alteração aqui observada é provavelmente prejudicial à estrutura e função da proteína Menina.

A pesquisa de grandes deleções por MLPA na lesão desta paciente mostrou perda de material genético de toda a região codificante e ainda do intrão 1 (**Figura 10B; Anexo 6**). O eletroferograma da sequenciação mostra que a transversão C→A (G→T no eletroferograma de sequenciação com o *primer* para a cadeia *reverse*) se encontra em

heterozigotia (**Figura 7**). No entanto, verifica-se que a intensidade do pico correspondente ao alelo WT (C – G no eletroferograma) é inferior à intensidade do pico do alelo mutado (A – T no eletroferograma). Estes resultados mostram que nesta lesão o gene *Men1* é afetado por uma mutação pontual num dos alelos, acompanhado de LOH a nível somático.

A heterozigotia na lesão pode dever-se a uma contaminação com tecido normal, ou pode refletir heterogeneidade tumoral em que uma pequena percentagem de células do tumor mantém o alelo normal. O estudo por imunohistoquímica desta lesão mostrou uma diminuição acentuada da expressão nuclear de menina (score 3) com uma marcação fraca, numa extensão entre 50% a 75% das células (**Figura 11A**). Sabe-se que a maioria das mutações que afetam o *Men1* são mutações inativantes e segundo o *software Polyphen*, esta variante é provavelmente patogénica. O trabalho de Yaguchi *et al* mostrou que algumas mutações missense e *in frame* funcionam como marcadores da proteína para degradação através da via da ubiquitina-proteassoma: estes autores mostraram que as formas mutadas da menina, mas não a proteína WT, interagem com a ligase da ubiquitina E3, necessária à ligação da ubiquitina a proteína alvo para poli-ubiquitinação e degradação. O mesmo estudo, verificou através de *Northern* e *Western Blot*, que apesar de as mutações *missense* estudadas afetarem a expressão de menina, os níveis de mRNA se mantinham semelhantes ao normal, sugerindo que apesar de patogénicas, as mutações da menina não afetam a transcrição do gene [60]. Os resultados do trabalho de Yaguchi *et al* apoiam os resultados obtidos durante este trabalho na imunohistoquímica da lesão com a variante Ala373Asp. A fraca expressão de Menina numa grande extensão do tecido tumoral pode indicar que, apesar de ser produzida, a expressão de Menina é inibida por mecanismos pós-transcrição ou pós-tradução como, por exemplo, ubiquitinação.

Nesta lesão, a observação de uma mutação pontual acompanhada de perda do alelo normal, e consequente diminuição da expressão da proteína, mostra que na paratiroide o gene *Men1* segue o modelo proposto por Knudson para a inativação de genes supressores tumorais em dois eventos [40].

A ausência de uma relação genótipo – fenótipo nos portadores de mutações no gene *Men1* levou vários grupos de investigação a dedicar-se ao estudo da estabilidade de formas mutadas da proteína Menina. O principal alvo de estudo são as formas alteradas de Menina causadas por mutações *missense* ou deleções / inserções *in frame*, uma vez que é geralmente aceite que as mutações *frameshift*, que conduzem à formação de formas truncadas da proteína ou alteram a sua estrutura primária, são patogénicas para os seus portadores e induzem degradação de DNA por mecanismos de *non-sense*

mediated decay. Apesar de já descrita, a variante Ala373Asp não foi, até à data, estudada quanto ao seu impacto na célula. De acordo com a base de dados UniProt, a região que compreende os resíduos 219-395 é responsável pela associação de Menina ao fator de transcrição FANCD2, uma proteína codificada pelo gene *FANCD2*, mutado em pacientes com a síndrome Anemia de Fanconi, envolvida na reparação do DNA. Os indivíduos afetados por esta patologia apresentam malformações em vários órgãos, assim como predisposição para desenvolver leucemia [123]. A troca de um resíduo Alanina, de natureza hidrofóbica, com uma cadeia lateral composta apenas por um grupo metilo (-CH₃), por um resíduo Aspartato, com cadeia lateral maior, polar e carregada negativamente (composta por um grupo CH₂COO⁻), pode alterar significativamente a estrutura tridimensional desta região da proteína (e por essa razão ser provavelmente patogénica, como indicado pelo *software* de previsão *Polyphen*), e dessa forma condicionar a ligação da proteína Menina a FANCD2. Em 2003 Jin e seus colaboradores sugeriram que a associação física de Menina com FANCD2 pode ser responsável pela cooperação destas duas proteínas na reparação do DNA assim como na manutenção da estabilidade genómica [56].

A outra alteração encontrada é uma mutação *frameshift* que resulta da inserção de uma base timina na posição entre os nucleótidos 254 e 255 da região codificante, no exão 2 do gene *Men1* (c.254_255insT). Esta alteração, presente em heterozigotia, provoca a mudança da grelha de leitura na cadeia de DNA (**Figura 8 A e B**). Segundo o *software online ExPASy*, a inserção de um T nesta posição conduziu à formação de um codão STOP prematuro na posição 116 da cadeia polipeptídica, prevendo-se a produção de uma forma truncada da Menina (**Figura 8C**). O estudo do DNA germinativo deste paciente confirmou que se trata de uma mutação somática (**Figura 8A**). O estudo por MLPA desta lesão não apresentou resultados inequívocos acerca da presença de deleções no gene. Pelo *software Coffalyzer*, verificou-se que apenas os exões 8, 9 e 10 mostraram um DQ normal (**Anexo 6**). Os restantes exões do gene *Men1* (2, 3, 4, 5 e 7 – o *kit* usado para a deteção de grandes deleções no gene *Men1* não possui uma sonda específica para o exão 6) desta lesão apresentaram um DQ “equivoco”, inferior a 0.85. Apenas para valores de DQ entre 0.85 e 1.35 se considera que há manutenção do número de cópias daquela região genética. Apesar do resultado obtido pela técnica de MLPA não ser conclusivo, os resultados parecem indicar uma deleção entre os exões 2 e 7 do gene *Men1*. A confirmação destes resultados poderá ser feita através da análise de marcadores nesta região no DNA germinativo e no DNA do tumor. A análise por imunohistoquímica desta lesão não se revelou informativa devido à pouca representatividade do tecido avaliado em resultado da escassez de material biológico

disponível. Contudo, a verificar-se a perda de material genético entre os exões 2 e 7 do gene *Men1*, estarão presentes os dois eventos necessários para a inativação deste supressor tumoral, seguindo o modelo de Knudson.

4.1.2 A alteração mais frequente nos tumores esporádicos da paratiroide são as grandes deleções do supressor tumoral *Men1*

A descoberta do gene *Men1*, em 1997, respondeu a vários estudos que demonstravam perda da região cromossômica 11q em tumores da paratiroide, assim, como em outros tumores neuroendócrinos. Estes estudos indicavam que a perda frequente desta região neste tipo de neoplasias sugeria a presença de um gene supressor tumoral nessa região cromossômica ainda por identificar [124].

A técnica de MLPA permite fazer uma avaliação semi-quantitativa do número de cópias de uma determinada região genética, através da comparação do DNA em estudo com uma amostra de referência. Esta técnica é uma aplicação da reação de PCR, em que os fragmentos amplificados são proporcionais ao número de sondas ligadas a uma região de interesse. Para cada região existe um par de sondas, que hibridizam com o DNA. Após a hibridação das sondas, ocorre a ligação entre elas, através da enzima Ligase. Essa ligação apenas ocorre se não houver deleção da região onde as sondas hibridam. Numa das sondas existe “uma cauda” de nucleótidos, com um tamanho específico – *stuffer sequence* (diferentes pares de sondas possuem *stuffer sequences* com diferentes tamanhos). À *stuffer sequence* está associada uma sequência de nucleótidos alvo do par de *primers* para a reação de PCR – *PCR primer sequence*. Quando as sondas estão ligadas (isto é, se não houver deleção nessa região do DNA) dá-se a amplificação exponencial das *stuffer sequences* ligadas às sondas, através de uma reação de PCR normal. Como a *PCR primer sequence* é igual em todas as sondas, a reação de PCR necessita de apenas um par de *primers* para amplificar as diferentes *stuffer sequences* associadas às sondas específicas para cada região (neste caso, existe um par de sondas para cada exão do *Men1* – exceto para o exão 6 – e cada um desses pares de sondas possui uma *stuffer sequence* de tamanho diferente associada a uma *PCR primer sequence* comum a todos os pares de sondas). Os produtos da reação são depois submetidos a uma eletroforese capilar, onde são separados de acordo com o seu tamanho. Como cada par de sondas tem uma cauda de tamanho específico, é possível distinguir na eletroforese capilar todos os fragmentos amplificados. Através de um *software* de análise obtém-se um eletroferograma dos fragmentos amplificados, e é possível identificar a que região do DNA corresponde cada banda. No caso do gene *Men1*, o *kit* utilizado para a realização da técnica possui sondas para todos os exões, exceto para o exão 6. Através do tamanho (bp) dos produtos amplificados é possível

reconhecer, no eletroferograma, a banda correspondente a cada exão do *Men1*, cuja área é proporcional à quantidade de produto amplificado, e por isso, é uma medida do número de cópias desse fragmento na amostra. Os resultados desta técnica são semi-quantitativos, uma vez que não é possível determinar o número exato de cópias de cada fragmento. Por essa razão, são sempre introduzidas três amostras de referência (DNA de indivíduos saudáveis, que se sabe não ter alterações na região a estudar). É determinada a média dos valores das amostras de referência e é calculado um rácio entre os valores obtidos na amostra em estudo e os valores da média das amostras de referência. Desta forma, é possível perceber se, relativamente ao normal, a amostra estudada apresenta deleção ou amplificação da região genómica de interesse.

Neste trabalho foi utilizada a técnica de MLPA para a deteção de grandes deleções no gene *Men1*, e verificou-se a sua presença em 6 pacientes (27%) (pacientes 1, 2, 6, 7, 10 e 26). Num trabalho anterior realizado neste grupo de investigação, foram também detetadas grandes deleções no gene *Men1* numa porção significativa de pacientes com adenomas/hiperplasias esporádicas da paratiroide, corroborando assim os resultados deste estudo.

Apesar da presença de grandes deleções nas lesões dos pacientes 1, 2, 7 e 26, a pesquisa de mutações por PCR e sequenciação direta não revelou alterações na região codificante nem nas regiões de *splicing*. Como foi visto anteriormente, na tumorigénese da paratiroide, o gene *Men1* parece obedecer ao modelo de Knudson, sendo necessária a inativação dos dois alelos para haver um efeito danoso na célula. No entanto, a ausência de mutações na região analisada não exclui a presença de alterações em outros locais, como por exemplo na região promotora. Os resultados obtidos por imunohistoquímica nos casos com perda de material genético apoiam essa hipótese. As lesões dos pacientes 2 (lesão 2B) e 7 apresentaram expressão fraca de menina (*score* 2 em ambas as lesões). O paciente 1, com uma deleção que compreende toda a região genómica entre os exões 2 e 8, apresentou expressão moderada de Menina (*score* 4), embora muito inferior à verificada no tecido normal. Em nenhum dos casos foi detetada uma alteração no gene *Men1* por sequenciação, no entanto, a diminuição da expressão da proteína indica que há um silenciamento do alelo normal, que em conjunto com a deleção do outro alelo leva à diminuição significativa da expressão de Menina.

Sabe-se também que um dos mecanismos mais comuns de inativação de genes supressores tumorais é a hipermetilação do seu promotor [38]. Apesar de pouco provável, não se pode excluir a presença de metilação em regiões intrónicas, que afetem a ligação de fatores de transcrição ou outras moléculas. São necessários estudos adicionais que permitam avaliar estas hipóteses. Assim, a análise do estado de metilação

do promotor do *Men1*, por exemplo através de MS-MLPA (*Methylation Specific-MLPA*), bem como a determinação dos níveis de mRNA, através de *Real-Time PCR*, poderão ser bastantes informativos relativamente aos mecanismos subjacentes ao processo tumorigénico nestas lesões.

De todos os casos que apresentaram deleção do *Men1* por MLPA, apenas o paciente 10 mostrou descontinuidade das zonas deletadas, apresentando perda de material no exão 2 e no exão 5. (*Figura 10C, Anexo 6*). O estudo por PCR e sequenciação desta lesão não revelou qualquer alteração na região codificante do *Men1* e o estudo da expressão de menina por imunohistoquímica revelou perda parcial de expressão (*score 6, Tabela 7*).

Pela técnica de MLPA não é possível distinguir se uma deleção descontínua envolve um ou os dois alelos do mesmo gene. Quando é analisado o electroferograma da reação de MLPA, as bandas refletem o número de cópias dos dois alelos do gene em conjunto. Desta é forma, é possível que a perda de material genético, observada nesta lesão, não seja uma deleção descontínua, mas sim a presença de uma deleção no exão 2 de um dos alelos, e a deleção do exão 5 no outro alelo. Se for esse o caso, estão presentes os dois eventos necessários para a inativação do gene supressor tumoral *Men1*. A expressão de Menina nesta lesão avaliada por imunohistoquímica (*score 6*) indica que ela mantém uma expressão moderada da proteína no núcleo, contudo dada a pequena quantidade de tecido disponível para a análise, este resultado pode não ser representativo de toda a lesão.

4.1.3 Expressão diferencial de Menina em lesões da paratiroide

Os resultados do estudo da expressão de Menina nas lesões paratiroideias revelaram que existe uma expressão diferencial desta proteína, não só entre lesões de pacientes diferentes, como também entre lesões do mesmo paciente. Verificou-se que a maioria (87%) das lesões apresentavam uma expressão inferior à expressão na paratiroide normal (*score* inferior a 8), mesmo nos casos em que não foi detetada nenhuma alteração genética ou deleção cromossómica. Estes resultados parecem indicar que a perda de Menina desempenha um papel importante na tumorigénese da paratiroide, uma vez que a expressão desta proteína parece ser inibida na maioria das lesões avaliadas. Estes resultados estão de acordo com o que foi verificado por Theodoropoulo e seus colaboradores, em 2004, numa série de adenomas esporádicos da pituitária. Neste estudo, a maioria os tumores analisados apresentaram diminuição da expressão de menina, e os níveis de expressão desta proteína variavam desde fracos até fortes (idênticos ao tecido normal) [125]. Num outro estudo realizado por Georgitsi e seus colaboradores, verificou-se ausência total de deleções do gene *Men1* através da técnica

de MLPA [126]. Estes resultados sugerem que, na pituitária, existem mecanismos de silenciamento do *Men1*, independentes do número de cópias do gene, atuando possivelmente ao nível da tradução da proteína. Neste trabalho verificou-se que apesar de todas as lesões com deleção do gene *Men1* (identificada por MLPA) apresentarem diminuição da expressão de Menina, esta não está relacionada com o número de cópias do gene, uma vez que não se verificaram diferenças significativas entre as lesões com e sem deleção. Desta forma, os resultados obtidos parecem sugerir que, talvez de uma forma idêntica ao que acontece na pituitária, os mecanismos de silenciamento do gene *Men1* na paratiroide atuem sobretudo ao nível da tradução da proteína.

Os adenomas da pituitária, em conjunto com adenomas da paratiroide e os tumores do pâncreas endócrino, formam a manifestação mais comum da síndrome hereditária MEN1 [43]. Sabe-se que as alterações germinativas no gene *Men1* estão na base da patologia, no entanto os mecanismos envolvidos na tumorigénese ainda são desconhecidos. É possível, portanto, que a expressão diferencial de menina em tumores esporádicos da paratiroide, semelhante ao que acontece nos tumores esporádicos da pituitária, seja o reflexo de um mecanismo comum à tumorigénese destas duas glândulas.

Contudo, um estudo recente com ratinhos heterozigóticos para o alelo WT do gene *Men1*, mostra que nos animais com mutação a proliferação das células do pâncreas endócrino é cerca de duas vezes superior aos ratinhos normais usados como controlo. Além disso, o mesmo estudo mostrou que os ratinhos heterozigóticos apresentavam alteração na expressão de genes associados à manutenção da estabilidade da cromatina, apoptose e ainda alguns fatores de crescimento. Com este trabalho, os autores defendem que, no pâncreas endócrino o gene *Men1* se comporta como um supressor tumoral haploinsuficiente [127].

Os resultados obtidos neste trabalho não são conclusivos quanto ao papel da haploinsuficiência na paratiroide. Contudo, dado que a Menina é uma proteína *scaffold*, a variedade dos seus parceiros de interação pode condicionar o seu modo de atuação de forma diferente em diferentes tipos de células. A ação oncogénica das proteínas de fusão MLL nas leucemias é dependente da interação Menina-MLL, conferindo à menina um papel na promoção da oncogénese, ao contrário do que acontece nos órgãos endócrinos, onde se verifica que esta proteína possui ação de supressão tumoral. Em 2008, Paris *et al* demonstraram também um papel oncogénico em tumores da próstata [128]. Talvez a necessidade de inativar ambos os alelos do *Men1* para que haja um efeito na célula seja dependente do microambiente, e dos diferentes parceiros de interação da menina num contexto celular específico. Apesar da diversidade de parceiros de ação da Menina,

pouco se sabe acerca dos mecanismos de regulação da transcrição do gene *Men1*. Um estudo recente demonstrou que, no fígado de ratinhos, a expressão de Menina é negativamente regulada pela insulina, e que a proteína Akt desempenha um papel fundamental na regulação da expressão e localização da Menina [129].

O estudo dos parceiros de ação da Menina pode revelar fatores importantes na regulação da transcrição do gene *Men1*, e que possam esclarecer, pelo menos em parte, as diferentes ações da Menina em contextos celulares específicos.

4.2 A proteína Ciclina D1 encontra-se frequentemente sobre-expressa nos tumores da paratiroide, apesar do seu baixo índice de proliferação

A descoberta do rearranjo inv11(p15;q13), que coloca o gene da Ciclina D1 sob a influência do promotor do gene PTH, abriu um novo caminho no estudo dos processos moleculares envolvidos na tumorigénese paratiroideia [87]. Apesar de o rearranjo se observar apenas numa pequena percentagem de casos – cerca de 5% de todos os adenomas – o aumento da expressão de Ciclina D1 representa um possível mecanismo associado à tumorigénese paratiroideia, dado que vários estudos observam sobre-expressão de Ciclina D1 em cerca de 30% dos casos [107].

Neste trabalho foi possível observar que 29.4% dos tecidos avaliados (correspondendo a 20% dos pacientes) apresentavam sobre-expressão de Ciclina D1, com uma média de 35.19% de células positivas. Nos casos de doença multiglandular, observou-se que a expressão desta proteína era idêntica nos diferentes tecidos provenientes do mesmo paciente. Apesar disso, não se verificaram diferenças estatísticas na expressão de Ciclina D1 entre lesões uniglandulares e multiglandulares (P=0.2419), pelo que se conclui que este não é um bom marcador para a distinção entre adenoma e hiperplasia da paratiroide. Contudo, os resultados obtidos acerca da expressão de Ciclina D1 nesta série de tumores são concordantes com o que está descrito na literatura [107; 130].

Alguns estudos têm mostrado uma relação inversa entre a expressão de Menina e de Ciclina D1 [120; 131]. Dado que as alterações moleculares mais frequentes em tumores da paratiroide são a inativação do supressor tumoral *Men1* e a sobre-expressão de Ciclina D1, foi avaliada uma possível associação entre estas duas proteínas. No entanto, nos tumores estudados, não foi encontrada correlação entre a expressão de Ciclina D1 e a expressão de Menina (**Figura 15**). Para além disso nenhum dos pacientes com mutação no gene *Men1* apresentou sobre-expressão de Ciclina D1.

Em um dos casos (paciente 15) verificou-se que a expressão de Ciclina D1 era de 80.97%, sendo este o caso com maior expressão de Ciclina D1. Dado o papel da Ciclina D1 na progressão do ciclo celular, decidiu-se estudar a proliferação dos tumores

paratiroideus. Para isso fez-se um estudo por imunohistoquímica para o marcador de proliferação celular Ki-67. Este marcador tem sido usado para a determinação da fração proliferativa em tumores paratiroideus, observando-se diferenças significativas entre tumores benignos e malignos [82]. O Ki-67 é uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G₀, o que o torna um bom indicador das células em divisão. Apesar da elevada expressão de Ciclina D1 em quase 30% dos tecidos, não foi detetada expressão de Ki-67 em nenhum dos tumores avaliados. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Stojadinovic *et al* que observou sobre-expressão deste marcador em apenas 1 de 41 (2%) adenomas paratiroideus [82].

A Ciclina D1 é um importante interveniente na progressão do ciclo celular: a formação de complexos Ciclina D1 com CDK com CDK4/6 ativa estas cinases, promovendo a fosforilação e inativação do supressor tumoral Rb. A sua inibição permite a libertação do fator de transcrição E2F, responsável pela transcrição de genes chave para a entrada da célula na fase S do ciclo celular [88]. Até à data este é o mecanismo mais aceite pela comunidade científica para o papel oncogénico da Ciclina D1. No entanto, a falta de correlação da expressão de Ciclina D1 com o marcador de proliferação Ki-67 em várias neoplasias como carcinoma de mama, adenoma da paratiroide, linfoma de células do manto e leucemia tem sido reportada em vários estudos [132]. Neste trabalho a falta de correlação da expressão destas duas proteínas sugere que, na paratiroide, a Ciclina D1 atua através de outros mecanismos para além da ativação direta do ciclo celular. Em 2007, um grupo de investigação mostrou, pela primeira vez, que a ação oncogénica da Ciclina D1, assim como a sua sobre-expressão, pode estar associada a um aumento da instabilidade genómica. A acumulação nuclear de complexos Ciclina D1-CDK promove a acumulação e estabilização da helicase MCM, essencial à replicação do DNA, o que conduz a um aumento da síntese de DNA na célula. Segundo os autores, a ativação continua desta enzima conduz a um aumento da instabilidade genómica, tornando as células aneuploides [133]. Contudo, a ausência de linhas celulares estabelecidas de paratiroide é ainda um obstáculo à realização de estudos que permitam abordar esta questão nestas glândulas.

No processo de tumorigénese da paratiroide, a associação entre a proliferação celular e a capacidade secretora das células não é completamente compreendida. Sabe-se que em situações transientes de hipocalcemia as glândulas normais aumentam a produção de PTH, a par com o aumento da massa celular. Por outro lado, o aumento da PTH induz a produção de 1,25(OH)₂D₃ que, uma vez reconhecido pelas células paratiroideias, inibe a síntese de PTH assim, como a sua proliferação [18]. A proliferação anormal das células paratiroideias está, portanto, intimamente associada à desregulação

da sua capacidade secretora [130]. O estudo de Imanishi *et al* mostrou, através da geração de ratinhos transgênicos com o rearranjo inv11(p15;q13) que a capacidade secretora das células paratiroideias era mantida, apesar do rearranjo, assim como a regulação do $\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}$, e que os animais transgênicos apresentavam níveis mais elevados de PTH do que os ratinhos WT. O mesmo estudo mostrou que os níveis de CaSR na paratiroide eram inferiores nos ratinhos transgênicos, e que eram comparáveis à expressão deste receptor em pacientes com HPTP severo ou em pacientes urêmicos [89]. Assim, este estudo chamou a atenção para uma possível associação entre as vias de proliferação e a atividade endócrina das glândulas paratiroides. Desta forma, e tendo em conta os resultados obtidos quanto à expressão de Ciclina D1 nos tumores avaliados neste trabalho, seria interessante avaliar a expressão de PTH, através da medição dos níveis de mRNA, uma vez que a ausência de linhas celulares de paratiroide é um obstáculo à realização de estudos funcionais que permitam abordar esta questão.

4.3 A diminuição da expressão nuclear de Parafibromina é um indicador para a pesquisa de mutações no supressor tumoral *CDC73/HRPT2*

De todas as causas de HPTP, o carcinoma da paratiroide é a menos frequente, representando cerca de 1% de todos os casos [26]. Contudo, em algumas populações, como em Itália e no Japão, esta percentagem pode atingir os 5% [134]. As mutações germinativas no gene *CDC73/HRPT2* são responsáveis pelo desenvolvimento da síndrome HPT-JT, cujos pacientes apresentam um risco elevado de desenvolverem carcinoma da paratiroide [61]. A Parafibromina, proteína codificada por este gene, tem 531 a.a, é um componente do complexo Paf1 e associa-se com proteínas envolvidas na proliferação celular, regulação da transcrição e modificação de histonas [67].

Um dos assuntos mais controversos no diagnóstico diferencial da neoplasia da paratiroide é o uso da expressão nuclear de Parafibromina como indicador de malignidade. Por esse motivo foi efetuado um estudo imunohistoquímico desta proteína na série de lesões de paratiroide, uma vez que o diagnóstico dos pacientes se baseou na sua história clínica e familiar e nos achados histopatológicos após remoção das glândulas afetadas. Verificou-se diminuição da expressão nuclear de parafibromina em 7 dos 33 tecidos estudados (21.21%), aos quais foi atribuído um *score* de 1, 2 ou 3 na avaliação imunohistoquímica. A avaliação histológica destas lesões permitiu verificar a presença de bandas fibrosas nos pacientes 3 e 5 (com *score* 3 e 2, respetivamente). A glândula afetada do paciente 5 (lesão B) apresentava invasão da cápsula, embora sem invasão vascular e os tumores dos pacientes 16 e 18 (*score* 2 e 1, respetivamente) foram avaliados como neoplasias benignas da paratiroide, sem características histopatológicas que evidenciassem malignidade [35; 135].

As alterações genéticas no supressor tumoral *CDC73/HRPT2* são observadas em cerca de 1% dos tumores benignos da paratiroide, pelo que foi feita a pesquisa de mutações neste gene apenas nos casos que apresentaram expressão fraca ou negativa de Parafibromina [64; 136]. Este supressor tumoral não possui *hot-spots* mutacionais, no entanto, dado que tem sido verificada uma maior frequência de alterações nos exões 1 e 2, neste trabalho, a análise genética centrou-se nesta região. Em um dos 7 casos analisados (paciente 18) foi detetada uma mutação *missense* no exão 2 do *CDC73/HRPT2*. A alteração observada consiste numa transversão C→G na posição 230 da região codificante, dando origem a uma substituição no codão 76 do *CDC73/HRPT2* de um resíduo Arginina (Arg) por um resíduo Prolina (Pro) (Arg76Pro). A análise do DNA germinativo permitiu verificar que se trata de uma mutação somática (**Figura 19**). Esta alteração não se encontra descrita na literatura, pelo que a previsão do seu efeito biológico foi feita através do *software* online *Polyphen*. O *score* obtido por esta ferramenta bioinformática foi de 0.993, atribuindo a classificação de “provavelmente patogénica” à variante R76P. O estudo imunohistoquímico deste caso permitiu observar perda de expressão nuclear na quase totalidade do tumor, tendo-lhe sido atribuído o *score* de 1, o menor *score* de toda a série de lesões avaliadas. (**Figura 16C**).

Em 2007 Juhlin *et al*, num estudo que pretendia verificar a sensibilidade da marcação imunohistoquímica da parafibromina como marcador no diagnóstico diferencial entre carcinomas e tumores benignos da paratiroide, verificaram que apesar de a probabilidade de um adenoma ser corretamente identificado pela imunohistoquímica da parafibromina, i.e., valor preditivo negativo, ser elevado, não é 100%, uma vez alguns adenomas apresentam diminuição da expressão de parafibromina [91; 93; 137]. Por outro lado, o mesmo estudo também verificou que no grupo de tumores com perda parcial ou total de imunoreatividade da parafibromina, a probabilidade de um carcinoma ser corretamente identificado como tal, exclusivamente através de imunohistoquímica, é baixa e não é, por si só, diagnóstico de carcinoma da paratiroide. Segundo os autores, a perda parcial ou total de marcação imunohistoquímica de parafibromina deve ser um indicador para a pesquisa de mutações do supressor tumoral *CDC73/HRPT2*. De facto, em todos os tumores que no estudo de Juhlin *et al* se verificaram mutações neste gene também se observou perda total de expressão da proteína [93]. No estudo de Juhlin *et al*, um dos casos estudados foi inicialmente diagnosticado como adenoma, pela ausência de características histopatológicas que indicassem malignidade. No entanto, verificou-se recorrência da doença 4 anos após paratiroidectomia, e através imunohistoquímica verificou-se ausência de expressão de parafibromina, estabelecendo diagnóstico de carcinoma, apesar de não se terem verificado mutações no gene. No presente trabalho, a

lesão do paciente 18 também foi diagnosticada como adenoma, dada a ausência de características histopatológicas que indicassem malignidade. A mesma lesão apresentou perda de expressão nuclear de parafibromina, tendo-lhe sido atribuído um *score* de 1 no estudo imunohistoquímico (que corresponde a marcação fraca em menos de 25% das células). A análise genética deste tumor permitiu identificar uma mutação somática, não sinónima, no supressor tumoral *CDC73/HRPT2*. Os resultados obtidos neste trabalho, bem como no estudo de Juhlin, levantam uma questão importante: Poderão os tumores diagnosticados como adenomas, que evidenciam perda de expressão Parafibromina, ter um curso mais agressivo da doença? A ausência de mutações nos restantes 6 casos com expressão fraca de parafibromina pode dever-se ao facto de apenas se ter estudado os exões 1 e 2 do gene, nos quais se verifica a maior frequência de mutações descritas na literatura. Dois desses casos (pacientes 3 e 5) apresentavam bandas fibrosas, e desses um (paciente 5) apresentava invasão da cápsula, características que podem ser indicadores de um comportamento atípico. Desta forma, deve ser efetuada a pesquisa de mutações em toda a região codificante do *CDC73/HRPT2* em ambas as lesões. No entanto, a ausência de mutações não deve ser diagnóstica de adenoma, uma vez que outros mecanismos podem estar envolvidos no silenciamento da Parafibromina, nomeadamente, modificações pós-transcricionais, como sugerido pelo estudo de Juhlin *et al*, no qual este autor verificou que, em adenomas atípicos da paratiroide com perda de expressão da proteína por imunohistoquímica, não se observaram mutações na região codificante do gene, assim como não se observou diminuição dos níveis de mRNA, sugerindo que o silenciamento da parafibromina, nesses casos, ocorre a nível pós-transcricional [91]. Contudo, deve ter-se em conta que todos os casos foram diagnosticados como adenoma/hiperplasia esporádica da paratiroide, e que a taxa de mutações no *CDC73/HRPT2* nestes casos é muito baixa.

A observação de LOH na região 1q25 em tumores associados à síndrome HPT-JT indica que o *CDC73/HRPT2* segue o modelo de inativação bialélica de Knudson [64]. Por esta razão, a ausência da mutação no DNA germinativo do paciente não pode excluir a presença de uma alteração germinativa em outra zona da região codificante, alterações no promotor, LOH (não detetável por sequenciação) ou ainda mecanismos de silenciamento pós-transcrição, como sugerido pelo estudo de Juhlin em 2006 [91]. Apesar do elevado número de mutações conhecidas em genes associados ao desenvolvimento de HPTP esporádico, tal como o *CDC73/HRPT2*, o seu significado no prognóstico dos doentes é ainda desconhecido. Tendo em conta os achados histopatológicos, genéticos e imunohistoquímicos das lesões estudadas, é aconselhável o seguimento clínico dos pacientes nos quais se verificou uma diminuição acentuada da expressão de

parafibromina, sobretudo dos pacientes 3 e 5, cujas lesões apresentavam um padrão histopatológico atípico, e do paciente 18 que, apesar de não apresentar características morfológicas atípicas, é portador de uma mutação somática no supressor tumoral CDC73/HRPT2, uma vez que não se conhecem ainda as implicações clínicas de tais alterações genéticas. Para além disso, também é aconselhável a pesquisa de mutações germinativas e somáticas em toda a região codificante deste gene no paciente 18.

Vários estudos indicam que o índice de proliferação dos carcinomas da paratiroide é superior ao dos tumores benignos, sendo geralmente superior a 4% [35]. Neste trabalho o estudo do marcador Ki-67 por imunohistoquímica revelou positividade nas lesões dos pacientes 5 (amostra A) e 22, as quais, no estudo da expressão nuclear da Parafibromina, obtiveram *scores* atribuídos de 4 e 12, respetivamente. Estes resultados são concordantes com o que está descrito na literatura em tumores benignos da paratiroide [91]. Nos restantes tecidos avaliados ($n_{total}=33$), verificou-se que a expressão de Parafibromina era moderada (*score* 4 ou 6; $n=13$) ou forte, idêntica à paratiroide normal (*score* 8, 9 ou 12; $n=11$).

Em 2007 e 2008 dois trabalhos independentes mostraram, através de estudos *in vitro*, o papel da Parafibromina como supressor tumoral. A sua sobre-expressão mostrou ser suficiente para inibir a proliferação de células transformadas NIH3T3 e HEK293 e a progressão do ciclo celular em células HeLa mantendo-as em G₁, com diminuição da expressão de Ciclina D1 [68; 138]. Por outro lado, um estudo de Iwata *et al* também mostrou que a Parafibromina é capaz de estimular a proliferação e crescimento celular nas linhas celulares 293FT e COS7 com expressão do antígeno SV40, indicando que na presença deste antígeno, a Parafibromina tem um comportamento oncogénico [138]. Em 2011, Takahashi e colaboradores mostraram que o papel antiproliferativo da Parafibromina era dependente da ação da tirosina fosfatase SHP2. Uma vez desfosforilada por SHP2 a Parafibromina forma um complexo nuclear estável com a proteína β -Catenina, permitindo a ativação da transcrição de genes alvo da via de sinalização *Wnt* (Ciclina D1, c-Myc), promovendo o crescimento e proliferação celular [139]. A imunohistoquímica dos casos estudados neste trabalho verificou que das 7 lesões paratiroideias com diminuição da expressão nuclear de Parafibromina, 3 apresentaram sobre-expressão de Ciclina D1 (11.5% - 80.97%). Apesar disso, a análise estatística revelou que não existe correlação entre estas duas proteínas na série estudada (**Figura 17**), como já havia sido observado em estudos anteriores [91; 140]. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que, nas lesões estudadas, a expressão de Ciclina D1 não é dependente da Parafibromina.

4.4 p27^{kip1}: o primeiro passo para a distinção entre adenoma e hiperplasia?

Em 2006, o trabalho de Pellegata e seus colaboradores iniciou um novo caminho no estudo dos tumores neuroendócrinos, ao verificar que uma colônia de ratinhos desenvolvera, espontaneamente, uma síndrome cujo espectro tumoral era transversal às síndromes MEN1 e MEN2a, à qual deram o nome de MENX. Os estudos subsequentes deste grupo de investigação revelaram que o locus associado à patologia dos animais era o cromossoma 4, e identificaram o gene *Cdkn1b* como responsável pela doença [74]. Posteriormente, os trabalhos de Pellegata, Georgitsi e Costa-Guda mostraram que o análogo humano, *CDKN1B*, se encontrava mutado em pacientes com fenótipo MEN1, nos quais não foi observada mutação do gene *Men1* [74; 77; 78].

O gene *CDKN1B* é um inibidor do ciclo celular, e codifica o CDKI p27^{kip1}, uma proteína com 198 a.a, ubiquamente expressa, nuclear e citoplasmática, com funções diferentes, dependentes da sua sub-localização celular [75].

Após a descoberta de Pellegata *et al*, vários grupos de investigação têm procurado mutações neste gene em pacientes com fenótipo MEN4, tendo sido identificados, até à data, 7 indivíduos portadores de mutações no *CDKN1B*, todas inativas, demonstrando assim o papel de supressor tumoral deste gene. Em 2011 Costa-Guda e seus colaboradores estudaram uma série de adenomas esporádicos da paratiroide, tendo observado três mutações germinativas em três pacientes diferentes e uma mutação somática acompanhada de LOH noutro paciente [77].

Neste trabalho não foram encontradas mutações em toda a região codificante do gene *CDKN1B*. No estudo de Ozawa *et al*, em 2007, foi observada apenas uma mutação germinativa numa série de 34 pacientes com uma variante esporádica da síndrome MEN1, apresentando tumores na glândula pituitária e na paratiroide. No estudo de Costa-Guda *et al* foram observadas 4 mutações (três germinativas e uma somática) numa série de 86 adenomas esporádicos da paratiroide (4.6%) [77]. Para além disso, num estudo anterior, realizado no nosso grupo de investigação, não se verificaram mutações germinativas ou somáticas numa série de 24 adenomas esporádicos da paratiroide. Em conjunto, estes resultados sugerem que a contribuição das alterações genéticas no gene *CDKN1B* é infrequente nos tumores esporádicos da paratiroide.

Até à data estão identificados 157 polimorfismos na região codificante do gene *CDKN1B* (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). Neste trabalho, a análise da região codificante permitiu observar a presença do polimorfismo já descrito na literatura V109G (rs2066827). A associação deste polimorfismo com diversas neoplasias levou a que neste trabalho se procedesse ao estudo da sua distribuição nos pacientes e comparação dos resultados com a população normal. A distribuição dos genótipos TT (0.48), TG

(0.48) e GG (0.04) é semelhante à distribuição nos 102 indivíduos normais usados como grupo controlo (TT: 0.57; TG: 0.34; GG: 0.09; P=0.4770) assim como na população europeia (TT: 0.566; TG: 0.425; GG: 0.09) (www.hapmap.org). Além disso, a frequência dos alelos T e G neste grupo de pacientes também foi semelhante à determinada no grupo controlo (pacientes: T:0.71, G:0.29; controlos: T:0.74, G:0.26), assim como na população europeia (T:0.78, G:0.22) (www.hapmap.org). Estes resultados indicam que, na paratiroide, a presença da variante V109G não representa um fator de risco para o desenvolvimento de neoplasia.

Apesar de as alterações genéticas no gene *CDKN1B* não serem frequentes na tumorigénese neuroendócrina, vários estudos têm verificado que a perda de expressão de p27^{kip1} é relativamente comum nestes tumores, no entanto com níveis de mRNA semelhantes aos normais, sugerindo que a regulação deste supressor tumoral ocorre principalmente após a transcrição e/ou tradução [141; 142]. Por essa razão, estudou-se a expressão deste inibidor do ciclo celular por imunohistoquímica na série de lesões deste trabalho. Verificou-se que 5 dos 33 (15%) casos avaliados perderam completamente a expressão de p27^{kip1}. Dos restantes, 5 casos (15%) apresentaram positividade nuclear em 10% das células, ou menos, com uma média de 4.38% de células marcadas. Os restantes 23 casos (70%) apresentaram marcação nuclear em mais de 10% das células com uma média de 49.71% de células marcadas. De uma forma geral, a diminuição da expressão de p27^{kip1} tem sido associada a tumores mais agressivos e a mau prognóstico [142]. Neste estudo não foram disponibilizados dados relativos ao seguimento clínico dos pacientes, pelo que não foi possível avaliar a progressão da doença. Tal como observado em vários trabalhos, a diminuição da expressão de p27^{kip1} nas lesões estudadas não está associada a alterações genéticas, uma vez que não foram encontradas mutações na série analisada, o que indica que, também nas lesões da paratiroide, a expressão de p27^{kip1} é regulada através de mecanismos pós-transcricionais ou pós-tradução. Um dos mecanismos possíveis para o silenciamento de p27^{kip1} é a hipermetilação do promotor, comum a vários supressores tumorais [143]. No entanto, os estudos disponíveis indicam que os níveis de mRNA do *CDKN1B* em tumores da paratiroide com diminuição da expressão de p27^{kip1} são idênticos ao tecido normal, pelo que o silenciamento deve ocorrer durante ou após a tradução do mRNA [78; 106]. Em 2010 um grupo de investigação comparou o perfil de expressão de miRNA de carcinomas da paratiroide com o tecido normal e verificou um aumento significativo da expressão de miR-522 nos carcinomas relativamente à paratiroide normal [106]. Um dos alvos deste miRNA é o p27^{kip1}, sendo que a sua expressão é negativamente regulada pelo miR-522, promovendo a entrada das células na fase S do ciclo celular [144]. O silenciamento de p27^{kip1} através

da ação de miRNAs na paratiroide, assim como em outros tumores neuroendócrinos, pode ser um mecanismo relevante para a sua tumorigênese, no entanto, os estudos disponíveis até à data ainda são escassos, pelo que se torna necessário aprofundar o conhecimento acerca do papel dos miRNAs na paratiroide, dado o seu potencial terapêutico.

A análise imunohistoquímica das lesões paratiroideias permitiu ainda verificar que a expressão de p27^{kip1} nas lesões com duas ou mais glândulas afetadas é significativamente inferior à expressão desta proteína nas lesões uniglandulares (P=0.0067). Dos 25 pacientes deste estudo, 6 apresentavam lesão em mais do que uma paratiroide (pacientes 2, 5, 11, 13, 14 e 20). Dos 6 pacientes, apenas o paciente 14 mostrou marcação idêntica em todas as glândulas afetadas (n=2), com ausência total de expressão nuclear de p27^{kip1}. Nos restantes pacientes com lesão multiglandular, a expressão nuclear de p27^{kip1} foi heterogénea entre as diferentes glândulas do mesmo paciente, com o paciente 5 a apresentar a maior variação na expressão da proteína nas diferentes glândulas (**Tabela 9**). No paciente 11 apenas foi disponibilizada uma de três glândulas afetadas, pelo que não foi possível avaliar as restantes.

Apesar da expressão de p27^{kip1} ser significativamente inferior nas lesões multiglandulares, verificou-se que apenas um paciente (paciente 14, n=2) apresentou expressão negativa em ambas as glândulas afetadas. Nos restantes pacientes com mais do que uma glândula afetada, verificou-se que a perda de expressão não era comum a todas as glândulas (**Tabela 7**). A média de células positivas nestas lesões foi de 20.81% de células positivas, enquanto as lesões uniglandulares apresentaram uma expressão média de 47.52%. Em 2003, num estudo que pretendia estabelecer um perfil molecular e imunohistoquímico em tumores da paratiroide, Stojadinovic *et al* consideraram que o fenótipo de expressão positiva de p27^{kip1} na paratiroide correspondia a mais de 30% de células positivas [82]. Aplicando o mesmo critério na classificação das lesões estudadas neste trabalho, verifica-se que apenas um paciente com lesão multiglandular (paciente 5) apresentou fenótipo positivo em 3 de 4 glândulas afetadas. Nos restantes pacientes com doença multiglandular, a expressão de p27^{kip1} foi inferior a 30% em todas as glândulas. No mesmo estudo, Stojadinovic verificou que 80% dos adenomas estudados apresentaram fenótipo positivo para a marcação de p27^{kip1} [82]. Na série de pacientes avaliada neste estudo, verificou-se que 11 de 18 lesões uniglandulares (61%) apresentaram positividade nuclear em mais de 30% das células. No entanto, em duas lesões (pacientes 4 e 17) verificou-se marcação nuclear muito próxima de 30% (28.21% e 28.07%, respetivamente).

Os resultados obtidos neste trabalho podem indicar que a p27^{kip1} tem maior relevância no desenvolvimento de lesões multiglandulares da paratiroide do que em lesões uniglandulares. Não existem estudos na literatura que observem a mesma correlação em lesões esporádicas da paratiroide, contudo, sabe-se que em pacientes com hiperparatiroidismo secundário, a hiperplasia paratiroideia é a lesão mais frequente na paratiroide e que estes pacientes apresentam também uma diminuição dos níveis de VDR [145]. Assim, os resultados obtidos neste trabalho parecem indicar que o desenvolvimento esporádico de hiperplasia da paratiroide pode estar associado a um mecanismo alternativo, possivelmente VDR-dependente [146]. A análise genética do VDR não tem revelado mutações na sua região codificante em lesões da paratiroide, pelo que outros mecanismos devem estar na origem da diminuição da expressão deste recetor na paratiroide.

Na década de 1990 vários estudos foram efetuados com o objetivo de avaliar a clonalidade das lesões benignas da paratiroide através da análise de marcadores da região 11q13 e inativação do cromossoma X. Em 1995 Arnold *et al* verificou que 62% das hiperplasias de mulheres com HPTP apresentavam um padrão de inativação do cromossoma X concordante com a origem policlonal destas lesões. No entanto os autores estimaram que este valor fosse sobre-representativo do valor real, dadas as limitações da técnica (contaminação por tecido normal, metilação numa lesão verdadeiramente monoclonal) [147]. Em 1996 um outro estudo mostrou a origem policlonal em 4 de 4 hiperplasias de tipo difuso, e a origem monoclonal em 7 de 10 hiperplasias de tipo nodular. Histopatologicamente, considera-se que a hiperplasia de tipo difuso precede o desenvolvimento de hiperplasia de tipo nodular, em pacientes com hiperparatiroidismo secundário [148]. Com os resultados obtidos os autores defendem que a hiperplasia de tipo nodular representa a evolução monoclonal de uma célula que adquiriu tais alterações que lhe conferiu vantagem proliferativa e/ou de sobrevivência relativamente às outras populações celulares presentes na hiperplasia de tipo difuso [149]. A variação da expressão nuclear de p27^{kip1} e de Menina, em diferentes lesões do mesmo paciente pode refletir a origem policlonal da hiperplasia paratiroideia. A diminuição acentuada da expressão de p27^{kip1} em apenas uma das glândulas (paciente 5, lesão A) pode sugerir diferentes espaços temporais desde o início do aumento de proliferação celular nas diferentes glândulas. O silenciamento do CDKI p27^{kip1}, bem como da Menina, representa uma vantagem proliferativa para as células, dado o papel inibitório destas proteínas no ciclo celular. Contudo, os estudos sobre a clonalidade das lesões paratiroideias multiglandulares são escassos e datam da década de 1990, pelo que mais

estudos serão necessários para elucidar os mecanismos por trás da heterogeneidade tumoral nestas lesões.

5 CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Apesar do conhecimento proporcionado pelo estudo das formas familiares de HPTP, as alterações moleculares subjacentes ao desenvolvimento das formas esporádicas de HPTP ainda são pouco conhecidas, e não têm, atualmente, impacto na clínica, o que dificulta o tratamento e o seguimento destes pacientes.

No presente trabalho verificou-se que, tal como tem vindo a ser descrito na literatura, as alterações mais frequentes nas lesões da paratiroide se observam no gene *Men1*.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as deleções do gene *Men1* são frequentes nas lesões esporádicas da paratiroide, tal como já havia sido verificado num estudo anterior neste grupo de investigação. O estudo por imunohistoquímica permitiu observar que na maioria das lesões de paratiroide há uma diminuição da expressão de Menina o que sugere que a perda desta proteína é relevante para o desenvolvimento tumorigénico nestas glândulas. Em conjunto, estes resultados sugerem que o supressor tumoral *Men1* desempenha um papel fundamental na tumorigénese paratiroideia. Além disso, este trabalho permitiu verificar que, na paratiroide, o *Men1* segue o modelo de Knudson para a inativação de genes supressores tumorais. Todos os casos com perda de material genético no gene *Men1* (avaliada por MLPA) apresentaram diminuição da expressão de Menina, relativamente à paratiroide normal (avaliada por imunohistoquímica). Apesar de apenas uma lesão mostrar claramente a presença de uma mutação acompanhada de LOH, não se pode excluir a hipótese de, nas restantes lesões, haver outras alterações no gene, como hipermetilação do promotor, ou mutações intrónicas. Sendo uma proteína com atividade *scaffold*, a ação da Menina está diretamente relacionada com a função das proteínas a que se liga. Apesar de nos tecidos endócrinos a Menina ter uma ação de supressão tumoral, em células hematopoiéticas a associação Menina-MLL promove o desenvolvimento de neoplasia. Além disso, alguns estudos sugerem que, enquanto supressor tumoral, a sensibilidade das células à inativação do *Men1* é dependente do tipo de tecido/orgão. Embora sejam conhecidos vários parceiros de ação da Menina, existem poucos estudos na literatura que descrevam os mecanismos que regulam a transcrição do gene *Men1*. Para além do estudo de alterações epigenéticas (metilação, modelação por miRNAs), o estudo da inter-relação entre a Menina e os seus parceiros de interação poderá ajudar a entender o papel do microambiente na transcrição deste gene supressor tumoral, e dessa forma, talvez explicar os diferentes papéis deste gene em tecidos específicos.

Além das alterações inativantes do gene *Men1*, a sobre-expressão de Ciclina D1 tem sido associada ao desenvolvimento de tumores esporádicos da paratiroide. Durante este estudo verificou-se que uma percentagem significativa de lesões apresentou um

aumento da sua expressão. Contudo, apesar da expressão de Ciclina D1 estar associada à progressão do ciclo celular e ao aumento da proliferação, este não parece ser o mecanismo através do qual a Ciclina D1 exerce o seu efeito oncogénico, uma vez que não se verificou correlação entre a sua expressão e a expressão do marcador de proliferação Ki-67. Um estudo recente mostrou que a Ciclina D1 pode exercer um efeito oncogénico através de mecanismos independentes da transcrição mediada pelos complexos Ciclina D1-CDK. Vários estudos sugerem que os tumores benignos da paratiroide apresentam frequentemente perdas e ganhos cromossomais e o estudo de Agarwal *et al* demonstrou que a sobre-expressão de Ciclina D1 está associada à aneuploidia das células tumorais [133]. Desta forma o aumento da instabilidade genómica, provocado pela sobre-expressão de Ciclina D1, pode representar um mecanismo alternativo de tumorigénese na paratiroide.

O estudo da expressão de proteínas nas lesões de paratiroide permitiu concluir que apesar de as alterações mais frequentes se verificarem no supressor tumoral *Men1* e na proteína Ciclina D1, não se verificaram diferenças significativas na expressão de *Men1* nem de Ciclina D1 entre as lesões singulares e multiglandulares. Também não foi possível estabelecer uma relação entre a expressão de ambas as proteínas na mesma lesão. Assim (tal como é descrito na literatura) ambas as proteínas parecem exercer um papel fundamental na tumorigénese paratiroideia, contudo, o significado clínico de tais alterações, e o seu impacto no prognóstico da doença continuam por elucidar.

Um dos assuntos mais controversos no diagnóstico diferencial de tumores da paratiroide é o uso da marcação imunohistoquímica de Parafibromina como indicador de malignidade. Os resultados obtidos neste estudo não apoiam o uso da expressão desta proteína como critério exclusivo para o diagnóstico de carcinoma paratiroideu. Verificou-se uma diminuição da expressão de Parafibromina em lesões paratiroideias aparentemente benignas e esporádicas. Em uma das lesões verificou-se que a diminuição acentuada da expressão era acompanhada de uma mutação pontual no gene *CDC73/HRPT2*, no entanto não foram detetadas alterações genéticas do *CDC73/HRPT2* em lesões adicionais que também apresentaram diminuição da expressão de Parafibromina. A lesão com mutação do *CDC73/HRPT2* não apresentou critérios histopatológicos que indicassem malignidade, no entanto, tal como acontece no gene *Men1*, o significado clínico das mutações neste gene ainda não é conhecido. As mutações do *CDC73/HRPT2* estão presentes numa grande percentagem de carcinomas da paratiroide, que são tumores invasivos e com uma taxa de recorrência mais elevada do que os tumores benignos. Desta forma é aconselhável que os pacientes com lesões aparentemente benignas com mutação neste supressor tumoral sejam objeto de

seguimento por parte dos clínicos. Assim, segundo os resultados obtidos, a perda de expressão de Parafibromina em lesões esporádicas da paratiroide deve ser um indicador para a pesquisa de mutações no gene *CDC73/HRPT2* e não deve ser utilizada como marcador independente de malignidade.

O estudo da expressão do inibidor do ciclo celular de p27^{kip1} revelou diferenças significativas entre os diferentes tipos de lesão, apesar do estudo genético não revelar mutações na sua região codificante. As lesões multiglandulares apresentaram expressão significativamente inferior de p27^{kip1} relativamente às lesões singulares. Segundo o nosso conhecimento este é a primeira vez que se verifica uma expressão significativamente diferente desta proteína neste tipo de lesões. A diminuição mais acentuada da expressão de p27^{kip1} parece indicar que este inibidor do ciclo celular tem um papel mais relevante no desenvolvimento da hiperplasia da paratiroide do que no desenvolvimento de adenomas singulares, possivelmente através de um mecanismo VDR-dependente. A análise genética do VDR em lesões esporádicas da paratiroide não tem revelado mutações na sua região codificante, à exceção de alguns polimorfismos, cujo significado ainda não está esclarecido. O estudo da expressão do VDR nas lesões esporádicas analisadas neste estudo é fundamental para perceber se está presente um novo mecanismo de proliferação nas lesões multiglandulares da paratiroide. Por isso, mais estudos são essenciais para compreender o mecanismo de regulação da p27^{kip1} pelo VDR. A observação da expressão diferencial do inibidor do ciclo celular p27^{kip1} entre diferentes tipos de lesão pode representar um mecanismo alternativo de proliferação celular na hiperplasia da paratiroide.

Os mecanismos de tumorigénese subjacentes à tumorigénese esporádica das glândulas paratiroides continuam por esclarecer. Apesar da expressão de Menina e de Ciclina D1 não poder ser utilizada como biomarcador do tipo de lesão, a elevada frequência de alterações nestes reguladores do ciclo celular parece ser fundamental na desregulação do crescimento e proliferação destas glândulas.

O estudo das formas esporádicas de hiperparatiroidismo ainda não permitiu estabelecer relações genótipo-fenótipo nos indivíduos afetados. Assim, até à data não é possível fazer o seguimento clínico mais adequado dos doentes. Contudo, a descoberta da expressão diferencial de p27^{kip1} pode constituir o início de um novo caminho no estudo das lesões da paratiroide, e representar um potencial biomarcador na patologia paratiroideia.

6 ANEXOS

1. Descrição dos pares de *primers* utilizados para amplificação das regiões alvo do gene Men1

Exão	Temperatura de emparelhamento (°C)	Tamanho do fragmento amplificado (bp)	Sequência nucleotídica (5'→3')
2.1	60°C	223	F: GGGCGGGTGG AACCTTAG R: AAGGAAAGGAGCACCAGGTC
2.2	60°C	182	F: CCCAGAAGACGCTGTTCC R: GCTGGGCTGGAAGGTGAG
2.3	60°C	196	F: GTGGAGCATTCTGGCTGT R: CTCGAGGATAGAGGGACAGG
2.4	55°C	226	F: TGGCCGACCTGTCTATCATC R: CCACCTACTGGGCTCCAAC
3.1	57°C	167	F: CCTTTCCCCATGTTAAAGCA R: AACTACCCAGGCATGATCC
3.2	56°C	191	F: GTCTCCGGGATGTCCACCT R: TACAGTATGAAGGGGACAAGG
4.1	57°C	152	F: GTCTCCGGGATGTCCACCT R: TACAGTATGAAGGGGACAAGG
4.2	57°C	159	F: ATCATACATGCGCTGTGACC R: CAAGTCAAGTCTGGCCTAGC
5	59°C	102	F: CCTGTTCCGTGGCTCATAAC R: CTGGCCAATTCCCTCTACTG
6	62°C	167	F: GGTGGCAGCCTGAATTATGA R: CAGCCACTGTTAGGGTCTCC
7.1	59.2°C	116	F: AGGATCCTCTGCCTCACCTC R: ACATTGCGGTTGCGACAGT
7.2	55°C	151	F: ACATTGCGGTTGCGACAGT R: ACAGGCTGCAGGCCCTAGTA
8.1	55°C	192	F: GATGGTGAGACCCCTTCAGA R: CCTTTCACCTGGCTTTGCT
8.2	55°C	156	F: GACGAGGAGATCTACAAGGAGTT R: GTGGGAGGCTGGACACAG
9.1	60°C	155	F: CCCTCTGCTAAGGGGTGAGT R: GACTGCCCTCCTCCATT
9.2	60°C	157	F: ACCTGCTGCGATTCTACGAC R: ACCACCTGTAGTGCCAGAC
10.1	57,5°C	158	F: CCTTGCTCTCACCTTGCTCT R: GCTCCTCTGGCTTGGACTC
10.2	63°C	178	F: CGCATAGTGAGCCGAGAGG R: GGGTCCTGACACTGCAC
10.3	60°C	177	F: AGAAGCCAGCACTGGACAAG R: TCTGGAAAGTGAGCACTGGA
10.4	60°C	150	F: CAGCACCCACAGCATCAC R: TCATCTGCACTTGC GACTGT
10.5	55°C	158	F: GTGGCCACCAAGATCAACTC R: GTCCGAAGTCCCCAGTAGT

2. Descrição dos pares de *primers* utilizados para amplificação das regiões alvo do gene CDKN1B

Exão	Temperatura de emparelhamento (°C)	Fragmento amplificado (bp)	Sequência nucleotídica (5'→3')
1.1	55	247	F:AGAGAGGCGGTCGTGCAG R:GCCCTCTAGGGGTTTGTGAT
1.2	55	248	F:GAAGCACTGCAGAGACATGG R:GCGTGTCTCAGAGTTAGCC
1.3	55	230	F:AAAGGTGCCTGCAAGGTG R:GGGCCCCAACACATTCTAT
2	62	223	F:AACCTTCTGCCAGCCATTGTTTTT R:AGTAAGATCAGGTATCGTGAGGT

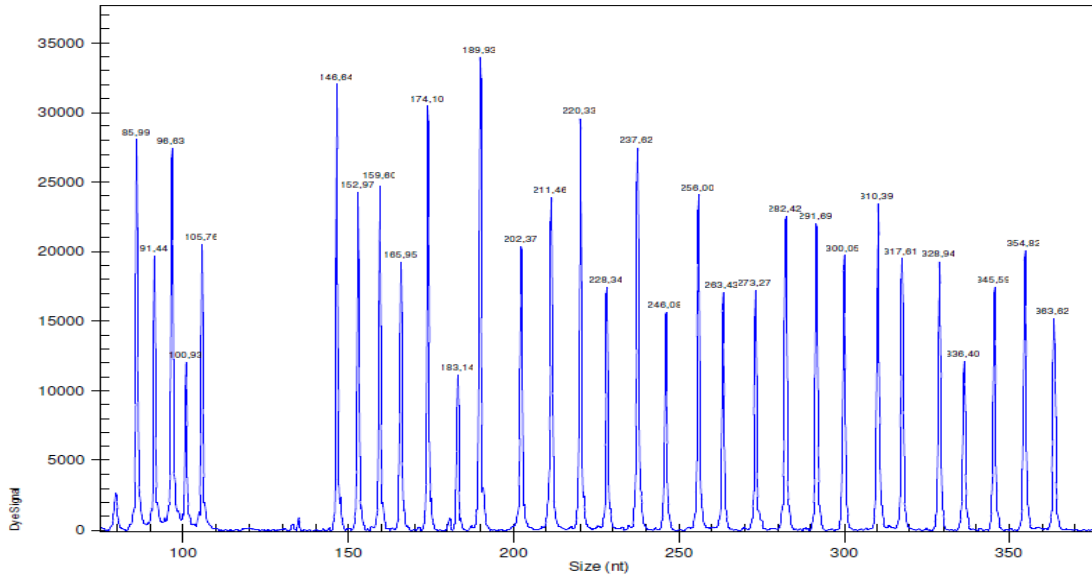
3. Descrição dos pares de *primers* utilizados para amplificação das regiões alvo do gene HRPT2

Exão	Temperatura de emparelhamento (°C)	Fragmento amplificado (bp)	Sequência nucleotídica (5'→3')
1	55.5	228	F: CGAGGCGACAAGAGAAGAAG R: ACAGCCATGCCGGACTTAC
2	56°C	247	F: TGAATCCAGCCTGAAGAGTTG R: AGGCCAGACCCTGTCTCTTA

4. Condições de Imunohistoquímica

Proteína	Anticorpo Primário	Diluição	Incubação	Recuperação antigênica
Menina	Menin (N-19): sc-8201 Santa Cruz Biotechnology	1:50	<i>Overnight</i> 4°C	EDTA 1X, pH=9.00
Ciclina D1	Cyclin D1, SP4 Neomarkers	1:50	30min T.A.	Tampão Citrato, pH=6.00
Parafibromina	Parafibromin (2H1): sc-33638 Santa Cruz Biotechnology	1:50	<i>Overnight</i> 4°C	EDTA 1X, pH= 9.00
Ki-67	Ki-67, Clone MIB-1 DAKO	1:100	30min, T.A.	Tampão Citrato, pH=6.00
p27 ^{Kip1}	p27 (C-19): sc-528 Santa Cruz Biotechnology	1:100	1h, TA	Tampão Citrato, pH=6.00

5. Exemplo de uma eletroforese capilar de uma amostra de DNA controle analisada com o kit SALSA MLPA P017-B1 MEN1 lot 0109, e a respetiva tabela que indica a correspondência entre os tamanhos (nt) e os respetivos exões (adaptado de: SALSA MLPA KIT P017-B1 MEN1, Description Version 12; 20-01-2010)



Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene/exon
229	00434-L00020	CTTN
175	00477-L00060	RELA
328	01667-L14817	SNX15
		MEN1 Start codon
355	13161-L14683	exon 1b
191	01663-L01242	exon 2b (1)
238	13157-L14682	exon 2b (1)
220	01664-L01243	exon 3b (2)
283	01665-L14816	exon 4 (3)
167	13158-L14680	exon 5
202	13159-L14681	exon 6
301	01666-L01245	exon 8 (7)
337	03403-L09561	exon 9 (8)
154	03404-L02795	exon 10 (9)
247	01164-L00720	exon 11 (10)

6. Tabela de resultados do estudo por MLPA de todos os casos da série de lesões da paratiroide.

Paciente	Lesão	Ensembl	Exão 10	Exão 9	Exão 8	Exão 7	Exão 5	Exão 4	Exão 3	Exão 2	Intrão 1-2	Exão 1	5' UTR
		Probe number (P017-B1)	11-064.3 MEN1 Exon 11	11-064.3 MEN1 Exon 10	11-064.3 MEN1 Exon 09	11-064.3 MEN1 Exon 08	11-064.3 MEN1 Exon 06	11-064.3 MEN1 Exon 05	11-064.3 MEN1 Exon 04	11-064.3 MEN1 Exon 03	11-064.3 MEN1 Exon 02B	11-064.3 MEN1 Exon 02A	11-064.3 MEN1 Exon 01
1			0.71	0.71	0.46	0.60	0.37	0.48	0.36	0.61	0.77	1.30	1.12
2	A		1.51	1.07	1.14	1.20	0.94	1.03	1.06	1.61	2.00	2.15	2.79
	B		1.46	1.13	0.63	0.82	0.80	1.12	0.74	1.37	1.85	3.00	1.46
	C		1.25	1.01	0.73	0.98	0.93	1.03	0.95	1.08	1.34	1.84	1.42
3			1.18	1.18	0.97	1.20	1.16	1.12	1.10	1.02	1.05	1.17	1.20
4			1.42	1.21	1.40	1.41	1.19	1.15	1.33	1.20	1.27	1.28	1.63
5	A		1.25	1.09	0.84	0.94	0.97	1.11	1.01	0.99	1.20	1.62	1.32
	B		1.41	1.19	0.86	1.00	0.80	1.01	0.82	1.25	1.62	2.50	1.79
	C		1.04	1.02	1.14	0.91	1.04	0.97	0.69	1.32	1.67	2.44	1.51
	D		1.35	1.02	0.76	0.91	0.78	1.07	0.80	1.32	1.67	2.44	1.51
6			0.64	0.52	0.48	0.59	0.58	0.63	0.61	0.55	0.58	0.75	0.79
7			0.74	0.58	0.64	0.66	0.56	0.64	0.49	0.60	0.62	0.85	0.86
9			0.94	0.87	0.84	0.90	0.88	0.88	0.87	0.80	0.87	0.89	1.04
10			0.85	0.74	0.72	0.72	0.64	0.73	0.74	0.38	0.41	0.39	0.60
11			1.29	1.13	0.91	1.02	0.93	0.95	0.95	0.97	0.97	1.12	1.19
12													
13	A		1.22	1.12	0.91	0.98	0.88	1.04	1.00	0.89	1.09	1.38	1.25
	B		1.10	0.91	1.15	0.82	0.84	0.97	0.74	0.95	1.22	1.59	1.69
	C		1.30	1.13	0.93	1.15	0.88	1.02	0.96	1.15	1.23	1.55	1.36
14	A		1.48	1.22	0.92	1.06	0.92	1.14	0.99	0.92	1.10	1.42	1.00
	B		0.99	0.92	1.03	1.01	1.08	1.12	1.03	0.91	0.91	0.88	0.95
15			1.26	1.14	1.00	1.01	1.03	1.08	1.02	0.89	1.15	1.33	1.13
16			1.81	1.39	0.91	1.01	0.91	1.20	1.21	0.84	1.29	1.67	1.24
17			1.01	0.93	0.95	0.86	0.83	0.99	0.85	0.95	1.06	1.20	1.45
18			1.07	1.17	0.95	0.99	0.93	1.00	1.10	0.90	1.02	1.03	0.99
19			0.75	0.76	0.74	0.86	0.72	0.84	0.71	0.79	0.78	0.91	0.98
20	A		1.12	0.87	1.03	0.94	0.86	0.87	0.93	0.94	1.11	1.13	1.47
	B		0.97	0.90	0.68	0.93	0.75	0.84	0.71	0.86	0.95	1.08	0.88
21													
22			0.83	0.87	0.80	0.77	0.70	0.74	0.76	0.68	0.72	0.68	0.78
25			1.31	1.27	1.20	1.33	1.19	1.20	1.24	1.17	1.24	1.23	1.41
26			0.79	0.73	0.69	0.75	0.74	0.80	0.76	0.58	0.60	0.68	0.79
28													
29			1.25	0.94	1.30	0.95	0.98	1.08	0.99	1.01	1.36	1.46	1.39

*As células preenchidas a cinzento indicam as regiões para as quais o software Coffalyzer MLPA DAT indica que existe deleção; os valores indicam a média 3 experiências diferentes (exceto as amostras do paciente 6 e do paciente 14-amostra A, para os quais só foi possível realizar duas experiências independentes, devido à escassez de material biológico).

7 REFERÊNCIAS

1. Caje, A. J. E. 1953. *Richard Owen and the discovery of the parathyroid glands*. E. Ashworth Underwood. Science, Medicine and History. Essays on the Evolution of Scientific Thought and Medical Practice, Oxford University Press **2**: 217-222.
2. Eknayan, G. 1995. *A history of the parathyroid glands*. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation **26**(5): 801-807.
3. Potts, J. T. 2005. *Parathyroid hormone: past and present*. Journal of Endocrinology **187**(3): 311-325.
4. Szalay, K. S. and M. Beck 2000. *Molecular and Cellular Endocrine Pathology*. London.
5. Harach, H. R. 2010. *Endocrine Pathology, Differential Diagnosis and Molecular Advances*. New York.
6. Wang, C.-A. 1976. *The Anatomic Basis of Parathyroid Surgery*. Annals of Surgery **183**(3): 271-275.
7. Nussey, S. and S. Whitehead 2001. *The Parathyroid Glands and Vitamin D*. Oxford, BIOS Scientific Publishers.
8. Costa-Guda, J., T. Tokura, et al. 2007. *Mitochondrial DNA mutations in oxyphilic and chief cell parathyroid adenomas*. BMC Endocrine Disorders **7**(1): 8.
9. Dufour, D. R. and S. Y. Wilkerson 1982. *The normal parathyroid revisited: Percentage of stromal fat*. Human Pathology **13**(8): 717-721.
10. Bergwitz, C. and H. Jüppner 2010. *Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23*. Annual Review of Medicine **61**(1): 91-104.
11. Ljunghall, S., G. Åkerström, et al. 1984. *Neuromuscular involvement in primary hyperparathyroidism*. Journal of Neurology **231**(5): 263-265.
12. JONES, G., S. A. STRUGNELL, et al. 1998. *Current Understanding of the Molecular Actions of Vitamin D*. Physiological Reviews **78**(4): 1193-1231.
13. Grimelius, L., G. Akerstrom, et al. 1991. *The Parathyroid Glands*. Boston, Blackwell Scientific.
14. Haskins, S. C., K. Hopper, et al. 2006. *The acid-base impact of free water removal from, and addition to, plasma*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine **147**(3): 114-120.
15. Brown, E. M., G. Gamba, et al. 1993. *Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid*. Nature **366**(6455): 575-580.
16. Udagawa, N., N. Takahashi, et al. 1999. *Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor*. Bone **25**(5): 517-523, Ishizuya, T., S. Yokose, et al. 1997. *Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells*. Journal of Clinical Investigation **99**(12).
17. Zhong, Y., H. J. Armbrecht, et al. 2009. *Calcitonin, a Regulator of the 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -Hydroxylase Gene*. Journal of Biological Chemistry **284**(17): 11059-11069.
18. Guyton, A. C. and J. E. Hall 2006. *Parathyroid Hormone, Calcitonin, Calcium and Phosphate Metabolism, Vitamin D, Bone and Teeth*. Textbook of Medical Physiology, Elsevier Saunders: 978-995.
19. Silverberg, S. J. 2007. *Vitamin D Deficiency and Primary Hyperparathyroidism*. Journal of Bone and Mineral Research **22**(S2): V100-V104.
20. Spence, H. 1984. *The life and death of Captain Charles Martell and kidney stone disease*. Journal of Urology **132**(6): 1204-1207.
21. Blanchard, C., E. Mirallié, et al. 2010. *Sporadic Primary Hyperparathyroidism*. Journal of Visceral Surgery.
22. Fraser, W. D. 2009. *Hyperparathyroidism*. The Lancet **374**: 145-158.
23. Tomasello, S. 2008. *Secondary Hyperparathyroidism and Chronic Kidney Disease*. Diabetes Spectrum **21**(1): 19-25.

24. Carlson, D. 2010. *Parathyroid Pathology - Hyperparathyroidism and Parathyroid Tumors*. Arch Pathol Lab Med **134**(November): 1639-1644.
25. Mundy, G., D. Cove, et al. 1980. *Primary hyperparathyroidism: changes in the pattern of clinical presentation*. The Lancet **315**(8182): 1317-1320.
26. Suliburk, J. W. and N. D. Perrier 2007. *Primary Hyperparathyroidism*. The Oncologist **12**(6): 644-653.
27. Stenström, G. and P.-A. Heedman 1974. *Clinical findings in patients with hypercalcaemia: A Final Investigation Based on Biochemical Screening*. Acta Medica Scandinavica **195**(1-6): 473-477, Wermers, R. A., S. Khosla, et al. 2006. *Incidence of Primary Hyperparathyroidism in Rochester, Minnesota, 1993–2001: An Update on the Changing Epidemiology of the Disease*. Journal of Bone and Mineral Research **21**(1): 171-177.
28. Tissell, L., S. Carlson, et al. 1976. *Autonomous hyperparathyroidism: a possible late complication of neck radiotherapy*. Acta Chirurgica Scandinavica **142**(5): 367-373, Fiorica, V. and J. Males 1979. *Hyperparathyroidism after radiation of the head and neck: a case report and review of the literature*. The American Journal of the Medical Sciences **278**(3): 256, Stephen, A. E., K. T. Chen, et al. 2004. *The coming of age of radiation-induced hyperparathyroidism: Evolving patterns of thyroid and parathyroid disease after head and neck irradiation*. Surgery **136**(6): 1143-1153, CHRISTENSSON, T. 1978. *Hyperparathyroidism and Radiation Therapy*. Annals of Internal Medicine **89**(2): 216-217, Fujiwara, S., R. Sposto, et al. 1992. *Hyperparathyroidism among atomic bomb survivors in Hiroshima*. Radiation Research **130**(3): 372-378.
29. Garner, S. C. and G. S. Leight 1999. *Initial experience with intraoperative PTH determinations in the surgical management of 130 consecutive cases of primary hyperparathyroidism*. Surgery **126**(6): 1132-1138.
30. Wang, C.-a. and R. D. Gaz 1985. *Natural history of parathyroid carcinoma: Diagnosis, treatment, and results*. The American Journal of Surgery **149**(4): 522-527.
31. Fernandez-Ranvier, G. G., E. Khanafshar, et al. 2007. *Parathyroid carcinoma, atypical parathyroid adenoma, or parathyromatosis?* Cancer **110**(2): 255-264.
32. Ippolito, G., F. F. Palazzo, et al. 2007. *Intraoperative diagnosis and treatment of parathyroid cancer and atypical parathyroid adenoma*. British Journal of Surgery **94**(5): 566-570.
33. Levin, K. E., M. Galante, et al. 1987. *Parathyroid carcinoma versus parathyroid adenoma in patients with profound hypercalcemia*. Surgery **101**(6): 649-660.
34. Sillery, J. C., D. R. DeLone, et al. 2011. *Cystic Parathyroid Adenomas on Dynamic CT*. American Journal of Neuroradiology **32**(6): E107-E109.
35. DeLellis, R. A. 2011. *Parathyroid tumors and related disorders*. Mod Pathol **24 Suppl 2**: S78-93.
36. DeLellis, R. A., P. Mazzaglia, et al. 2008. *Primary hyperparathyroidism: a current perspective*. Arch Pathol Lab Med **132**(8): 1251-1262.
37. Kufe, D. W., R. E. Pollock, et al. 2003. *Discovery and Identification of Oncogenes*. Holland-Frei Cancer Medicine. Hamilton, BC Decker.
38. Knight, L. 2007. *The Cell*, John Wiley & Sons.
39. Cooper, G. M. 2000. *Tumor Suppressor Genes*. Sunderland, Sinauer Associates, Lodish, H., A. Berk, et al. 2000. *Proto-Oncogenes and Tumor Suppressor Genes*. New York, W. H. Freeman.
40. Knudson, A. G. 1971. *Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma*. Proc. Nat. Acad. Sci. **68**(4): 820-823.
41. Lemmens, I., W. J. M. Van de Ven, et al. 1997. *Identification of the Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1) Gene*. Human Molecular Genetics **6**(7): 1177-1183.

42. Pannett, A. A. J. and R. V. Thakker 2001. *Somatic Mutations in MEN Type 1 Tumors, Consistent with the Knudson "Two-Hit" Hypothesis*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86**(9): 4371-4374.
43. Trump, D., B. Farren, et al. 1996. *Clinical studies of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1)*. *QJM* **89**(9): 653-670.
44. Machens, A., L. Schaaf, et al. 2007. *Age-related penetrance of endocrine tumours in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): a multicentre study of 258 gene carriers*. *Clinical Endocrinology* **67**(4): 613-622.
45. Chandrasekharappa, S. C., S. C. Guru, et al. 1997. *Positional Cloning of the Gene for Multiple Endocrine Neoplasia-Type 1*. *Science* **276**(5311): 404-407.
46. Thierry-Mieg, D. and J. Thierry-Mieg 2006. *AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation*. *Genome Biol* **7 Suppl 1**: S12 11-14.
47. Guru, S. C., P. K. Goldsmith, et al. 1998. *Menin, the product of Men1 gene, is a nuclear protein*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**: 1630-1634, Huang, S. C., Z. Zhuang, et al. 1999. *Nuclear/cytoplasmic localization of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin*. *Laboratory Investigation* **79**(3): 301-310.
48. Hendy, G. N., H. Kaji, et al. 2009. *Cellular functions of menin*. *Adv Exp Med Biol* **668**: 37-50.
49. Milne, T. A., C. M. Hughes, et al. 2005. *Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(3): 749-754.
50. Kim, H., J.-E. Lee, et al. 2003. *Menin, a Tumor Suppressor, Represses JunD-Mediated Transcriptional Activity by Association with an mSin3A-Histone Deacetylase Complex*. *Cancer Research* **63**(19): 6135-6139.
51. Agarwal, S. K., E. A. Novotny, et al. 2003. *Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter*. *Proceedings of National Academy of Sciences* **100**(19): 10770-10775.
52. Kim, Y. S., A. L. Burns, et al. 1999. *Stable overexpression of Men1 suppresses tumorigenicity of RAS*. *Oncogene* **18**(43): 5936-5942.
53. La, P., A. Desmond, et al. 2006. *Tumor suppressor menin: the essential role of nuclear localization signal domains in coordinating gene expression*. *Oncogene* **25**(25): 3537-3546.
54. La, P., Y. Yang, et al. 2007. *Menin-mediated Caspase 8 Expression in Suppressing Multiple Endocrine Neoplasia Type 1*. *Journal of Biological Chemistry* **282**(43): 31332-31340.
55. Sukhodolets, K. E., A. B. Hickman, et al. 2003. *The 32-Kilodalton Subunit of Replication Protein A Interacts with Menin, the Product of the MEN1 Tumor Suppressor Gene*. *Molecular and Cellular Biology* **23**(2): 493-509.
56. Jin, S., H. Mao, et al. 2003. *Menin Associates with FANCD2, a Protein Involved in Repair of DNA Damage*. *Cancer Research* **63**(14): 4204-4210.
57. Crabtree, J. S., P. C. Scacheri, et al. 2001. *A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(3): 1118-1123.
58. Lemos, M. C. and R. V. Thakker 2008. *Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1): Analysis of 1336 Mutations Reported in the First Decade Following Identification of the Gene*. *Human Mutation* **29**(1): 22-32.
59. Forbes, S. A., G. Bhamra, et al. 2008. "The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC)." Retrieved [08-June-2012].
60. Yaguchi, H., N. Ohkura, et al. 2004. *Menin missense mutants associated with multiple endocrine neoplasia type 1 are rapidly degraded via the ubiquitin-proteasome pathway*. *Mol Cell Biol* **24**(15): 6569-6580.
61. Carpten, J. D., C. M. Robbins, et al. 2002. *HRPT2, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome*. *Nat Genet* **32**(4): 676-680.

62. Masi, G., L. Barzon, et al. 2008. *Clinical, genetic and histopathologic investigation of CDC73-related familial hyperparathyroidism*. *Endocrine-Related Cancer* **15**: 1115-1126.
63. Simonds, W. F., C. M. Robbins, et al. 2004. *Familial Isolated Hyperparathyroidism Is Rarely Caused by Germline Mutation in HRPT2, the Gene for the Hyperparathyroidism-Jaw Tumor Syndrome*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**(1): 96-102.
64. Marx, S. J., W. F. Simonds, et al. 2002. *Hyperparathyroidism in hereditary syndromes: special expressions and special managements*. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **17 Suppl 2**: N37-43.
65. Howell, V. M., C. J. Haven, et al. 2003. *HRPT2 mutations are associated with malignancy in sporadic parathyroid tumours*. *Journal of Medical Genetics* **40**(9): 657-663.
66. Teh, B. T., F. Farnebo, et al. 1996. *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*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **81**(12): 4204-4211.
67. Yart, A., M. Gstaiger, et al. 2005. *The HRPT2 Tumor Suppressor Gene Product Parafibromin Associates with Human PAF1 and RNA Polymerase II*. *Molecular and Cellular Biology* **25**(12): 5052-5060.
68. Rozenblatt-Rosen, O., C. M. Hughes, et al. 2005. *The Parafibromin Tumor Suppressor Protein Is Part of a Human Paf1 Complex*. *Molecular and Cellular Biology* **25**(2): 612-620.
69. Lin, L., J.-H. Zhang, et al. 2008. *The parafibromin tumor suppressor protein inhibits cell proliferation by repression of the c-myc proto-oncogene*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(45): 17420-17425.
70. Lin, L., M. Czapiga, et al. 2007. *Nuclear Localization of the Parafibromin Tumor Suppressor Protein Implicated in the Hyperparathyroidism-Jaw Tumor Syndrome Enhances Its Proapoptotic Function*. *Molecular Cancer Research* **5**(2): 183-193.
71. Kufe, D. W., R. E. Pollock, et al. 2003. *Men 2A, 2B, and Non-Men Familial Medullary Thyroid Carcinoma*. *Holland-Frei Cancer Medicine*. Hamilton, BC Decker.
72. Cuccuru, G., C. Lanzi, et al. 2004. *Cellular Effects and Antitumor Activity of RET Inhibitor RPI-1 on MEN2A-Associated Medullary Thyroid Carcinoma*. *Journal of the National Cancer Institute* **96**(13): 1006-1014.
73. Sharretts, J. M. and W. F. Simonds 2010. *Clinical and molecular genetics of parathyroid neoplasms*. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **24**(3): 491-502.
74. Carling, T., E. Szabo, et al. 2000. *Familial Hypercalcemia and Hypercalciuria Caused by a Novel Mutation in the Cytoplasmic Tail of the Calcium Receptor*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85**(5): 2042-2047.
75. Pellegata, N. S., L. Quintanilla-Martinez, et al. 2006. *Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(42): 15558-15563.
76. Marinoni, I. and N. S. Pellegata 2010. *p27kip1: a new Multiple Endocrine Neoplasia gene?* *Neuro-endocrinology* **93**(1): 19-28.
77. Shin, I., F. M. Yakes, et al. 2002. *PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization*. *Nat Med* **8**(10): 1145-1152.
78. Costa-Guda, J., I. Marinoni, et al. 2011. *Somatic Mutation and Germline Sequence Abnormalities in CDKN1B, Encoding p27Kip1, in Sporadic Parathyroid Adenomas*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **96**(4): E701-E706.
79. Georgitsi, M., A. Raitila, et al. 2007. *Germline CDKN1B/p27Kip1 mutation in multiple endocrine neoplasia*. *J Clin Endocrinol Metab* **92**(8): 3321-3325.

79. Molatore, S., I. Marinoni, et al. 2010. *A novel germline CDKN1B mutation causing multiple endocrine tumors: clinical, genetic and functional characterization*. Human Mutation **31**(11): E1825-E1835.
80. Pasquali, D., L. Circelli, et al. 2011. *CDKN1B V109G polymorphism a new prognostic factor in sporadic medullary thyroid carcinoma*. European Journal of Endocrinology **164**(3): 397-404.
81. Schöndorfa, T., L. Eiseleb, et al. 2004. *The V109G Polymorphism of the p27 Gene CDKN1B Indicates a Worse Outcome in Node-Negative Breast Cancer Patients*. Tumor Biology **25**(5-6): 306-312, Kibel, A. S., B. K. Suarez, et al. 2003. *CDKN1A and CDKN1B Polymorphisms and Risk of Advanced Prostate Carcinoma*. Cancer Research **63**(9): 2033-2036, CANBAY, E., I. Y. ERALTAN, et al. 2010. *CCND1 and CDKN1B Polymorphisms and Risk of Breast Cancer*. Anticancer Research **30**(7): 3093-3098.
82. Stojadinovic, A., A. Hoos, et al. 2003. *Parathyroid neoplasms: Clinical, histopathological, and tissue microarray-based molecular analysis*. Human Pathology **34**(1): 54-64.
83. Joshi, P. P., M. V. Kulkarni, et al. 2006. *Simultaneous downregulation of CDK inhibitors p18Ink4c and p27Kip1 is required for MEN2A-RET-mediated mitogenesis*. Oncogene **26**(4): 554-570.
84. Taniegra, E. D. 2004. *Hyperparathyroidism*. American Family Physician **69**(2): 333-339.
85. Newey, P. J., M. A. Nesbit, et al. 2012. *Whole-Exome Sequencing Studies of Nonhereditary (Sporadic) Parathyroid Adenomas*. J Clin Endocrinol Metab.
86. Zhuang, Z., A. O. Vortmeyer, et al. 1997. *Somatic Mutations of the MEN1 Tumor Suppressor Gene in Sporadic Gastrinomas and Insulinomas*. Cancer Research **57**(21): 4682-4686, Debelenko, L. V., E. Brambilla, et al. 1997. *Identification of MEN1 Gene Mutations in Sporadic Carcinoid Tumors of the Lung*. Human Molecular Genetics **6**(13): 2285-2290, Zhuang, Z., S. Z. Ezzat, et al. 1997. *Mutations of the MEN1 Tumor Suppressor Gene in Pituitary Tumors*. Cancer Research **57**(24): 5446-5451.
87. Arnold, A., H. G. Kim, et al. 1989. *Molecular cloning and chromosomal mapping of DNA rearranged with the parathyroid hormone gene in a parathyroid adenoma*. Journal of Clinical Investigation **83**(6): 2034-2040.
88. Collier, H. A. 2007. *What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation*. Nat Rev Mol Cell Biol **8**(8): 667-670, Nevins, J. R. 2001. *The Rb/E2F pathway and cancer*. Hum Mol Genet **10**(7): 699-703.
89. Imanishi, Y., Y. Hosokawa, et al. 2001. *Primary hyperparathyroidism caused by parathyroid-targeted overexpression of cyclin D1 in transgenic mice*. Journal of Clinical Investigation **107**: 1093-1102.
90. Shattuck, T. M., S. Välimäki, et al. 2003. *Somatic and Germ-Line Mutations of the HRPT2 Gene in Sporadic Parathyroid Carcinoma*. New England Journal of Medicine **349**(18): 1722-1729, Haven, C. J., M. Van Puijenbroek, et al. 2007. *Identification of MEN1 and HRPT2 somatic mutations in paraffin-embedded (sporadic) parathyroid carcinomas*. Clinical Endocrinology **67**(3): 370-376.
91. Juhlin, C., C. Larsson, et al. 2006. *Loss of parafibromin expression in a subset of parathyroid adenomas*. Endocrine-Related Cancer **13**(2): 509-523.
92. Tan, M.-H., C. Morrison, et al. 2004. *Loss of Parafibromin Immunoreactivity Is a Distinguishing Feature of Parathyroid Carcinoma*. Clinical Cancer Research **10**(19): 6629-6637.
93. Juhlin, C. C., A. Villablanca, et al. 2007. *Parafibromin immunoreactivity: its use as an additional diagnostic marker for parathyroid tumor classification*. Endocrine-Related Cancer **14**: 501-512.
94. Witteveen, J. E., N. A. T. Hamdy, et al. 2011. *Downregulation of CASR expression and global loss of parafibromin staining are strong negative determinants of prognosis in parathyroid carcinoma*. Mod Pathol **24**(5): 688-697.

95. Slatopolsky, E., C. Weerts, et al. 1984. *Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by intravenous administration of 1,25-dihydroxy-cholecalciferol in uremic patients.* J Clin Invest **74**(6): 2136-2143, Fukagawa, M., R. Okazaki, et al. 1990. *Regression of parathyroid hyperplasia by calcitriol-pulse therapy in patients on long-term dialysis.* N Engl J Med **323**(6): 421-422.
96. Kremer, R., I. Bolivar, et al. 1989. *Influence of calcium and 1,25-dihydroxycholecalciferol on proliferation and proto-oncogene expression in primary cultures of bovine parathyroid cells.* Endocrinology **125**(2): 935-941.
97. Cañadillas, S., R. Canalejo, et al. 2010. *Upregulation of parathyroid VDR expression by extracellular calcium is mediated by ERK1/2-MAPK signaling pathway.* American Journal of Physiology - Renal Physiology **298**(5): F1197-F1204.
98. Carling, T., A. Kindmark, et al. 1997. *Vitamin D Receptor Alleles, a, and T: Risk Factors for Sporadic Primary Hyperparathyroidism (HPT) but Not HPT of Uremia or MEN 1.* Biochemical and Biophysical Research Communications **231**(2): 329-332.
99. Carling, T., J. Rastad, et al. 2000. *Reduced Parathyroid Vitamin D Receptor Messenger Ribonucleic Acid Levels in Primary and Secondary Hyperparathyroidism.* Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **85**(5): 2000-2003.
100. Björklund, P., G. Åkerström, et al. 2007. *An LRP5 Receptor with Internal Deletion in Hyperparathyroid Tumors with Implications for Deregulated WNT/ β -Catenin Signaling.* PLoS Med **4**(11): e328, Costa-Guda, J. and A. Arnold 2007. *Absence of Stabilizing Mutations of β -Catenin Encoded by CTNNB1 Exon 3 in a Large Series of Sporadic Parathyroid Adenomas.* Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **92**(4): 1564-1566.
101. Svedlund, J., M. Auren, et al. 2010. *Aberrant WNT/ β -catenin signaling in parathyroid carcinoma.* Molecular Cancer **9**(1): 294.
102. Martin, A., V. David, et al. 2012. *Regulation and function of the FGF23/Klotho endocrine pathways.* Physiological Reviews **92**(1): 131-155.
103. Björklund, P., T. Krajisnik, et al. 2008. *Type I Membrane Klotho Expression Is Decreased and Inversely Correlated to Serum Calcium in Primary Hyperparathyroidism.* Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **93**(10): 4152-4157.
104. Haglund, F., M. Lu, et al. 2012. *Prolactin Receptor in Primary Hyperparathyroidism – Expression, Functionality and Clinical Correlations.* PLoS ONE **7**(5): e36448.
105. Garcia, J., J. Tardio, et al. 2002. *Chromosomal imbalances identified by comparative genomic hybridization in sporadic parathyroid adenomas.* European Journal of Endocrinology **146**(2): 209-213.
106. Corbetta, S., V. Vaira, et al. 2010. *Differential expression of microRNAs in human parathyroid carcinomas compared with normal parathyroid tissue.* Endocrine-Related Cancer **17**(1): 135-146.
107. Alvelos, M. I., M. Mendes, et al. 2011. *Molecular Alterations in Sporadic Primary Hyperparathyroidism.* Genetics Research International **2011**.
108. Bilezikian, J. P., A. A. Khan, et al. 2009. *Guidelines for the Management of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism: Summary Statement from the Third International Workshop.* Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **94**(2): 335-339.
109. Kitaoka, M. 2003. *Ultrasonographic diagnosis of parathyroid glands and percutaneous ethanol injection therapy.* Nephrology Dialysis Transplantation **18**(suppl 3): iii27-iii30.
110. Ünlütürk, U., M. F. Erdoğan, et al. 2012. *The role of ultrasound elastography in preoperative localization of parathyroid lesions: a new assisting method to preoperative parathyroid ultrasonography.* Clinical Endocrinology **76**(4): 492-498.
111. Bleier, B. S., V. A. LiVolsi, et al. 2006. *Technetium Tc 99m sestamibi sensitivity in oxyphil cell-dominant parathyroid adenomas.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg **132**(7): 779-782.
112. Salem, P. N. 2012. "Hyperparathyroidism in Emergency Medicine Treatment & Management." *Medscape Reference: Drugs, Diseases & Procedures.*

113. Miller, S. A., D. D. Dykes, et al. 1988. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. *Nucleic Acids Research* **16**(3): 1215.
114. Mullis, K., F. Faloona, et al. 1986. *Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**: 263-273.
115. Sanger, F., S. Nicklen, et al. 1977. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**(12): 5463-5467.
116. Schouten, J. P., C. J. McElgunn, et al. 2002. *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*. *Nucleic Acids Research* **30**(12): e57.
117. Adzhubei, I. A., S. Schmidt, et al. 2010. *A method and server for predicting damaging missense mutations*. *Nat Methods* **7**(4): 248-249.
118. Artimo, P., M. Jonnalagedda, et al. 2012. *ExpASY: SIB bioinformatics resource portal*. *Nucleic Acids Res* **40**(Web Server issue): W597-603.
119. Wautot, V., C. Vercherat, et al. 2002. *Germline mutation profile of MEN1 in multiple endocrine neoplasia type 1: search for correlation between phenotype and the functional domains of the MEN1 protein*. *Human Mutation* **20**(1): 35-47.
120. Ratineau, C., C. Bernard, et al. 2004. *Reduction of menin expression enhances cell proliferation and is tumorigenic in intestinal epithelial cells*. *J Biol Chem* **279**(23): 24477-24484.
121. Yang, Y. and X. Hua 2007. *In search of tumor suppressing functions of menin*. *Mol Cell Endocrinol* **265-266**: 34-41.
122. Yang, Y. J., J. W. Han, et al. 2010. *The tumor suppressor, parafibromin, mediates histone H3 K9 methylation for cyclin D1 repression*. *Nucleic Acids Res* **38**(2): 382-390.
123. Lanneaux, J., A. Poidvin, et al. 2012. *[Fanconi anemia in 2012.]*. *Arch Pediatr*.
124. Thakker, R. V., P. Bouloux, et al. 1989. *Association of parathyroid tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 with loss of alleles on chromosome 11*. *N Engl J Med* **321**(4): 218-224, Bystrom, C., C. Larsson, et al. 1990. *Localization of the MEN1 gene to a small region within chromosome 11q13 by deletion mapping in tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(5): 1968-1972, Gordon, R., M. Gartside, et al. 1996. *Different allelic patterns at chromosome 11q13 in paired aldosterone-producing tumours and blood DNA*. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **23**(6-7): 594-596.
125. Theodoropoulou, M., I. Cavallari, et al. 2004. *Differential expression of menin in sporadic pituitary adenomas*. *Endocr Relat Cancer* **11**(2): 333-344.
126. Georgitsi, M., E. Heliovaara, et al. 2008. *Large genomic deletions in AIP in pituitary adenoma predisposition*. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(10): 4146-4151.
127. Lejonklou, M. H., A. Barbu, et al. 2012. *Accelerated Proliferation and Differential Global Gene Expression in Pancreatic Islets of Five-Week-Old Heterozygous Men1 Mice: Men1 Is a Haploinsufficient Suppressor*. *Endocrinology* **153**(6): 2588-2598, Gracanin, A., K. M. A. Dreijerink, et al. 2009. *Tissue Selectivity in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1-Associated Tumorigenesis*. *Cancer Research* **69**(16): 6371-6374.
128. Paris, P. L., S. Sridharan, et al. 2008. *An oncogenic role for the multiple endocrine neoplasia type 1 gene in prostate cancer*. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **12**(2): 184-191.
129. Wuescher, L., K. Angevine, et al. 2011. *Insulin regulates menin expression, cytoplasmic localization, and interaction with FOXO1*. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **301**(3): E474-E483.
130. Mallya, S. M. and A. Arnold 2000. *Cyclin D1 in parathyroid disease*. *Frontiers in Bioscience* **5**: D367-D371.
131. Theillaumas, A., M. Blanc, et al. 2008. *Relation between menin expression and NF-kappaB activity in an intestinal cell line*. *Mol Cell Endocrinol* **291**(1-2): 109-115.

132. Oyama, T., K. Kashiwabara, et al. 1998. *Frequent Overexpression of the Cyclin D1 Oncogene in Invasive Lobular Carcinoma of the Breast*. *Cancer Research* **58**(13): 2876-2880, Jaroslav, P., H. Martina, et al. 2005. *Expression of cyclins D1, D2, and D3 and Ki-67 in Leukemia*. *Leuk Lymphoma* **46**(11): 1605-1612, Ott, M. M., J. Bartkova, et al. 1997. *Cyclin D1 Expression in Mantle Cell Lymphoma Is Accompanied by Downregulation of Cyclin D3 and Is Not Related to the Proliferative Activity*. *Blood* **90**(8): 3154-3159, Brizova, H., M. Kalinova, et al. 2010. *A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II α , and TPX2): an immunohistochemical correlation, testing, and optimizing for mantle cell lymphoma*. *Virchows Archiv* **456**(6): 671-679.
133. Aggarwal, P., M. D. Lessie, et al. 2007. *Nuclear accumulation of cyclin D1 during S phase inhibits Cul4-dependent Cdt1 proteolysis and triggers p53-dependent DNA rereplication*. *Genes & Development* **21**(22): 2908-2922.
134. Obara, T. and Y. Fujimoto 1991. *Diagnosis and treatment of patients with parathyroid carcinoma: an update and review*. *World J Surg* **15**(6): 738-744.
135. van der Walt, J. 2012. *Pathology of the parathyroid glands*. *Diagnostic Histopathology* **18**(6): 221-233.
136. Krebs, L. J., T. M. Shattuck, et al. 2005. *HRPT2 Mutational Analysis of Typical Sporadic Parathyroid Adenomas*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **90**(9): 5015-5017.
137. Gill, A. J., A. Clarkson, et al. 2006. *Loss of nuclear expression of parafibromin distinguishes parathyroid carcinomas and hyperparathyroidism-jaw tumor (HPT-JT) syndrome-related adenomas from sporadic parathyroid adenomas and hyperplasias*. *Am J Surg Pathol* **30**(9): 1140-1149.
138. Iwata, T., N. Mizusawa, et al. 2007. *Parafibromin tumor suppressor enhances cell growth in the cells expressing SV40 large T antigen*. *Oncogene* **26**(42): 6176-6183.
139. Takahashi, A., R. Tsutsumi, et al. 2011. *SHP2 tyrosine phosphatase converts parafibromin/Cdc73 from a tumor suppressor to an oncogenic driver*. *Mol Cell* **43**(1): 45-56.
140. Cetani, F., E. Ambrogini, et al. 2007. *Should parafibromin staining replace HRPT2 gene analysis as an additional tool for histologic diagnosis of parathyroid carcinoma?* *Eur J Endocrinol* **156**(5): 547-554.
141. Georgitsi, M. 2010. *MEN-4 and other multiple endocrine neoplasias due to cyclin-dependent kinase inhibitors (p27(Kip1) and p18(INK4C)) mutations*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **24**(3): 425-437.
142. Chu, I. M., L. Hengst, et al. 2008. *The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy*. *Nat Rev Cancer* **8**(4): 253-267.
143. Herman, J. G. 2005. *Epigenetic changes in cancer and preneoplasia*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**: 329-333.
144. Medina, R., S. K. Zaidi, et al. 2008. *MicroRNAs 221 and 222 Bypass Quiescence and Compromise Cell Survival*. *Cancer Research* **68**(8): 2773-2780.
145. Tokumoto, M., K. Tsuruya, et al. 2003. *Parathyroid cell growth in patients with advanced secondary hyperparathyroidism: vitamin D receptor and cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27*. *Nephrology Dialysis Transplantation* **18**(suppl 3): iii9-iii12.
146. Cheng, H.-T., J.-Y. Chen, et al. 2006. *Functional role of VDR in the activation of p27Kip1 by the VDR/Sp1 complex*. *Journal of Cellular Biochemistry* **98**(6): 1450-1456.
147. Arnold, A., M. F. Brown, et al. 1995. *Monoclonality of parathyroid tumors in chronic renal failure and in primary parathyroid hyperplasia*. *J Clin Invest* **95**(5): 2047-2053.
148. Akerstrom, G., J. Malmaeus, et al. 1984. *Histological changes in parathyroid glands in subclinical and clinical renal disease. An autopsy investigation*. *Scand J Urol Nephrol* **18**(1): 75-84, Fukuda, N., H. Tanaka, et al. 1993. *Decreased 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor density is associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients*. *J Clin Invest* **92**(3): 1436-1443.

149. Tominaga, Y., S. Kohara, et al. 1996. *Clonal analysis of nodular parathyroid hyperplasia in renal hyperparathyroidism*. World J Surg **20**(7): 744-750.

