

**Fatores de risco genético para adenomas  
hipofisários:  
Uma análise nacional, multicêntrica, genética e  
clínica**

**Leonor Isabel Mesquita Gaspar**

Tese para obtenção do Grau de Doutor em

**Biomedicina**

(3<sup>o</sup> ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos

Co-orientadora: Doutora Catarina Inês Nunes Pires Gonçalves

**Junho, 2025**



As provas de doutoramento (3º ciclo de estudos) no ramo de **Biomedicina** requeridas por **Leonor Isabel Mesquita Gaspar** foram realizadas no dia 4 de junho de 2025 na sala de atos da Reitoria da Universidade da Beira Interior, de modo presencial e por videoconferência.

A tese intitulada " Fatores de risco genético para adenomas hipofisários: Uma análise nacional, multicêntrica, genética e clínica" foi Aprovada com Distinção após deliberação do júri, constituído por:

**Presidente do júri:** Doutor Miguel Castelo-Branco Craveiro Sousa

**Membros do júri:**

Doutor João Pedro Rico de Oliveira Vinagre

Doutora Branca Maria Prudêncio Limón Cavaco

Doutor Pedro Miguel Sousa Marques

Doutora Sílvia Cristina da Cruz Marques Socorro

Doutor Cláudio Jorge Maia Baptista



## **Declaração de Integridade**

Eu, Leonor Isabel Mesquita Gaspar, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição D2686 de Biomedicina da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 23/10/2024

Leonor Isabel Mesquita Gaspar



**Para o meu filho Miguel.**



# Agradecimentos

Ao fim destes quatro anos de percurso académico, é inevitável pensar em todas as pessoas que se cruzaram no meu caminho, e contribuíram para que pudesse chegar a este momento.

Em primeiro lugar, gostaria de expressar o meu profundo agradecimento ao meu orientador, Professor Doutor Manuel Lemos, por me ter desafiado a concretizar este projeto, e manifestar-lhe a minha estima e respeito. Desde o início deste percurso que sempre me incutiu valores essenciais como rigor, profissionalismo, pensamento crítico, exigência, resiliência e autonomia. Valores estes, que lhe estão intrínsecos na sua personalidade e que contribuíram para a qualidade deste trabalho. Agradeço-lhe ainda pela sua disponibilidade, conhecimento transmitido e compreensão demonstrada em todos os momentos. Espero ter estado à altura das suas expectativas.

À minha co-orientadora e amiga Catarina Gonçalves. Para ti, não existem agradecimentos suficientes. Sempre me acompanhaste desde o primeiro ao último dia, com a tua disponibilidade, recetividade e alegria constante. Obrigada por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos, e por me incentivares a levantar a cabeça, seguir em frente e a tentar sempre fazer mais e melhor. Agradeço-te também todo o companheirismo e compreensão nos momentos mais difíceis destes anos. Ter o teu apoio incondicional foi a peça chave para que pudesse chegar até aqui. O meu profundo obrigado!

Agradeço a todos os médicos que participaram neste projeto através do envio de amostras dos doentes e dados clínicos: Ana Agapito (Lisboa), Ana Margarida Monteiro (Braga), Ana Palha (Lisboa), Bernardo Dias Pereira (Açores), Catarina Saraiva (Lisboa), Cláudia Amaral (Porto), Daniela Cavaco (Lisboa), Davide Carvalho (Porto), Ema Nobre (Lisboa), Fernando Fonseca (Lisboa), Hélder Simões (Lisboa), Henrique Vara Luiz (Lisboa), Inês Barros (Braga), Inês Damásio (Lisboa), Isabel Inácio (Porto), Joana Pereira (Lisboa), João Anselmo (Açores), João Sequeira Duarte (Lisboa), Luísa Cortez Lisboa, Maria João Bugalho (Lisboa), Maria Salomé (Lisboa), Mariana Barbosa (Braga), Olinda Marques (Braga), Rita Santos (Lisboa), Sara Donato (Lisboa), Sara Pinheiro (Lisboa), Sílvia Paredes (Braga), Teresa Martins (Coimbra), Teresa Rego (Lisboa), Tiago Silva (Lisboa), Valeriano Leite (Lisboa).

Agradeço às técnicas Sofia Duarte, Margarida Carrilho, Joana Tomás e Marina Posso pela disponibilidade e apoio sempre manifestado e pela vossa dedicação na manutenção do CICS-UBI, contribuindo assim para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço aos membros do grupo Hormonas & Metabolismo do CICS-UBI pelas discussões científicas mensais debruçadas nos mais variados temas que, assim, ajudaram a ampliar os meus horizontes.

À Josianne, minha colega de equipa e amiga. Jô, agradeço-te toda a amizade e entreaajuda que demonstraste para comigo, ao longo destes anos. Desde o início que sempre prezámos muito pelo respeito mútuo, e penso que foi isso que contribuiu para que, no culminar desta etapa, te considere uma das pessoas fulcrais deste percurso. Tenho a certeza que se não estivesses ao mesmo lado, o meu caminho teria sido mais tortuoso e difícil. Obrigada pelo teu companheirismo, apoio, motivação e disponibilidade demonstrada em todos os momentos. Muito obrigada por tudo Jô, não imaginas o quão valiosa foi a tua companhia.

Ao meu marido, Miguel. Não existem palavras para descrever o quão precioso tu és para mim, todos os dias. Começámos a namorar mais ou menos quando comecei a trabalhar neste projeto, por isso para ti foi um desafio duplo. Mas sempre conseguimos conciliar tudo. E isso só foi possível graças ao teu amor e paciência. Acompanhaste-me, sempre, desde o início. Suportaste-me nos meus momentos de fraqueza, nas minhas inseguranças e incertezas, e sempre o fizeste com muito amor. Sempre tiveste espaço e tempo para me ouvires e para me motivares: “Tu vais conseguir! Tu és forte!”. O teu apoio e colo constante são o meu pilar. Por isso, esta conquista também é tua. Que Deus permita que possamos conquistar mais etapas pessoais e profissionais, sempre lado a lado. Obrigada por tudo e por todo o amor que me fazes sentir, todos os dias.

Aos meus pais, Zé Nuno e Nanda. Pai e Mãe, lembro-me quando, no fim do mestrado, me diziam: “Vá, e que tal agora tirares o doutoramento?”. E eu, sempre muito opinativa, dizia que não estava nos meus planos. Pois é, os pais estão sempre certos... E quase sem dar pelo tempo passar, cheguei ao fim desta etapa. Agradeço-vos de coração, por me apoiarem todos os dias, em todas as ocasiões. Vocês fazem e dão mais do que imaginam. Tenho muito orgulho em vocês. Serão sempre o meu porto-seguro.

À minha irmã Hélia, por todas as nossas conversas e apoio ao longo da minha vida. Agradeço a Deus por te ter como minha irmã mais velha! Aos meus sobrinhos Henrique e Tomás e ao meu cunhado Luís. Agradeço-vos por estarem sempre do meu lado em todas as ocasiões e por todo o amor, carinho e ânimo demonstrado ao longo de toda a vida.

À minha restante família, e amigos, que me fortalecem todos os dias, e que me incentivam a ser a melhor versão de mim mesma.

# Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através da Bolsa de Doutoramento SFRH/BD/147160/2019 e dos projetos PTDC/MEC-MET/29489/2017 e UIDB/00709/2020.



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional





## Resumo

Os adenomas hipofisários representam, aproximadamente, 10-15% do total dos tumores intracranianos. A prevalência destes tumores foi estimada em 1:1000 na população geral, sendo mais frequentemente diagnosticados entre os 40-60 anos de idade. Estes tumores são monoclonais, tipicamente benignos e de crescimento lento, no entanto podem estar associados a um aumento da morbidade e mortalidade através da sobreprodução hormonal e dos efeitos de massa resultantes da compressão das estruturas adjacentes ao tumor. Os tumores hipofisários mais frequentes são os prolactinomas, seguido pelos adenomas hipofisários não funcionantes. Os mecanismos subjacentes à tumorigénese hipofisária não são ainda totalmente conhecidos, pelo que uma melhor compreensão desta questão ajudará a gerir a doença. O aumento do risco associado a mutações em genes como o *AIP*, *MEN1*, *CDKN1B* e *PRKAR1A*, fornece evidências de uma predisposição genética para adenomas hipofisários familiares. A grande maioria dos adenomas hipofisários (cerca de 95%) ocorre num contexto esporádico e na ausência de predisposição genética conhecida. No entanto, três polimorfismos (rs2359536, rs10763170 e rs17083838) foram significativamente associados a adenomas hipofisários esporádicos na população Chinesa Han.

O objetivo geral desta tese foi realizar um estudo de âmbito multicêntrico nacional, acerca dos fatores de risco genético para o desenvolvimento de adenomas hipofisários familiares e esporádicos, de forma a ampliar o conhecimento sobre a tumorigénese hipofisária.

Numa primeira fase desta tese, foi construída uma base de dados com todas as variantes germinativas identificadas no gene *AIP* publicadas em casos esporádicos e familiares de adenomas hipofisários, até à data, a nível mundial. Nesta revisão, foram identificadas e avaliadas, ao nível da sua patogenicidade, um total de 158 mutações germinativas entre 562 doentes com adenomas hipofisários esporádicos ou familiares. Estas variantes estavam localizadas em toda a região codificadora e nas regiões de *splicing* do gene *AIP*. A patogenicidade de todas as variantes germinativas publicadas foi categorizada de acordo com os critérios da *American College of Medical Genetic and Genomics* (ACMG), utilizando todos os dados disponíveis. Do número total de doentes, 35,4% apresentavam variantes patogénicas e 24,0% apresentavam variantes provavelmente patogénicas.

Na segunda fase desta tese foi determinada a frequência de mutações germinativas do gene *AIP* em doentes portugueses com macroadenomas hipofisários esporádicos de

início precoce. Para isso, foi sequenciado o gene *AIP* em 218 doentes com macroadenomas hipofisários esporádicos diagnosticados antes dos 40 anos. Foram identificadas variantes raras em heterozigotia neste gene em 18 (8,3%) doentes. No entanto, apenas quatro (1,8%) doentes apresentavam variantes patogénicas. Estas variantes compreendiam duas mutações já conhecidas (p.Arg81\* e p.Leu115Trpfs\*41) e duas mutações novas (p.Ser53Thrfs\*36, e p.Glu246\*). Estes quatro doentes tinham sido diagnosticados com somatotrofinoma em idades compreendidas entre os 14 e os 25 anos. A frequência de variantes patogénicas no gene *AIP* em doentes com idade inferior a 30 anos foi de 3,4% e com idade inferior a 18 anos foi de 5%, respetivamente. A frequência de mutações no gene *AIP* nesta coorte de doentes portugueses foi inferior à de outros estudos. A identificação de novas variantes no gene *AIP* expande o espetro das causas genéticas dos adenomas hipofisários e pode ajudar a compreender o papel das mutações neste gene nos mecanismos moleculares subjacentes à tumorigénese hipofisária.

A terceira fase desta tese consistiu em identificar mutações germinativas num conjunto específico de 29 genes, descritos na literatura como tendo mutações germinativas em doentes com adenomas hipofisários, numa coorte de doentes portugueses diagnosticados com adenomas hipofisários esporádicos de início precoce. Para isso, foi feita a sequenciação completa do exoma em 225 doentes com macroadenomas hipofisários esporádicos diagnosticados até aos 40 anos de idade. Foram identificadas 154 variantes raras em 25 dos 29 genes. Destas foram identificadas três variantes patogénicas e 13 variantes provavelmente patogénicas, nos genes *AIP*, *CDH23*, *MEN1*, *MSH2*, *PMS2*, *SDHB*, *TP53* e *VHL*, em 7,1% dos doentes. Nos doentes diagnosticados com idades inferiores a 30 e 18 anos, a frequência de mutações foi de 9,0% e 12%, respetivamente. Esta é, até à data, a maior análise multigénica de doentes com macroadenomas hipofisários esporádicos de início jovem. Confirmámos que o *AIP* é o gene mais frequentemente envolvido, mas também descobrimos causas genéticas mais raras de adenomas hipofisários, incluindo a primeira confirmação independente de um papel do gene *CDH23*.

Na última fase desta tese foi avaliada a associação de três polimorfismos comuns próximos dos genes *NEBL* (rs2359536), *PCDH15* (rs10763170) e *CDK8* (rs17083838) à suscetibilidade a adenomas hipofisários esporádicos na população portuguesa. Foram determinadas as frequências genotípicas e alélicas de 570 casos e 546 controlos. O alelo *minor* *CDK8* rs17083838 (alelo A) foi significativamente associado a adenomas hipofisários esporádicos. As variantes *NEBL* rs2359536 e *PCDH15* rs10763170 não foram associadas a risco geral para a doença, embora tenha sido observada uma associação significativa entre o alelo *minor* *PCDH15* rs10763170 (alelo T) e

somatotrofinomas. Estes resultados sugerem que a variante *CDK8* rs17083838, e possivelmente a variante *PCDH15* rs10763170, podem aumentar a suscetibilidade a adenomas hipofisários esporádicos na população portuguesa.

Concluindo, diferentes estratégias foram desenvolvidas e implementadas, ao longo desta tese, de forma a determinar quais os fatores de risco genético mais associados ao desenvolvimento de adenomas hipofisários esporádicos e familiares. Estes resultados são importantes sob o ponto de vista científico não só para uma melhor compreensão do panorama genético dos adenomas hipofisários, como também abrem portas para novas estratégias de rastreio genético direcionadas, oferecendo conhecimentos fundamentais para a gestão personalizada dos macroadenomas hipofisários de início precoce.

## **Palavras-chave**

Endocrinologia; Adenomas Hipofisários; Genética; Mutação; Hipófise



# Abstract

Pituitary adenomas account for approximately 10-15% of all intracranial tumors. The prevalence of these tumors has been estimated at 1:1000 in the general population, and they are most frequently diagnosed between the ages of 40 and 60. These tumors are monoclonal, typically benign and slow-growing, however they can be associated with increased morbidity and mortality through hormonal overproduction and mass effects resulting from the compression of structures adjacent to the tumor. The most common pituitary tumors are prolactinomas, followed by non-functioning pituitary adenomas. The mechanisms underlying pituitary tumorigenesis are not yet completely known, so a better understanding of this issue will help manage the disease. The increased risk associated with mutations in genes such as *AIP*, *MEN1*, *CDKN1B* and *PRKAR1A* provides evidence of a genetic predisposition to familial pituitary adenomas. The vast majority of pituitary adenomas (around 95%) occur in a sporadic context and in the absence of a known genetic predisposition. However, three polymorphisms (rs2359536, rs10763170 and rs17083838) were significantly associated with sporadic pituitary adenomas in the Han Chinese population.

The general aim of this thesis was to carry out a nationwide multicenter study on the genetic risk factors for the development of familial and sporadic pituitary adenomas, in order to expand the knowledge about pituitary tumorigenesis.

In the first phase of this thesis, a database was built with all the germline variants in the *AIP* gene in sporadic and familial cases of pituitary adenomas published to date. In this review, a total of 158 germline mutations were identified and assessed for pathogenicity among 562 patients with sporadic or familial pituitary adenomas. These variants were located in the entire coding region and in the splicing regions of the *AIP* gene, with more than 60 variants resulting in a deletion of the C-terminus region of the *AIP* protein. The pathogenicity of all published germline variants was categorized according to American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) criteria, using all available data. Of the total number of patients, 35.4% had pathogenic variants and 24.0% had probably pathogenic variants.

In the second phase of this thesis, the frequency of germline mutations in the *AIP* gene in Portuguese patients with early-onset sporadic pituitary macroadenomas was determined. To fulfill this, the *AIP* gene was sequenced in 218 patients with sporadic pituitary macroadenomas diagnosed before the age of 40. Rare heterozygous variants in this gene were identified in 18 (8.3%) patients. However, only four (1.8%) patients had

pathogenic variants. These variants included two known mutations (p.Arg81\* and p.Leu115Trpfs\*41) and two new mutations (p.Ser53Thrfs\*36, and p.Glu246\*). All four patients had been diagnosed with somatotrophinoma between the ages of 14 and 25. The frequency of pathogenic variants in the *AIP* gene in patients under the age of 30 was 3.4% and under the age of 18 was 5%, respectively. The frequency of mutations in the *AIP* gene in this cohort of Portuguese patients was lower than in other studies. The identification of new variants in the *AIP* gene expands the spectrum of genetic causes of pituitary adenomas and may help to understand the role of mutations in this gene in the molecular mechanisms underlying pituitary tumorigenesis.

The third phase of this thesis consisted of identifying germline mutations in a specific set of 29 genes, described in the literature as having germline mutations in patients with pituitary adenomas, in a cohort of Portuguese patients diagnosed with young onset sporadic pituitary adenomas. To this end, whole exome sequencing was carried out on 225 patients with sporadic pituitary macroadenomas diagnosed up to the age of 40. We identified 154 rare variants in 25 out of the 29 analyzed genes. These variants include three pathogenic and 13 likely pathogenic variants, in the *AIP*, *CDH23*, *MEN1*, *MSH2*, *PMS2*, *SDHB*, *TP53* and *VHL* genes, in 7.1% of patients. In patients diagnosed under the age of 30 and 18, the frequency of mutations was 9.0% and 12%, respectively. This is, to date, the largest multigenic analysis of patients with young onset sporadic pituitary macroadenomas. We confirmed that *AIP* is the most frequently involved gene, but we also discovered rarer genetic causes of pituitary adenomas, including the first independent confirmation of a role for the *CDH23* gene.

The last phase of this thesis assessed the association of three common polymorphisms close to the *NEBL* (rs2359536), *PCDH15* (rs10763170) and *CDK8* (rs17083838) genes with susceptibility to sporadic pituitary adenomas in the Portuguese population. The genotype and allele frequencies of 570 cases and 546 controls were determined. The *CDK8* rs17083838 minor allele (A allele) was significantly associated with sporadic pituitary adenomas. The *NEBL* rs2359536 and *PCDH15* rs10763170 variants were not associated with overall risk for the disease, although a significant association was observed between the *PCDH15* rs10763170 minor allele (T allele) and somatotrophinomas. These results suggest that the *CDK8* rs17083838 variant, and possibly the *PCDH15* rs10763170 variant, may increase susceptibility to sporadic pituitary adenomas in the Portuguese population.

In conclusion, different strategies were developed and implemented throughout this thesis in order to determine which genetic risk factors are most associated with the

development of sporadic and familial pituitary adenomas. These results are important from a scientific point of view not only for a better understanding of the genetic landscape of pituitary adenomas, but also open the door to new targeted genetic screening strategies, offering fundamental knowledge for the personalized management of young onset pituitary macroadenomas.

## **Keywords**

Endocrinology; Pituitary adenomas; Genetics; Mutation; Pituitary



# Índice

<b>Resumo</b> .....	<b>xi</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xv</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>xxiii</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xxv</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Hipófise ou Glândula Hipofisária.....	3
1.1.1 Anatomia, Fisiologia e Embriologia da hipófise.....	3
1.1.1.1 Adenohipófise.....	4
1.1.1.2 Neurohipófise.....	7
1.1.2 Adenomas Hipofisários.....	8
1.2 Fatores de risco genético em adenomas hipofisários.....	11
1.2.1 Principais genes, descritos na literatura, com mutações germinativas e mosaicismos associados a adenomas hipofisários.....	16
1.2.1.1 Gene <i>AIP</i> .....	16
1.2.1.2 Gene <i>CABLES1</i> .....	18
1.2.1.3 Gene <i>CDH23</i> .....	19
1.2.1.4 Genes <i>CDKN1A</i> , <i>CDKN1B</i> , <i>CDKN2B</i> e <i>CDKN2C</i> .....	20
1.2.1.5 Gene <i>DICER1</i> .....	22
1.2.1.6 Gene <i>GNAS</i> .....	23
1.2.1.7 Gene <i>GPR101</i> .....	23
1.2.1.8 Gene <i>MAX</i> .....	24
1.2.1.9 Gene <i>MEN1</i> .....	24
1.2.1.10 Genes <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i> .....	26
1.2.1.11 Gene <i>NF1</i> .....	26
1.2.1.12 Genes <i>PRKAR1A</i> , <i>PRKACA</i> e <i>PRKACB</i> .....	27
1.2.1.13 Gene <i>RET</i> .....	29
1.2.1.14 Genes <i>SDHA</i> , <i>SDHB</i> , <i>SDHC</i> , <i>SDHD</i> e <i>SDHAF2</i> .....	30
1.2.1.15 Gene <i>TP53</i> .....	31

1.2.1.16 Gene <i>USP8</i> .....	31
1.2.1.17 Gene <i>VHL</i> .....	32
1.2.3 Polimorfismos de suscetibilidade genética.....	33
1.3 Objetivos da tese.....	34
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>35</b>
2.1 Estudo 1 - Construção de uma base de dados de variantes germinativas no gene <i>AIP</i> , identificadas na literatura, em doentes com adenomas hipofisários esporádicos e familiares.....	37
2.1.1 Pesquisa Bibliográfica .....	37
2.1.2 Critérios de patogenicidade .....	37
2.1.3 Análise estatística .....	38
2.2 Estudo 2 – Estudo da prevalência de mutações no gene <i>AIP</i> em doentes portugueses jovens com macroadenomas hipofisários esporádicos.....	39
2.2.1 Doentes.....	39
2.2.2 Extração e purificação do DNA a partir de sangue periférico .....	40
2.2.3 Reação de polimerização em cadeia.....	41
2.2.4 Sequenciação de Sanger .....	42
2.2.5 Critérios de patogenicidade.....	43
2.2.6 Clonagem com o vetor pJET1.2/blunt .....	44
2.3 Estudo 3 - Identificação de mutações germinativas em doentes portugueses com macroadenomas hipofisários esporádicos de início precoce, através da análise de um painel multigénico .....	47
2.3.1 Doentes.....	47
2.3.2 Sequenciação completa do exoma.....	48
2.3.3 Seleção de genes para identificação de variantes .....	49
2.3.4 Critérios de patogenicidade.....	49
2.4 Estudo 4 – Estudo de associação genética caso-controlo .....	51
2.4.1 Doentes.....	51
2.4.2 Genotipagem .....	52
2.4.3 Análise Estatística .....	53
<b>3. Resultados.....</b>	<b>55</b>

3.1 Estudo 1 - Construção de uma base de dados de variantes germinativas no gene <i>AIP</i> , identificadas na literatura, em doentes com adenomas hipofisários esporádicos e familiares.....	57
3.1.1 Atualização da base de dados de variantes germinativas no gene <i>AIP</i> .....	57
3.1.2 Patogenicidade das variantes germinativas no gene <i>AIP</i> .....	57
3.2 Estudo 2 – Estudo da prevalência de mutações no gene <i>AIP</i> em doentes portugueses com macroadenomas hipofisários esporádicos.....	61
3.2.1 Descobertas genéticas .....	61
3.2.2 Características clínicas dos doentes com mutações <i>AIP</i> .....	64
3.3 Estudo 3 - Identificação de mutações germinativas em doentes portugueses com macroadenomas hipofisários esporádicos de início precoce, através da análise de um painel multigénico .....	69
3.3.1 Variantes raras identificadas nos 29 genes analisados .....	69
3.3.2 Variantes patogénicas e provavelmente patogénicas.....	69
3.3.3 Prevalência de mutações de acordo com a idade do diagnóstico.....	73
3.3.4 Características clínicas dos doentes com mutações patogénicas ou provavelmente patogénicas .....	73
3.4 Estudo 4 – Estudo de associação genética caso-controlo.....	81
<b>4. Discussão.....</b>	<b>83</b>
4.1 Estudo 1 - Construção de uma base de dados de variantes germinativas no gene <i>AIP</i> , identificadas na literatura, em doentes com adenomas hipofisários esporádicos e familiares.....	85
4.2 Estudo 2 – Estudo da prevalência de mutações no gene <i>AIP</i> em doentes portugueses com macroadenomas hipofisários esporádicos.....	89
4.3 Estudo 3 - Identificação de mutações germinativas em doentes portugueses com macroadenomas hipofisários esporádicos de início precoce, através da análise de um painel multigénico .....	93
4.4 Estudo 4 – Estudo de associação genética caso-controlo .....	99
<b>5. Conclusões e perspetivas futuras .....</b>	<b>101</b>
<b>6. Referências bibliográficas.....</b>	<b>105</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>147</b>
Anexo 1 – Permissão de utilização de figura.....	149
Anexo 2 – “Low frequency of <i>AIP</i> mutations in patients with young-onset sporadic	

pituitary macroadenomas” .....	153
Anexo 3 – Descrição clínica dos doentes .....	163
Anexo 4– Primers usados para PCR e Sequenciação de Sanger .....	181
Anexo 5 – Vetor de clonagem pJET1.2/blunt .....	183
Anexo 6 – “A Common Variant in the <i>CDK8</i> Gene Is Associated with Sporadic Pituitary Adenomas in the Portuguese Population: A Case-Control Study” .....	185
Anexo 7 – Sequência das sondas TaqMan .....	193
Anexo 8– Base de dados de variantes identificadas no gene <i>AIP</i> em doentes com adenomas hipofisários, principais características clínicas/demográficas associadas e classificação ACMG.....	195
Anexo 9 – Variantes raras identificadas em doentes com macroadenomas hipofisários esporádicos de início jovem .....	231
Anexo 10 – Breve <i>Curriculum vitae</i> .....	243

# Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Localização da glândula hipofisária .....	3
<b>Figura 2.</b> Desenvolvimento da glândula hipofisária .....	5
<b>Figura 3.</b> Produção e secreção de hormonas por parte da adenohipófise.....	6
<b>Figura 4.</b> Comunicação entre o hipotálamo e a neurohipófise .....	8
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do complexo proteico entre AIP e AhR .....	17
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática da inibição do complexo ciclina E/CDK2, pela ligação da p27, resultando numa fosforilação reduzida da pRb.....	21
<b>Figura 7.</b> Ilustração do mecanismo de processamento de miRNA precursores em miRNA funcionais .....	22
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática do mecanismo de ação da PKA .....	28
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do complexo SDH .....	30
<b>Figura 10.</b> Ligação da proteína VHL (pVHL) ao complexo E3 ubiquitinase ligase, constituído pela Elongina B (B), Elongina C (C) e Culina-2 (Cul-2), formando o complexo VBC-Cul2.....	32
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática do gene <i>AIP</i> e das variantes patogénicas e provavelmente patogénicas mais frequentemente encontradas neste gene em doentes com adenomas da hipófise .....	58
<b>Figura 12.</b> Mutações <i>AIP</i> identificadas em doentes.....	64
<b>Figura 13.</b> Localização das mutações identificadas no gene <i>AIP</i> no nível da proteína.....	64
<b>Figura 14.</b> Variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas identificadas em doentes, nos genes <i>AIP</i> , <i>CDH23</i> , <i>MEN1</i> , <i>MSH2</i> , <i>PMS2</i> , <i>SDHB</i> , <i>VHL</i> e <i>TP53</i> .....	72



# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Visão geral dos principais genes descritos na literatura, com mutações germinativas e mosaicismos associados a adenomas hipofisários.....	13
<b>Tabela 2A.</b> Variantes patogénicas e provavelmente patogénicas na linha germinativa do <i>AIP</i> que ocorrem em mais de 1,5% do total de 291 casos esporádicos. ....	59
<b>Tabela 3.</b> Análise estatística de variantes patogénicas e provavelmente patogénicas truncadoras e não truncadoras entre casos esporádicos e familiares. ....	60
<b>Tabela 4.</b> Características clínicas e genéticas de doentes com variantes raras no gene <i>AIP</i> .....	62
<b>Tabela 5.</b> Características clínicas e genéticas dos doentes com variantes patogénicas e provavelmente patogénicas raras.....	70
<b>Tabela 6.</b> Distribuição dos genótipos e alelos <i>NEBL</i> , <i>PCDH115</i> e <i>CDK8</i> em adenomas hipofisários esporádicos e controlos .....	81
<b>Tabela 7.</b> Distribuição de genótipos e alelos <i>PCDH15</i> em somatotrofinomas e todos os outros tipos de adenomas. ....	82
<b>Tabela 8.</b> Distribuição de combinações de alelos menores (de risco).....	82



# Lista de Abreviaturas

3PA	Associação 3P ( <i>Phaeochromocytoma, Paraganglioma and Pituitary adenoma Association</i> )
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica ( <i>Adrenocorticotropic Hormone</i> )
ADH	Hormona antidiurética ( <i>Antidiuretic Hormone</i> )
AhR	Recetor aril-hidrocarbono ( <i>Aryl-hydrocarbon Receptor</i> )
AIC	Critério de Informação de Akaike ( <i>Akaike Information Criterion</i> )
AIP	Proteína de interação do recetor de aril-hidrocarbono ( <i>Aryl-Hydrocarbon Receptor Interacting Protein</i> )
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica ( <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> )
ARNT	Proteína translocadora do AhR ( <i>Aryl-hydrocarbon Nuclear Translocator</i> )
B	Variante Benigna ( <i>Benign</i> )
CDH23	Proteína caderina 23 ( <i>Cadherin Related 23</i> )
CDK	Cinase dependente de ciclina ( <i>Cyclin-Dependent Kinase</i> )
CDK3	Cinase dependente de ciclina-3 ( <i>Cyclin-Dependent Kinase-3</i> )
CDK8	Cinase dependente de ciclina-8 ( <i>Cyclin Dependent Kinase-8</i> )
CDKIs	Inibidores da cinase dependente de ciclina ( <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors</i> )
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar ( <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> )
CNVs	Variações de número de cópias ( <i>Copy number variations</i> )
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPc ( <i>cAMP Responsive Element Binding protein</i> )
CRH	Hormona libertadora de corticotrofina ( <i>Corticotropin-Releasing Hormone</i> )
ddNTP	Didesoxinucleótido trifosfato ( <i>Didesoxynucleotide triphosphate</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato ( <i>Deoxynucleotide triphosphate</i> )
DP	Desvio padrão
<i>E. coli.</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFR	Recetor do fator de crescimento epitelial ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
FIPA	Adenomas Hipofisários Familiares Isolados ( <i>Familial Isolated Pituitary Adenomas</i> )
FKBP	Proteína de ligação a FK506 ( <i>FK506-binding proteins</i> )

FSH	Hormona folículo-estimulante ( <i>Follicle-Stimulating Hormone</i> )
FT3	Triiodotironina livre ( <i>Free T3</i> )
FT4	Tiroxina livre ( <i>Free T4</i> )
GH	Hormona de crescimento ( <i>Growth Hormone</i> )
GHRH	Hormona libertadora da hormona do crescimento ( <i>Growth Hormone–Releasing Hormone</i> )
gnomAD	Base de Dados de Agregação do Genoma ( <i>Genome Aggregation Database</i> )
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofina ( <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i> )
Gsa	Subunidade $\alpha$ da proteína G
GWAS	Estudo de associação genómica ampla ( <i>Genome-Wide Association Study</i> )
HGMD	Base de Dados de Mutações do Genoma Humano ( <i>Human Gene Mutation Database</i> )
HIF $\alpha$	Subunidade $\alpha$ do fator de transcrição induzido pela hipoxia ( <i>Hypoxia-induced transcription factor alpha</i> )
Hsp90	Proteína de choque térmico 90 ( <i>Heat Shock Protein 90</i> )
IC	Intervalo de Confiança
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 ( <i>Insulin-like Growth Factor 1</i> )
InDels	Inserções e Deleções ( <i>Insertion/Deletion</i> )
LB	Variante Provavelmente Benigna ( <i>Likely Benign</i> )
LH	Hormona luteinizante ( <i>Luteinizing Hormone</i> )
LP	Variante Provavelmente Patogénica ( <i>Likely Pathogenic</i> )
MAF	Frequência de alelo menor ( <i>Minor allele frequency</i> )
MEN1	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 ( <i>Multiple endocrine neoplasia type 1</i> )
MEN2	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2 ( <i>Multiple endocrine neoplasia type 2</i> )
MEN4	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 4 ( <i>Multiple endocrine neoplasia type 4</i> )
miRNAs	Micro-ARNs ( <i>micro-RNA</i> )
MLPA	Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação ( <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> )
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro ( <i>Messenger ribonucleic acid</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology and Information</i>
NF1	Neurofibromatose tipo 1
NFPA	Adenomas hipofisários não-funcionantes ( <i>Non-Functioning Pituitary Adenomas</i> )
NGS	Sequenciação de Nova Geração ( <i>Next Generation Sequencing</i> )
OR	Razão de probabilidade ( <i>Odds Ratio</i> )

P	Variante Patogénica ( <i>Pathogenic</i> )
PCDH15	Protocaderina 15 ( <i>Protocadherin Related 15</i> )
PCR	Reação de polimerização em cadeia ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PKA	Proteína cinase A ( <i>Protein Kinase A</i> )
POMC	Pró-opiomelanocortina
PPGL	Paragangliomas e feocromocitomas ( <i>pheochromocytomas and paragangliomas</i> )
PPIase	Domínio peptidil-prolil cis/trans isomerase ( <i>peptidyl-prolyl cis/trans isomerase</i> )
pRb	Proteína retinoblastoma
PRL	Prolactina
pVHL	Proteína Von Hippel-Lindau
RBC	Glóbulos vermelhos ( <i>Red blood cell</i> )
R $\alpha$	Subunidade reguladora 1- $\alpha$ da PKA ( <i>Regulatory Subunit 1-alpha of PKA</i> )
RM	Ressonância magnética
SDH	Succinato desidrogenase
SDS	Dodecil sulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
SE	Extração secundária ( <i>Secondary extraction</i> )
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
SS	Somatostatina
TAC	Tomografia axial computadorizada
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Ácido etilenodiamino tetra-acético de tris (TRIS-EDTA)
TOTG	Teste oral de tolerância à glucose
TPR	Domínios de repetição de tetratricopeptídeo ( <i>Tetratricopeptide Repeat</i> )
TRH	Hormona libertadora de tirotrófina ( <i>Thyrotropin-Releasing Hormone</i> )
TSH	Hormona tireoestimulante ( <i>Thyroid Stimulating Hormone</i> )
VR	Valor de referência
VUS	Variante de Significado Indeterminado ( <i>Variant of Uncertain Significance</i> )
WES	Sequenciação de exoma completo ( <i>Whole Exome Sequencing</i> )
WGS	Sequenciação de genoma completo ( <i>Whole Genome Sequencing</i> )



# 1. Introdução



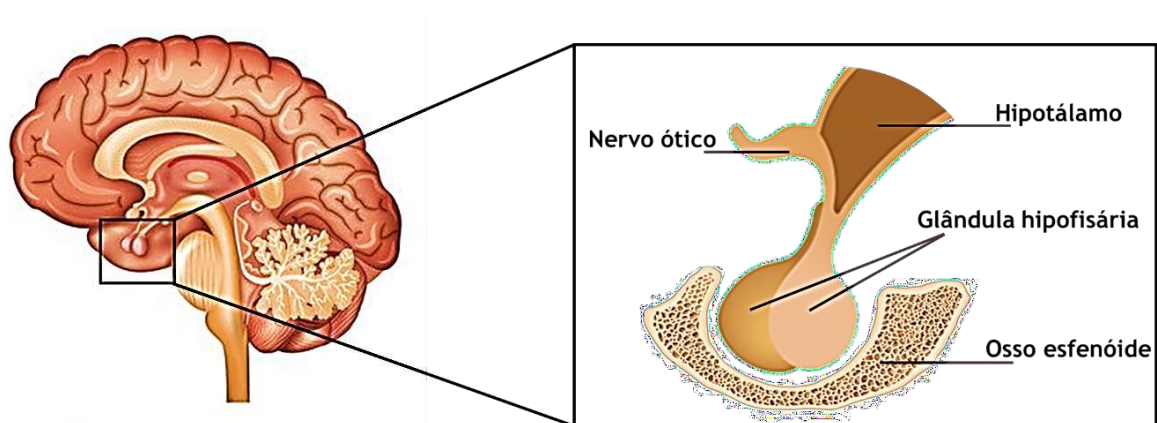
## 1. Introdução

## 1.1 Hipófise ou Glândula Hipofisária

### 1.1.1 Anatomia, Fisiologia e Embriologia da hipófise

A glândula hipofisária, ou pituitária, é composta por células endócrinas, e tem como papel principal regular numerosos processos fisiológicos através da secreção de diversas hormonas.

O termo hipófise, em inglês *pituitary*, deriva do Grego *ptuo* e do Latim *pituita* que significa “muco” ou “viscoso” (1, 2). A hipófise é um pequeno órgão oval, bilateralmente simétrico, situado na sela turca do osso esfenóide, uma cavidade óssea na base do crânio, próxima do hipotálamo e do nervo ótico (Figura 1) (3, 4, 5).



**Figura 1.** Localização da glândula hipofisária. Situa-se na sela turca do osso esfenóide, abaixo do nervo ótico e do hipotálamo. Reproduzido com permissão de Galván *et al.* (5) (Anexo 1).

A irrigação sanguínea desta glândula é feita através das artérias carótidas que percorrem os seios cavernosos adjacentes (6). Num adulto, a hipófise pesa aproximadamente 500-600 mg e mede cerca de 10 mm de comprimento, 5-10 mm de altura e 10-15 mm de largura, no entanto, com o avanço da idade, o peso da glândula hipofisária tende a diminuir (3, 4). Nas mulheres, a hipófise é ligeiramente maior, especialmente durante a gravidez e fase de amamentação. Após este período, o tamanho da hipófise regride embora não na sua totalidade, podendo atingir mais de 1000 mg em algumas mulheres (4).

A hipófise encontra-se dividida em duas partes anatômica e funcionalmente distintas: o lobo posterior denominado neurohipófise e o lobo anterior denominado adenohipófise (1, 2, 4, 7). A neurohipófise é composta pela *pars nervosa* e é uma extensão do hipotálamo, e a adenohipófise é composta por três estruturas, a *pars distalis*,

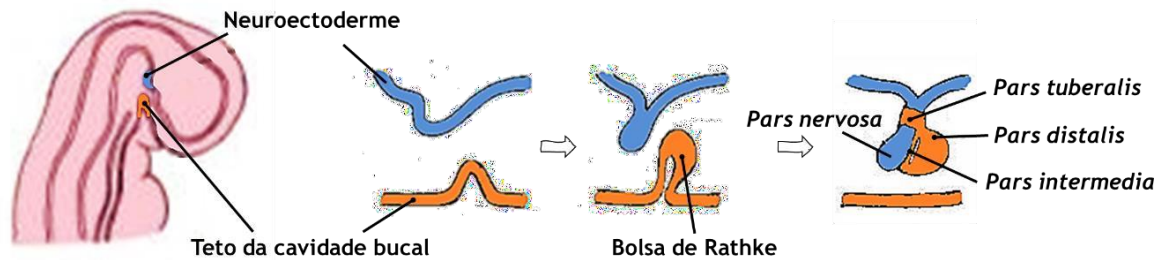
## 1. Introdução

a *pars intermedia* e a *pars tuberalis* (1, 2). A neuro e a adenohipófise secretam hormonas que são essenciais para a sobrevivência do ser humano (2).

### 1.1.1.1 Adenohipófise

A adenohipófise compreende aproximadamente 80% de toda a glândula hipofisária e, contrariamente à neurohipófise, não apresenta conexões neuronais com o hipotálamo. Desta forma, é responsável pela síntese da maioria das hormonas que são libertadas para a corrente sanguínea, sendo a secreção regulada pelo hipotálamo (4, 8). Assim, o hipotálamo controla a atividade secretora da adenohipófise, e esta controla a atividade secretora das glândulas tiróide, suprarrenais e gónadas (8). As seis hormonas mais importantes produzidas pela adenohipófise são a hormona de crescimento (GH, *Growth Hormone*), prolactina (PRL), hormona adrenocorticotrófica (ACTH, *Adrenocorticotropic Hormone*), hormona tireoestimulante ou tireotrofina (TSH, *Thyroid Stimulating Hormone*), hormona luteinizante (LH, *Luteinizing Hormone*) e a hormona folículo-estimulante (FSH, *Follicle-Stimulating Hormone*), produzidas por pelos menos cinco tipos de células diferentes, designadas de acordo com a hormona que produzem (4).

A adenohipófise começa a desenvolver-se durante a quarta semana de gestação a partir do tecido embrionário do epitélio oral, compreendendo três regiões: a *pars distalis*, a *pars intermedia* e a *pars tuberalis* (8). Inicialmente, um divertículo, denominado bolsa hipofisária ou bolsa de Rathke, surge do teto da cavidade bucal do embrião e estende-se para a região cefálica (2, 3, 4). Este alongamento da bolsa de Rathke faz com que esta se aproxime do infundíbulo, uma extensão da base do diencéfalo, sendo possível a conexão entre ambos no decorrer da quinta semana de gestação e desintegrando-se na sexta semana (2). As células da parte anterior da bolsa de Rathke proliferam e dão origem à *pars distalis*, e as células da parte posterior dão origem à *pars intermedia* que possui paredes finas (9). Por fim, uma extensão da bolsa de Rathke estende-se à volta do infundíbulo, formando a *pars tuberalis* que liga anatomicamente a *pars distalis* ao hipotálamo (2, 9). A *pars intermedia*, por sua vez, forma a separação entre os lobos anterior e posterior da hipófise, regride durante a infância e dissipa-se na idade adulta (Figura 2) (9, 10).



**Figura 2.** Desenvolvimento da glândula hipofisária entre a quarta e a sexta semana de gestação, que resulta da união entre a neuroectoderme (representada a azul) e a bolsa de Rathke derivada do teto da cavidade bucal do embrião (representada a laranja).

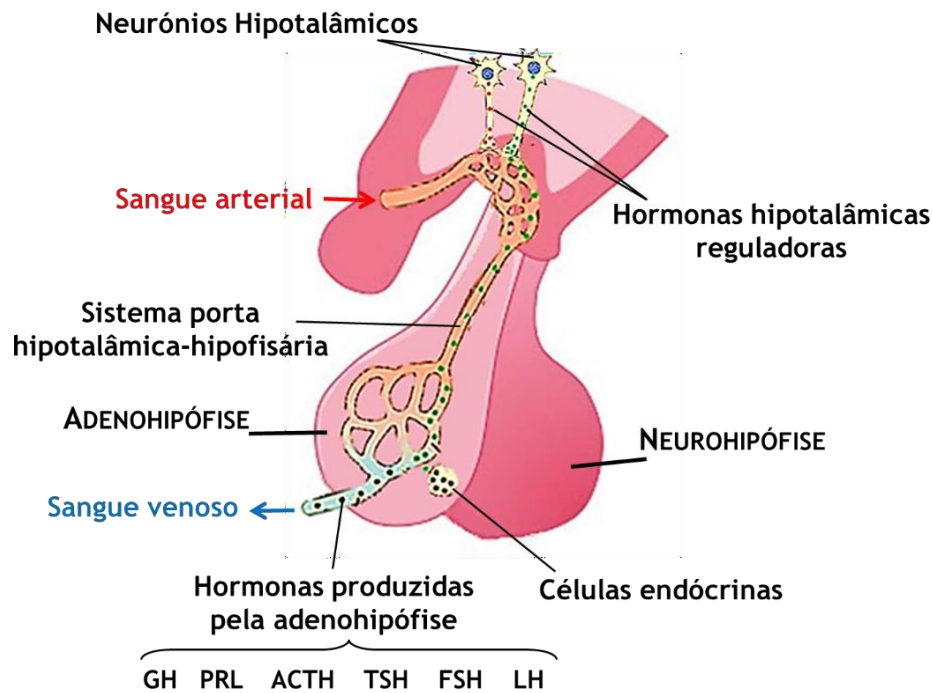
A *pars distalis* é composta principalmente por cinco tipos de células endócrinas: somatotrofos, corticotrofos, tireotrofos, lactotrofos e gonadotrofos, cada um designado de acordo com a hormona que produzem (2, 4, 9, 11). As células endócrinas são estimuladas ou inibidas pelo hipotálamo, para que haja uma correta regulação da secreção hormonal. Assim, as células corticotróficas produzem ACTH, as tireotróficas produzem TSH, as gonadotróficas produzem a FSH e LH, as somatotróficas produzem a GH e as lactotróficas produzem PRL (12). Os diferentes tipos celulares encontram-se agrupados e cada um tem a sua posição específica na glândula hipofisária; os corticotrofos e tireotrofos localizam-se predominantemente no centro da adenohipófise enquanto que os somatotrofos e lactotrofos localizam-se predominantemente nas zonas laterais (12).

A secreção de hormonas pelas células da adenohipófise é controlada por hormonas hipotalâmicas reguladoras, libertadas pelos neurónios hipotalâmicos, que chegam à hipófise anterior através da circulação porta hipotalâmica-hipofisária (13, 14). Por outro lado, o hipotálamo pode também secretar fatores de inibição que enviam sinais à *pars distalis* de modo a inibir a secreção hormonal (13). As hormonas hipotalâmicas são designadas de acordo com a hormona específica que inibem ou induzem (2). Assim, a hormona libertadora de corticotrofina (CRH, *Corticotropin-Releasing Hormone*) estimula a secreção da ACTH, a hormona libertadora de tirotrofina (TRH, *Thyrotropin-Releasing Hormone*) estimula a secreção da TSH, a hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH, *Gonadotropin-Releasing Hormone*) estimula a secreção da LH e FSH, a hormona libertadora da hormona do crescimento (GHRH, *Growth Hormone*–

## 1. Introdução

*Releasing Hormone*) estimula a secreção da GH, a somatostatina (SS) inibe a secreção de GH, e a dopamina inibe a secreção de PRL (2, 8).

Após a estimulação pelas hormonas hipotalâmicas, a adenohipófise é responsável pela secreção de várias hormonas que, conseqüentemente, irão interagir com o seu recetor específico, de forma a causar uma alteração no tecido ou célula-alvo (Figura 3) (9, 15).



**Figura 3.** Produção e secreção de hormonas por parte da adenohipófise. A secreção das hormonas produzidas pela adenohipófise é controlada por hormonas hipotalâmicas reguladoras, libertadas pelos neurónios hipotalâmicos para o sistema porta hipotalâmica-hipofisária. Após a estimulação pelas hormonas hipotalâmicas reguladoras, as células endócrinas da adenohipófise são responsáveis pela secreção de várias hormonas que causam uma alteração no tecido ou célula-alvo. ACTH, hormona adrenocorticotrófica; FSH, hormona foliculo-estimulante; GH, hormona de crescimento; LH, hormona luteinizante; PRL, prolactina; TSH, hormona tireoestimulante.

Deste modo, a GH vai ser responsável pelo crescimento e diferenciação óssea e muscular; a PRL atua nas glândulas mamárias ao nível da produção de leite materno; a ACTH atua nas glândulas suprarrenais com produção de hormonas como o cortisol e androgénios e a FSH e LH atuam na produção de hormonas pelas gónadas (testículos e ovários), nomeadamente a testosterona, progesterona e estradiol (8). A função de cada uma destas hormonas está dependente do estado de maturação do indivíduo e de fatores de stress e ambientais. Por exemplo, no feto e no recém-nascido, o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1, *Insulin-like growth factor 1*) é o estímulo primário

para o crescimento, uma vez que medeia os efeitos promotores do crescimento. Após o nascimento, a GH torna-se o regulador primário do crescimento e a sua secreção é estimulada pela GHRH (9).

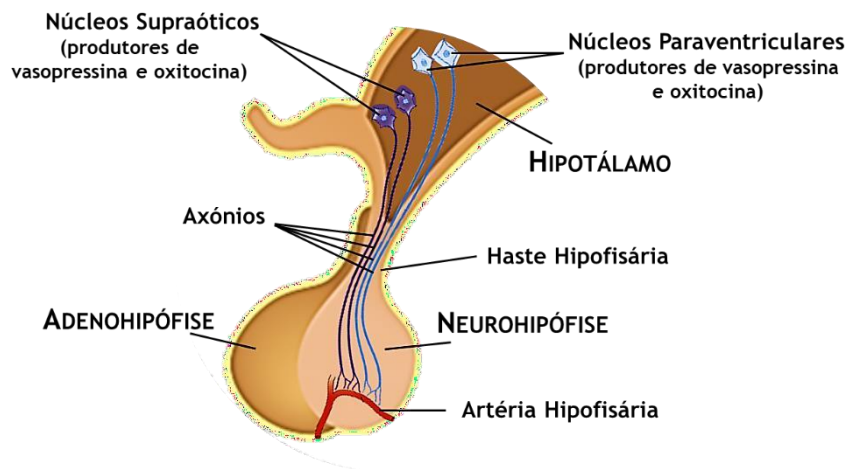
### **1.1.1.2 Neurohipófise**

A neurohipófise, também designada por hipófise posterior, tem origem neuronal na neuroectoderme do diencéfalo, e compreende o infundíbulo, a haste hipofisária e a *pars nervosa* (2, 4). A neurohipófise evolui durante a quinta e a sexta semana de gestação, no entanto não consegue produzir hormonas por si própria (2). Existem neurónios cujas terminações nervosas (axónios) se estendem desde a parte inferior do hipotálamo, pelo infundíbulo, até à neurohipófise, formando assim um grande feixe que dá origem à haste hipofisária (2). Estes neurónios fornecem uma comunicação direta entre o hipotálamo e a neurohipófise (2, 7, 9), e controlam a produção das hormonas oxitocina e vasopressina (hormona antidiurética – ADH, *Antidiuretic Hormone*), que por sua vez vão ser transportadas, através da haste hipofisária, para a hipófise posterior (2, 3, 4, 7).

O eixo hipotálamo-hipófise é uma interação funcional entre o hipotálamo e a hipófise que se estabelece para que o estado de homeostasia seja mantido, uma vez que integra tanto as ligações nervosas que se estabelecem entre o hipotálamo e a neurohipófise, como também controla as secreções de hormonas hipotalâmicas que atingem a hipófise anterior através da circulação porta hipotalâmica-hipofisária (2).

As hormonas da neurohipófise, denominadas neuro-hormonas, sintetizadas nos núcleos supraópticos e nos núcleos paraventriculares do hipotálamo, são ligadas a neurofisinas e transportadas através das fibras nervosas para o lobo posterior, onde são armazenadas nos grânulos neurosecretores até que possam ser libertadas para a corrente sanguínea (Figura 4) (4, 16).

## 1. Introdução



**Figura 4.** Comunicação entre o hipotálamo e a neurohipófise. Os neurónios produtores de oxitocina e vasopressina estão localizados nos núcleos supraóxicos e paraventriculares do hipotálamo. Os axónios desses neurónios estendem-se ao longo da haste hipofisária, terminando ao longo dos vasos sanguíneos no lobo posterior da hipófise. As hormonas produzidas são armazenadas nos terminais dos axónios da neurohipófise, onde posteriormente são libertadas para a circulação sanguínea mediante estimulação neuronal.

### 1.1.2 Adenomas Hipofisários

Os adenomas hipofisários representam, aproximadamente, 10-15% do total dos tumores intracranianos, sendo os mais frequentes (17, 18). Estes adenomas são monoclonais, tipicamente benignos e de crescimento lento, e surgem das células da adenohipófise (19, 20, 21).

Dados epidemiológicos anteriores a 1969 indicam que estes tumores tinham uma prevalência de 1,85 por 100.000 habitantes (22). Mais recentemente, vários estudos mostraram que a incidência anual aumentou para 1 caso por 1000 habitantes (23, 24, 25). Este aumento do número de casos pode ser resultado de uma maior consciencialização da população em relação a estes tumores, e do desenvolvimento das técnicas de diagnóstico por imagem e hormonais (26). O avanço das técnicas de imagiologia, permitiu o aumento da deteção de incidentalomas hipofisários (adenomas hipofisários detetados acidentalmente) (27), mostrando uma prevalência de 14-22% em voluntários saudáveis, com uma maior predominância de microadenomas (28, 29, 30, 31). A incidência dos adenomas hipofisários varia muito de acordo com a idade e sexo, no entanto, sabe-se que aumenta com o avançar da idade (23, 24, 32), assim são mais frequentemente diagnosticados entre os 40-60 anos de idade (33, 34).

Embora sejam classificados como benignos devido à sua rara capacidade de metastizar, os adenomas hipofisários estão associados ao aumento da morbidade e mortalidade devido a alterações metabólicas consequentes da sua possível hipersecreção hormonal e a efeitos de massa resultantes da compressão de estruturas adjacentes ao tumor (3, 24, 35, 36, 37, 38). O diagnóstico precoce e o encaminhamento dos doentes para centros de referência são meios importantes para melhorar a qualidade de vida dos doentes (24).

Os adenomas hipofisários são classificados de acordo com o seu tamanho, sendo divididos em microadenomas (<10mm), macroadenomas (≥10mm) e adenomas gigantes (>40mm) (28, 29, 30, 39). Esta classificação pode ser complementada por ensaios mais abrangentes baseados em imunohistoquímica e microscopia eletrónica (29, 39). São ainda classificados como funcionantes ou não-funcionantes, com base na sua capacidade de produzir e secretar hormonas (29). Desta forma podem desenvolver um amplo espectro de síndromes clínicas, incluindo endócrinas, cardiovasculares, neurológicas, oftalmológicas, exigindo assim uma necessidade de acompanhamento multidisciplinar por diferentes especialidades. O diagnóstico precoce é muito importante para estabelecer um plano terapêutico adequado e obter um melhor prognóstico para estes doentes (33). Os adenomas funcionantes apresentam sintomas clínicos específicos e proeminentes, consequentes do aumento da secreção e atividade hormonal (17). O tumor hipofisário funcionante mais frequente é o prolactinoma, representando cerca de 46-66% de todos os adenomas hipofisários, seguindo-se pelos adenomas hipofisários clinicamente não-funcionantes (NFPA, *Non-Functioning Pituitary Adenomas*) (14-37%), somatotrofinomas (9-16%) e corticotrofinomas (1-6%). Os gonadotrofinomas, tumores hipofisários secretores de LH e FSH, e os tireotrofinomas, secretores de TSH, são mais raros (23, 24, 32, 40).

Os prolactinomas, adenomas secretores de prolactina, aumentam os níveis de prolactina circulante que consequentemente suprimem o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, resultando em hipogonadismo, amenorreia nas mulheres e diminuição de libido e impotência nos homens (21). A dopamina é a principal hormona inibidora de prolactina, ligando-se aos recetores de dopamina nos lactotrofos. Assim, o tratamento de primeira linha dos prolactinomas depende de agonistas da dopamina, sendo a bromocriptina e a cabergolina os mais frequentemente usados (41, 42). Outras condições podem igualmente aumentar os níveis de prolactina, tais como gravidez, hipotireoidismo e insuficiência renal (30), no entanto, uma das causas mais frequentes para este aumento recai sobre o uso de alguns fármacos nomeadamente, antipsicóticos, antidepressivos, anti-hipertensivos e opiáceos (43).

## 1. Introdução

Os somatotrofinomas, adenomas hipofisários secretores de GH, são tipicamente causadores de distúrbios como Gigantismo e Acromegalia (21). O aumento da secreção da hormona de crescimento estimula, por sua vez, a produção do IGF-1 pelo fígado (30, 44). O IGF-1 é um mediador da maioria dos efeitos da GH, estando assim relacionado com o crescimento dos ossos, cartilagens e tecidos moles, e aumento de tamanho de outros órgãos (45). Desta forma, a secreção excessiva de GH e/ou de IGF-1 desencadeia disfunções somáticas e metabólicas significativas tais como diabetes *mellitus*, hipertensão, artrite, apneia do sono e aumento do tamanho das mãos e pés, bem como alterações nas características faciais, incluindo prognatismo, macroglossia, crescimento de lábios e nariz e proeminência das arcadas supraciliares, manifestações clássicas de acromegalia (26, 30, 44). Os somatotrofinomas que surgem em doentes jovens (crianças e adolescentes), resultando num excesso de GH antes do fecho das epífises ósseas durante a puberdade, provocam crescimento acelerado e gigantismo (30, 44). Se a hipersecreção da GH persistir na idade adulta ou se não for tratada, os doentes com gigantismo poderão vir a desenvolver acromegalia (45). A acromegalia está associada a um risco de mortalidade duas vezes maior em relação ao gigantismo, principalmente devido à doença cardiovascular. Estes casos podem ser revertidos através da cirurgia transesfenoidal ou do uso de análogos da somatostatina, que causam uma diminuição na produção de GH e redução do tamanho do tumor, ou através de antagonistas do recetor de GH, que bloqueiam o efeito da hipersecreção hormonal (46).

Os corticotrofinomas, adenomas hipofisários secretores de ACTH, são considerados a causa mais frequente de hipercortisolemia associada a sinais clínicos e biológicos da Doença de Cushing (47). A Doença de Cushing está associada a um aumento de 2-5 vezes na mortalidade, e embora a morbilidade substancial relacionada com a diabetes e doenças cardiovasculares possa persistir, esta síndrome é amplamente revertida através da cirurgia transesfenoidal ou de medicamentos que controlam a produção excessiva de cortisol pela glândula adrenal (30). Os doentes diagnosticados com Doença de Cushing, geralmente apresentam sinais clínicos associados ao hipercortisolismo, tais como ganho de peso, hipertensão, irregularidades menstruais, face em “lua-cheia”, fragilidade capilar, aparecimento de estrias violáceas, fraqueza muscular e osteoporose (47).

Por outro lado, os NFPA representam cerca de um terço de todos os adenomas hipofisários, e os sintomas podem ser muito variáveis (23, 30, 48). Os microadenomas não-funcionantes, por serem assintomáticos, são frequentemente detetados como incidentalomas por ressonância magnética (RM) ou tomografia axial computadorizada (TAC), realizadas por outras razões (48). Os macroadenomas não-funcionantes podem causar variados problemas devido à compressão e invasão de estruturas anatómicas

adjacentes à hipófise, tais como disfunções hipofisárias significativas e distúrbios visuais, geralmente chamados de efeitos de massa (30, 47). Os principais sintomas de efeito de massa são cefaleias, defeitos no campo visual incluindo perda da visão periférica, oftalmoplegias e hipopituitarismo (48). Os NFPA são geralmente benignos, embora casos de NFPA malignos já tenham sido relatados (49). A urgência de tratar cirurgicamente os NFPA depende de diversos fatores, tais como sintomas clínicos, tamanho do adenoma, invasão de estruturas circundantes, especialmente proximidade ou pressão sobre o quiasma ótico, insuficiências hormonais hipofisárias, idade do doente, estado de fertilidade, risco de apoplexia e riscos inerentes à cirurgia (47, 50). Estes tumores geralmente apresentam-se como macroadenomas invasivos, não passíveis de remoção cirúrgica completa. Nestes casos, a radioterapia pode ser aplicada no pós-operatório para quaisquer lesões residuais e recorrentes (47).

## 1.2 Fatores de risco genético em adenomas hipofisários

A maioria dos casos de tumores hipofisários (95%) ocorre esporadicamente, isto é, sem história familiar. Os adenomas hipofisários esporádicos têm origem monoclonal, expandindo-se a partir de anomalias genéticas moleculares numa única célula da hipófise (mutações somáticas) (51). Quando comparados com tumores malignos, os adenomas hipofisários esporádicos têm, em geral, uma menor taxa de mutação somática (52, 53), e raramente apresentam mutações em genes associados a tumores malignos noutros órgãos, como os genes *RAS*, *TP53*, *BRAF*, *CTNNB1* e outros (47, 54). A maioria dos casos de adenomas hipofisários esporádicos ocorre sem predisposição genética conhecida, no entanto, mutações somáticas recorrentes têm sido identificadas no gene *GNAS* em adenomas somatotróficos (55).

Embora a maioria dos adenomas hipofisários ocorra esporadicamente, cerca de 5% pode ocorrer em contexto genético familiar, devido à presença de mutações nas células germinativas. Estes casos estão frequentemente presentes em doentes mais jovens, são mais agressivos e mais resistentes à terapia, quando comparados aos adenomas esporádicos (40). As formas familiares podem contribuir para a elucidação de fatores genéticos subjacentes, uma vez que fornecem informação para a identificação e caracterização de genes relevantes (56). Os casos familiares de adenomas hipofisários podem ocorrer de forma isolada, denominados Adenomas Hipofisários Familiares Isolados (FIPA, *Familial Isolated Pituitary Adenomas*) devido a alterações germinativas nos genes como *AIP* (57), *CDH23* (58) ou *GPR101* (59). Alguns casos familiares de

## 1. Introdução

adenomas hipofisários podem também ocorrer em associação com outros tumores endócrinos, denominados Adenomas Hipofisários Familiares Sindrômicos, tais como Neoplasias Endócrinas Múltiplas do tipo 1, tipo 2, tipo 4, Complexo de Carney e outras síndromes raras, por alterações germinativas nos genes *MEN1*, *CDKN1B*, *MAX*, *PRKAR1A*, *RET*, entre outros (60). Na tabela 1 estão esquematizados os principais genes descritos na literatura, com mutações germinativas e mosaicismos associados a adenomas hipofisários.

**Tabela 1.** Visão geral dos principais genes descritos na literatura, com mutações germinativas e mosaicismos associados a adenomas hipofisários.

<b>Gene</b>	<b>Locus</b>	<b>Modo de Hereditariedade</b>	<b>Doença</b>	<b>Formas Isoladas</b>	<b>Formas Síndrômicas</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>Referências</b>
<i>AIP</i>	11q13.3	AD	FIPA	x		Adenoma Hipofisário Familiar Isolado e Esporádico	(61)
<i>CABLES1</i>	18q11.2	AD	Adenomas Hipofisários Isolados Esporádicos	x		Corticotrofinomas	(62)
<i>CDH23</i>	10q22.1	AD	FIPA e Adenomas Hipofisários Esporádicos	x		Adenoma Hipofisário Familiar e esporádicos	(58)
<i>CDKN1A</i>	6p21.2	?	Neoplasia Endócrina Múltipla 4		x	Hiperparatiroidismo primário, adenomas hipofisários, tumores neuroendócrinos pancreáticos	(63)
<i>CDKN1B</i>	12p13.1	AD	Neoplasia Endócrina Múltipla 4		x	Hiperparatiroidismo primário, adenomas hipofisários	(64)
<i>CDKN2B</i>	9p21.3	?	Neoplasia Endócrina Múltipla 4		x	Hiperparatiroidismo primário, adenomas hipofisários, tumores neuroendócrinos pancreáticos	(63)
<i>CDKN2C</i>	1p32.3	?	Neoplasia Endócrina Múltipla 4		x	Hiperparatiroidismo primário, adenomas hipofisários, tumores neuroendócrinos pancreáticos	(63)
<i>DICER1</i>	14q32.13	AD	Síndrome de Dicer		x	Blastomas	(65)
<i>GNAS</i>	20q13.3	?	Síndrome McCune-Albright		x	Displasia fibrosa, manchas café-com-leite, puberdade precoce	(66)

<b>Gene</b>	<b>Locus</b>	<b>Modo de Hereditariedade</b>	<b>Doença</b>	<b>Formas Isoladas</b>	<b>Formas Síndrômicas</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>Referências</b>
<b><i>GPR101</i></b>	Xq26.3	Ligado ao X	FIPA e Acrogigantismo associado ao X	x		Adenoma Hipofisário Familiar Isolado	(59)
<b><i>MAX</i></b>	14q23.3	AD	Paraganglioma hereditário		x	Feocromocitoma	(67)
<b><i>MEN1</i></b>	11q13.1	AD	Neoplasia Endócrina Múltipla 1		x	Hiperparatireoidismo primário, adenomas hipofisários, tumores neuroendócrinos pancreáticos	(68)
<b><i>MLH1</i></b>	3p22.2	AD	Síndrome de Lynch		x	Carcinoma da hipófise	(69)
<b><i>MSH2</i></b>	2p21-p16.3	AD	Síndrome de Lynch		x	Corticotrofinoma agressivo e adenomas lactotróficos	(70)
<b><i>MSH6</i></b>	2p16.3	AD	Síndrome de Lynch		x	Corticotrofinomas	(69)
<b><i>NF1</i></b>	17q11.2	AD	Neurofibromatose tipo 1		x	Neurofibromas, manchas café-com-leite, sardas, nódulos Lisch, glioma óptico	(71)
<b><i>PMS2</i></b>	7p22.1	?	Síndrome de Lynch		x	Corticotrofinomas	(72)
<b><i>PRKAR1A</i></b>	17q22-24	AD	Complexo de Carney		x	Acromegália, mixomas, hiperpigmentação	(73)
<b><i>PRKACA</i></b>	19p13.12	?	Síndrome de Cushing		x	Corticotrofinomas	(74)

Gene	Locus	Modo de Hereditariedade	Doença	Formas Isoladas	Formas Sindrómicas	Fenótipo	Referências
<b>PRKACB</b>	1p31.1	AD	Complexo de Carney		x	Adenomas hipofisários, mixomas, tumor adrenal, tumor da tiróide, schwannomas	(75)
<b>RET</b>	10q11.21	AD	Neoplasia Endócrina Multipla tipo 2		x	Carcinoma medular da tiróide, feocromocitoma e tumores da paratiróide	(76)
<b>SDHA</b>	5p15						
<b>SDHAF2</b>	11q12.2						
<b>SDHB</b>	1p36.1-p35	AD	Paraganglioma hereditário		x	Associação 3Ps (Adenomas hipofisários e feocromocitoma/paraganglioma)	(77)
<b>SDHC</b>	1q23.3						
<b>SDHD</b>	11q23						
<b>TP53</b>	17p13.1	AD	Síndrome Li Fraumeni		x	Sarcomas, osteossarcoma, cancro da mama, leucemia e carcinoma adrenocortical	(78)
<b>USP8</b>	15q21.2	?	Corticotrofinoma	x		Corticotrofinomas	(79)
<b>VHL</b>	3p25.3	AD	Síndrome de Von Hippel-Lindau		x	Hemangioblastomas da retina e do sistema nervoso central, feocromocitomas e carcinoma renal de células claras	(76)

AD, Autossómica dominante; FIPA, Adenomas hipofisários isolados familiares (*Familial Isolated Pituitary Adenomas*).

## **1.2.1 Principais genes, descritos na literatura, com mutações germinativas e mosaicismos associados a adenomas hipofisários**

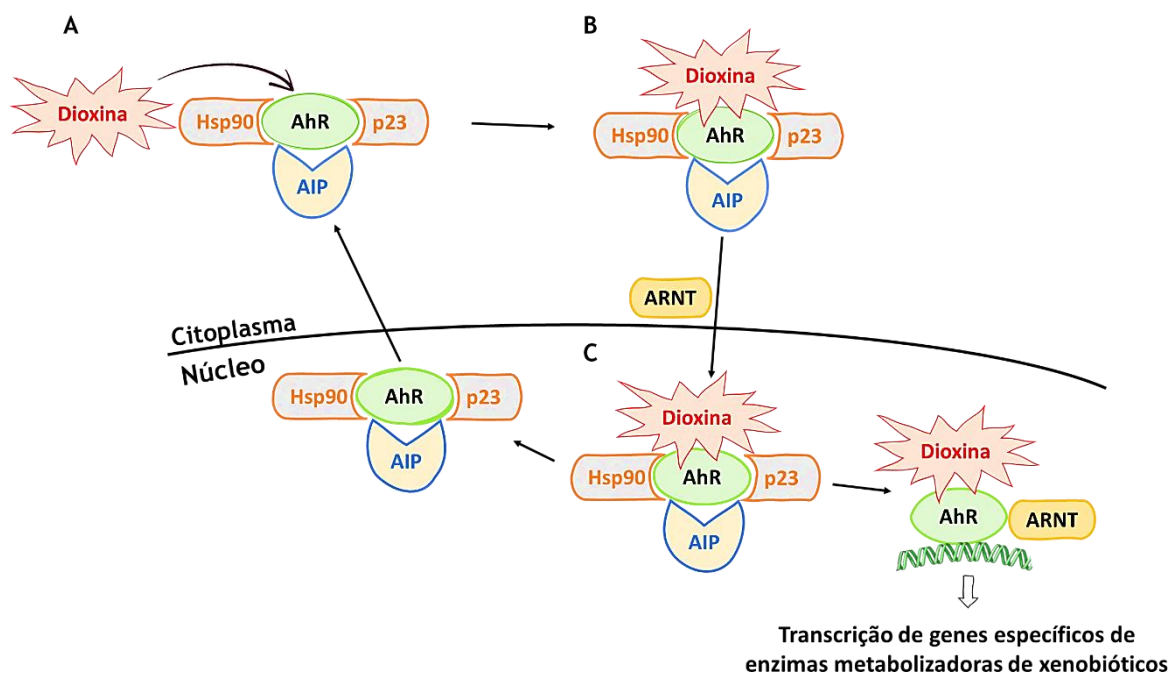
### **1.2.1.1 Gene *AIP***

Em 2006, Vierimaa *et al.* (61) descreveram um estudo genético para genes envolvidos na patogênese de adenomas hipofisários ocorridos em contexto familiar, tendo sido um importante avanço na comunidade científica (61). As famílias em causa apresentavam combinações de somatotrofinomas, prolactinomas e tumores mistos secretores de GH-PRL (mamosomatotrofinomas) (80). Os resultados deste estudo revelaram, pela primeira vez, mutações germinativas inativadoras no gene *AIP*, localizado no cromossoma 11 (11q13.3), mostrando perda de heterozigotia, em tumores, neste locus (61, 81). Assim, o *AIP* foi o primeiro gene a ser relacionado com adenomas hipofisários familiares isolados (OMIM #102200). Este tipo de adenomas é definido quando dois ou mais membros de uma família apresentam adenomas hipofisários na ausência de características de doença síndrômica, havendo uma maior preponderância para o sexo feminino (62%) (82). Os membros da família afetados podem apresentar o mesmo tipo de adenoma hipofisário (apresentação homogénea) ou diferentes tipos (apresentação heterogénea) (83). Os adenomas hipofisários mais frequentes em casos FIPA são os prolactinomas (41%), os somatotrofinomas (30%) e os NFPAs (13%) (83), sendo que os gonadotrofinomas, corticotrofinomas e tireotrofinomas são os menos frequentes (83, 84).

Aproximadamente 20-40% das famílias com FIPA têm mutações germinativas inativadoras no gene *AIP* (57, 85, 86, 87). Os doentes com estas mutações têm mais frequentemente prolactinomas ou somatotrofinomas de início jovem, geralmente com fraca resposta ao tratamento convencional e um comportamento agressivo em comparação com doentes sem mutação conhecida (88, 89). O gene *AIP* é um gene de supressão tumoral, e compreende seis exões que codificam uma proteína citoplasmática denominada proteína de interação do recetor de aril-hidrocarbono (*AIP*, *Aryl-hydrocarbon receptor Interacting Protein*) (90). Estruturalmente, a proteína *AIP* possui um domínio de peptidil-prolil cis/trans isomerase (*PPIase*, *peptidyl-prolyl cis/trans isomerase*) do tipo proteína de ligação a FK506 (*FKBP*, *FK506-binding protein*), na extremidade amino-terminal, que consiste numa hélice- $\alpha$  e folhas  $\beta$  interligadas por duas hélices  $\alpha$  (91). As *PPIases* (prolil-isomerases) são enzimas que catalisam a isomerização cis e trans de ligações peptídicas com o aminoácido prolina, acelerando o enovelamento de proteínas. No entanto, acredita-se que a proteína *AIP* não tenha atividade *PPIase* (91).

Na extremidade carboxi-terminal, a proteína AIP possui três domínios de repetição de tetratricopeptídeo (TPR, *Tetratricopeptide Repeat*) formados por hélices  $\alpha$  anfipáticas antiparalelas e uma sétima hélice  $\alpha$  na região terminal C (92). Essas hélices facilitam as interações proteína-proteína (92, 93).

Esta proteína faz parte de um complexo multiproteico de *chaperones* que está envolvido na maturação funcional do recetor aril-hidrocarbono (AhR, *Aryl-hydrocarbon Receptor*). Deste complexo também fazem parte a proteína de choque térmico 90 (Hsp90, *Heat Shock Protein 90*) e p23, uma proteína *co-chaperone* importante para a via de sinalização Hsp90 (94). O AhR é um fator de transcrição ativado por ligando ao qual substâncias químicas como a dioxina se ligam com elevada afinidade. Após a ligação ao AhR, estas substâncias são translocadas para o núcleo pela proteína translocadora nuclear do AhR (ARNT, *Aryl-hydrocarbon Nuclear Translocator*), ativando genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos (56) (Figura 5).



**Figura 5.** Representação esquemática do complexo proteico entre AIP e AhR. **(A)** Este complexo multiproteico existe no citoplasma na ausência de ligando. **(B)** Quando um ligando (dioxina) se liga ao terminal C do AhR, o complexo migra para o núcleo. **(C)** Uma vez no núcleo, o complexo heterodimeriza-se com a proteína ARNT, induzindo a transcrição de genes específicos. AhR, recetor aril-hidrocarbono; AIP, proteína de interação do recetor de aril-hidrocarbono; ARNT, Proteína translocadora nuclear do AhR.

A proteína *co-chaperone* AIP tem como função proteger o AhR da ubiquitinação, prolongando a sua semi-vida, retendo-o no citoplasma, prevenindo assim a sua ação

## 1. Introdução

como fator de transcrição (95). A AIP interage também com a fosfodiesterase 4A5, inibindo a sua atividade e resultando numa diminuição dos níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) (31).

No estudo de coorte descrito por Igreja *et al.* (81), foi reportado que mais de 80% das famílias com mutações germinativas no gene *AIP* têm pelo menos uma pessoa diagnosticada com adenoma hipofisário antes dos 18 anos. Contrariamente, entre 46 famílias sem mutações identificadas neste gene, apenas três tiveram pessoas com esta doença antes dos 18 anos (81). Curiosamente, de acordo com um estudo de caracterização clínica de adenomas hipofisários familiares realizado por Daly *et al.* (96), a idade de início de tumor aparentava ser mais precoce na segunda geração da família do que na primeira (média de idade  $29 \pm 10$  anos vs.  $51 \pm 14$  anos,  $p < 0,0001$ ). Este facto provavelmente é devido ao reconhecimento antecipado dos sintomas nas famílias afetadas por FIPA (96).

Sabe-se ainda que as mutações no gene *AIP* aumentam, geralmente, a predisposição à acromegalia (86, 97, 98). Por esta razão, somatotrofinomas associados a mutações no gene *AIP* são desencadeados numa idade significativamente mais precoce e são maiores em tamanho do que em casos de acromegalia sem mutações no gene *AIP* (88).

É importante notar que mutações germinativas no gene *AIP* podem também ocorrer em indivíduos com adenomas hipofisários esporádicos, nomeadamente somatotrofinomas ou prolactinomas, de início precoce, como consequência de penetrância incompleta, uma vez que mutações *de novo* são raras (99). Se considerarmos apenas doentes com adenomas hipofisários esporádicos diagnosticados antes dos 30 anos, a prevalência de mutações no gene *AIP* varia entre 2 e 12%, enquanto que em doentes pediátricos ( $\leq 18$  anos) chega a 20% (58, 60, 100, 101, 102).

### 1.2.1.2 Gene *CABLES1*

Em 2017, um estudo de coorte de 146 doentes pediátrico e 35 doentes adultos com Doença de Cushing revelou mutações germinativas no gene *CABLES1* em quatro doentes esporádicos diagnosticados com corticotrofinomas, (62). As variantes foram identificadas em heterozigotia em quatro doentes do sexo feminino (dois adultos e duas crianças).

O gene *CABLES1*, localizado no cromossoma 18 (18q11.2) é um regulador negativo da progressão do ciclo celular que é ativado nas células corticotróficas em resposta aos

glucocorticóides (103). Este gene codifica a proteína CABLES1 que originalmente foi descrita como um parceiro de interação e substrato da cinase dependente de ciclina-3 (CDK3, *Cyclin-Dependent Kinase-3*) (104, 105). Esta proteína desempenha um papel crucial no desenvolvimento neural durante a embriogénese, tal como reportado em estudos *in vitro* e de modelos de inativação de genes do rato e peixe-zebra (106, 107). Outra função importante desta proteína, é a capacidade de estabilização de reguladores do ciclo celular, como CDKN1A (p21), CDK5R1 (p35) e TP63, prevenindo a sua degradação (107, 108, 109, 110). Além disso, a proteína CABLES1 interage ainda com TP53 e TP73, desencadeando a apoptose (111).

### 1.2.1.3 Gene *CDH23*

O gene *CDH23* possui 69 exões e codifica a proteína caderina 23 (CDH23), uma proteína de 3.354 resíduos de aminoácidos com 27 repetições extracelulares (EC), um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático (112). Esta proteína é um membro da superfamília das caderinas, que compreende glicoproteínas de adesão celular dependentes de cálcio, e a sua função é mediada pelos seus domínios extracelulares, particularmente através dos seus motivos de ligação de cálcio altamente conservados (58, 113).

Um estudo de coorte realizado na população Chinesa, em 2017, revelou que mutações heterozigóticas na linha germinativa no gene *CDH23* estão associadas a adenomas hipofisários familiares isolados e esporádicos (58). Este estudo de Zhang *et al.* baseou-se na sequenciação de exoma completo (WES, *Whole-Exome Sequencing*) e identificou mutações neste gene em 33% de doentes FIPA e em 12% dos indivíduos com adenomas hipofisários esporádicos (58, 114).

Mutações germinativas em homozigotia ou heterozigotia compostas no gene *CDH23* têm sido identificadas em indivíduos com Síndrome de Usher, que se caracteriza pela perda de audição em idade jovem, retinite pigmentosa e perturbações vestibulares (112). No entanto, os doentes com adenomas hipofisários em que foram identificadas mutações germinativas no gene *CDH23* (58) não apresentavam manifestações fenotípicas de Síndrome de Usher. Esta observação poderá dever-se ao facto das mutações germinativas identificadas por Zhang *et al.* serem de natureza heterozigótica, tanto em casos familiares como em esporádicos (58). Existem ainda casos de penetrância incompleta, semelhantes a casos portadores de variantes no gene *AIP*, uma vez que Zhang *et al.* identificaram, entre as quatro famílias FIPA estudadas, sete indivíduos

## 1. Introdução

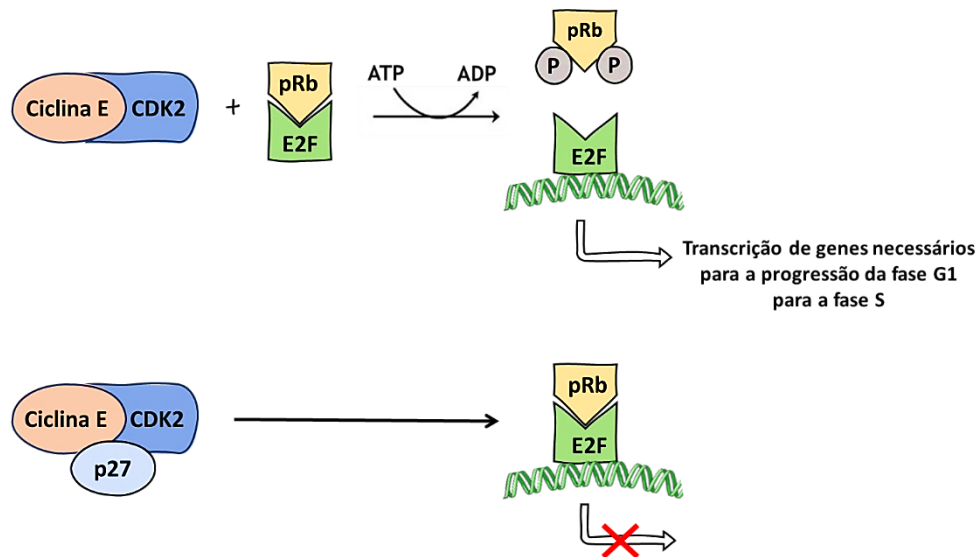
assintomáticos com idades compreendidas entre os oito e os 60 anos, portadores de mutações germinativas no gene *CDH23* (58).

Tem sido relatado que a proteína CDH23 desempenha um papel na progressão tumoral por intermédio da regulação da adesão celular (58). A desregulação da expressão e atividade de algumas caderinas é frequentemente observada em adenomas hipofisários e desta forma levanta-se a hipótese de que estas proteínas contribuem para a patogénese dos adenomas hipofisários. Além disto, a proteína CDH23 forma heterodímeros e funciona de forma muito próxima com a protocaderina 15 (PCDH15) que está localizada perto de um locus de elevada suscetibilidade genética para adenomas hipofisários (115). Assim, estes dados sugerem que mutações no *CDH23* poderão representar um fator de risco genético para adenomas hipofisários familiares e esporádicos.

### **1.2.1.4 Genes *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2B* e *CDKN2C***

O gene *CDKN1B* localiza-se no cromossoma 12 (12p13.1) e codifica o p27<sup>Kip1</sup>, um inibidor da cinase dependente de ciclina (CDKI, *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor*) de 196 aminoácidos. O p27<sup>Kip1</sup> (doravante designado por p27) é um regulador da progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S (64, 116).

A progressão do ciclo celular através da transição G1 para a fase S é dependente dos complexos que se formam entre ciclinas e cinases dependente de ciclina (CDK, *Cyclin-Dependent Kinase*), particularmente o complexo ciclinaE/CDKN2. Este complexo inativa, através da fosforilação, membros da família da proteína retinoblastoma (pRb), provocando a libertação dos fatores de transcrição E2F que, por sua vez, irão ativar a transcrição de genes responsáveis pela progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. O p27 inibe o complexo ciclinaE/CDKN2 resultando na fosforilação reduzida da pRb e na regulação da progressão do ciclo celular (Figura 6) (117). A pRb pode ser vista como um elemento chave na progressão da fase G1, uma vez que a regulação da fosforilação desta proteína vai permitir um maior controlo da progressão do ciclo celular (118).



**Figura 6.** Representação esquemática da inibição do complexo ciclina E/CDK2, pela ligação da p27, resultando numa fosforilação reduzida da pRb. Este processo inibe a transcrição de genes necessários para o avanço do ciclo celular da fase G1 para a fase S, controlando a progressão do ciclo celular.

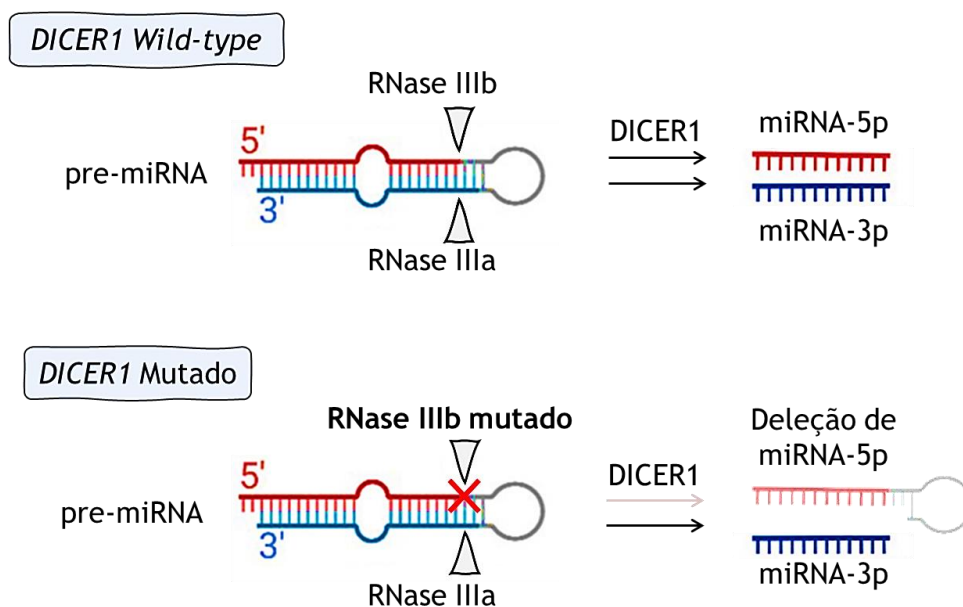
Em 2006, variantes patogénicas no gene *CDKN1B* foram descritas numa família com acromegalia, hiperparatiroidismo primário e outros tumores, surgindo uma nova condição designada por Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 4 (MEN4, *Multiple endocrine neoplasia type 4*) (OMIM #610755) (119). As características fenotípicas mais frequentes em doentes com esta síndrome são as neoplasias da paratiróide e da hipófise, que podem ocorrer em associação a outros tumores dos órgãos reprodutores, suprarrenais e rins (116). Neste contexto, os adenomas hipofisários surgem em cerca de 37% dos casos relatados, incluindo somatotrofinomas, corticotrofinomas, adenomas hipofisários não funcionantes e prolactinomas, com início de doença entre os 30-79 anos (64). Esta síndrome é descrita como sendo de hereditariedade autossómica dominante e causada por mutações germinativas inativadoras no gene de supressão tumoral *CDKN1B*.

Com a descoberta de variantes no gene *CDKN1B*, também outros genes (*CDKN2B*, *CDKN2C*, *CDKN1A*), que codificam outras proteínas inibidores de cinase dependente de ciclina (p15<sup>Ink4b</sup>, p18<sup>Ink4c</sup> e p21), têm sido analisados. Neste contexto, foram identificadas variantes germinativas patogénicas nestes genes em casos semelhantes a MEN1 com adenomas hipofisários (63). No entanto, a prevalência de mutações nos genes *CDKN1B*, *CDKN2B*, *CDKN2C* e *CDKN1A* em adenomas hipofisários esporádicos nunca foi relatada.

### 1.2.1.5 Gene *DICER1*

O gene *DICER1* localizado no cromossoma 14 (14q32.13), codifica uma endoribonuclease citoplasmática responsável pelo processamento de miRNAs precursores em miRNAs funcionais, que posteriormente modulam a expressão de mRNA a nível pós-transcricional. A desregulação deste processo conduz ao desenvolvimento de tumores (120). Neste sentido, tem sido reportado que mutações germinativas no gene *DICER1* resultam em Síndrome de *DICER1*, a qual está associada a blastoma pleuropulmonar infantil, carcinoma diferenciado da tiróide, bócio multinodular, tumor estromal do cordão sexual do ovário, tumor de células de Sertoli-Leydig, blastoma hipofisário, entre outros (121). Além disso, vários casos de blastomas hipofisários raros de início infantil têm, também, sido associados a mutações germinativas no gene *DICER1* (65). Os blastomas hipofisários tendem a desenvolver-se antes dos dois anos de idade e segregam ACTH, causando Doença de Cushing grave (65, 122, 123).

A patogénese da Síndrome de *DICER1* baseia-se normalmente numa mutação germinativa de perda de função do gene *DICER1*, mais frequentemente uma mutação *nonsense* ou *frameshift*, seguida de um segundo *hit* somático que envolve frequentemente o domínio catalítico RNase IIIb da proteína *DICER1* (Figura 7) (124, 125, 126).



**Figura 7.** Ilustração do mecanismo de processamento de miRNA precursores em miRNA funcionais. Este processo fica comprometido quando existe uma mutação germinativa de perda de função do gene *DICER1*. Reproduzido com permissão de Ricarte-Filho *et al.* (126), disponível em *open access*.

### 1.2.1.6 Gene *GNAS*

O gene *GNAS*, localizado no cromossoma 20 (20q13.32), codifica a subunidade  $\alpha$  da proteína G ( $G_{\alpha}$ ), a qual tem um papel importante na transdução de sinais transmembranares (127).

A forma mutada deste gene resulta no oncogene *gsp*. Este oncogene tem origem numa mutação heterozigótica pontual no codão 201 (exão 8) do gene *GNAS*, afetando assim os aminoácidos responsáveis pela atividade intrínseca da GTPase. Desta forma, verifica-se a redução da hidrólise do GTP, ativação da adenil ciclase e aumento da concentração intracelular do AMPc (66, 128). Isto traduz-se num aumento dos níveis da proteína PKA, que por sua vez, ativa o fator de transcrição Pit-1 (*POU1F1*) estimulando a síntese de GH e a proliferação celular. Mutações somáticas no gene *GNAS* podem ser encontradas em 30-40% dos somatotrofinomas (47, 129). Mutações somáticas pós-zigóticas neste gene, que originam mosaicismo, causam o Síndrome de Mc-Cune Albright. Esta síndrome predispõe os doentes a desenvolverem múltiplos tumores endócrinos, displasia fibrosa e adenomas hipofisários secretores da hormona do crescimento (130).

### 1.2.1.7 Gene *GPR101*

Alterações genéticas no gene *GPR101* foram identificadas como causadoras de acro-gigantismo ligado ao cromossoma X (XLAG, *X-linked acrogigantism*), levando ao gigantismo pediátrico de início muito precoce (59, 131). O gene *GPR101* localiza-se no cromossoma X (Xq26.3), e a microduplicação deste locus está implicada como sendo a causa de XLAG em crianças, uma vez que leva a uma hiperprodução do seu produto, podendo assim afetar as células somatotróficas através do aumento da secreção de GHRH hipotalâmico (56, 129). XLAG é uma doença que segue uma hereditariedade dominante ligada ao cromossoma X, sendo que nas mulheres a duplicação de uma das cópias do gene *GPR101* é suficiente para causar a doença. Nos homens uma duplicação da única cópia deste gene causa a doença (132). Os doentes com XLAG apresentam um excesso acentuado de GH, na maioria dos casos com hiperprolactinemia, causada por adenomas mistos secretores de GH/PRL associados, nalguns doentes, a hiperplasia hipofisária (98).

O gene *GPR101* codifica o recetor 101 acoplado à proteína G (*GPR101*), que é fortemente expresso na glândula hipofisária humana durante o desenvolvimento fetal e na adolescência, sugerindo que a sua expressão é induzida durante estas fases de desenvolvimento (133). Os mecanismos exatos da tumorigénese ainda não estão

## 1. Introdução

totalmente esclarecidos, no entanto existem provas de que a via de sinalização dependente de AMPc-PKA e o aumento da secreção de GHRH podem estar envolvidos (134, 135, 136).

### 1.2.1.8 Gene *MAX*

O gene *MAX* está localizado no cromossoma 14 (14q23.3) e codifica a proteína *MAX* que forma heterodímeros com a proteína *C-MYC*. Estes heterodímeros ligam-se posteriormente a sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA, *Deoxyribonucleic Acid*) alvo ou a regiões E-box (CACGTG) para regular a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular e no crescimento celular (137).

Este gene parece comportar-se como um gene de supressão tumoral uma vez que mutações inativadoras resultam numa falha da dimerização com a proteína *C-MYC* e consequente transcrição descontrolada dos genes a jusante. Mutações germinativas neste gene estão associadas à tumorigénese de células neuroendócrinas, tumores renais ou cancro do pulmão (138, 139). As variantes germinativas e somáticas do gene *MAX* podem resultar em casos esporádicos e familiares de paragangliomas e feocromocitomas (PPGL, *pheochromocytomas and paragangliomas*) (140). Recentemente, foram registados doentes com adenomas hipofisários em associação com PPGL, também designado como associação 3Ps (3PAs, *three P association*), com variantes germinativas patogénicas, nomeadamente mutações pontuais e pequenas deleções exónicas e intrónicas, no gene *MAX* (67, 140, 141).

### 1.2.1.9 Gene *MEN1*

O gene *MEN1* (11q13) compreende 10 exões e codifica uma proteína nuclear de 610 aminoácidos denominada menina (116, 142). Inicialmente, não era conhecida a sua função, uma vez que a menina não tem homologia com quaisquer proteínas ou domínios conhecidos (143, 144). Contudo, Guru *et al.*, em 1998, revelou que a proteína menina é predominantemente nuclear (145). Relativamente à sua função, estudos de interações proteína-proteína demonstraram que a menina interage com várias proteínas envolvidas na regulação da transcrição, estabilidade do genoma, divisão celular e proliferação (143). Esta proteína interage com diversas proteínas nucleares, nomeadamente fatores de transcrição (146), desacetilases das histonas (147) e metiltransferases das histonas (148), sugerindo a sua intervenção na transcrição.

A proteína menina interage de diversas formas: com o fator de transcrição JunD da proteína de ativação-1 (AP-1, *Activating Protein-1*) (146), um inibidor do crescimento celular; com os membros da família Smad (Smad3 e complexo Smad1/5) inibindo a via de sinalização do fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ , *Transforming Growth Factor- $\beta$* ), responsável pelo controlo da proliferação, diferenciação e outras funções celulares (149, 150); com proteínas da família fator nuclear kappa-B (NF-kB, *Nuclear Factor-Kappa B*), para reprimir a ativação transcricional mediada por NF-kB (151); e com o gene de expressão embrionária placentária (Pem, *Placental Embryonic Expression gene*), uma *homeobox* que codifica proteínas necessárias ao desenvolvimento embrionário (152, 153). Controla ainda a expressão dos inibidores da cinase dependente de ciclina (CDKIs, *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*), em particular, p27<sup>Kip1</sup> e p18<sup>INK4c</sup>. Assim, a perda de função da menina resultantes de mutações associadas ao gene de supressão tumoral *MEN1*, irá desencadear a regulação negativa de p27<sup>Kip1</sup> e de p18<sup>INK4c</sup>, promovendo um crescimento celular anormal (84, 154). As mutações encontradas no gene *MEN1* predispõem a distúrbios de múltiplos órgãos, incluindo tumores endócrinos e não endócrinos (60).

A Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (*MEN1*, OMIM #131100) é caracterizada tipicamente pela presença de uma tríade clássica de hiperparatiroidismo (em 90% dos casos), tumores endócrinos pancreáticos (em 30-80% dos casos) e adenomas hipofisários (em 20-50% dos casos) (143, 155, 156, 157). Também podem estar presentes outras manifestações, não tão frequentes, como angiofibromas faciais, collagenomas, tumores adrenocorticais, lipomas e meningiomas (156, 158, 159). É uma doença autossómica dominante causada por mutações germinativas no gene *MEN1*, estando descritas mais de 1300 mutações germinativas (143). As mutações *frameshift*, *nonsense* e de *splice-site* representam aproximadamente 50, 20 e 10% de todas as mutações encontradas no gene *MEN1* (143). Estas mutações resultam no término prematuro da tradução da proteína, podendo abolir importantes domínios proteicos nomeadamente sinais de localização nuclear (143). Mutações *missense* e deleções/inserções *in-frame* não causam uma proteína truncada e representam 20 a 30% das mutações (143). No geral, as mutações causadoras de doença estão espalhadas por toda a região codificante e de *splicing*, e nenhum *hotspot* foi identificado (160).

O desenvolvimento tumoral na *MEN1* obedece à Hipótese *Two Hit* de Knudson (161), em que de acordo com esta, o primeiro *hit* é geralmente herdado de um dos pais ou representa uma mutação *de novo* (alelo inativo). O segundo *hit* é geralmente uma mutação somática, adquirida ao longo da vida, e que resulta em perda de heterozigotia (LOH, *Loss of heterozygosity*) do locus do *MEN1*, inativando-o (144, 162). Por esta razão,

## 1. Introdução

os doentes com diagnóstico clínico ou suspeita de MEN1, os seus parentes em primeiro grau, e familiares que exibam sinais ou sintomas da doença, devem ser submetidos ao estudo genético para o gene *MEN1* (162, 163).

### **1.2.1.10 Genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2***

Os genes *MLH1* (3p22.2), *MSH2* (2p21-p16.3), *MSH6* (2p16.3) e *PMS2* (7p22.1) fazem parte do sistema de reparação do DNA do tipo *mismatch repair* (MMR). Este sistema pertence a uma via biológica altamente conservada, sendo vital para a biologia básica humana, desempenhando um papel fundamental na manutenção da estabilidade genómica através da correção de *mismatches* e inserções/deleções que podem surgir durante a replicação do DNA (164, 165, 166). A perda de função destes genes resulta no mau funcionamento do sistema MMR manifestando-se num fenótipo nefasto e na instabilidade de microssatélites (167).

A Síndrome de Lynch caracteriza-se pela ocorrência de cancro colorretal, do endométrio, do ovário, gástrico e de tumores cerebrais malignos (168). O desencadear desta síndrome está associado a mutações germinativas em genes do sistema MMR, sendo que alterações nos genes *MSH2* e *MLH1* são a causa de 90% dos casos, enquanto que os restantes casos resultam de alterações nos genes *MSH6* e *PMS2* (167). Embora alguns casos de adenomas hipofisários agressivos, incluindo corticotrofinomas, macroprolactinomas e NFPA, tenham sido relatados em doentes com Síndrome de Lynch (70, 72, 169), a prevalência de mutações nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* em adenomas hipofisários esporádicos nunca foi relatada.

### **1.2.1.11 Gene *NF1***

O gene *NF1*, localizado no cromossoma 17 (17q11.2), codifica a neurofibromina, uma proteína envolvida no crescimento e proliferação celular, inibindo a atividade da proteína RAS e regulando os níveis de AMPc (170). Este gene aparenta ser um gene de supressão tumoral ou um regulador de crescimento negativo, uma vez que mutações inativadoras no *NF1* levam a Neurofibromatose tipo 1 (NF1), que se caracteriza pela presença de tumores benignos e malignos em diversos órgãos (170, 171). As características mais comuns desta síndrome são neurofibromas cutâneos, pigmentação café-com-leite, sardas, nódulos de Lisch e tumores cerebrais (171). Embora os adenomas hipofisários não sejam das manifestações mais frequentes na Neurofibromatose tipo 1,

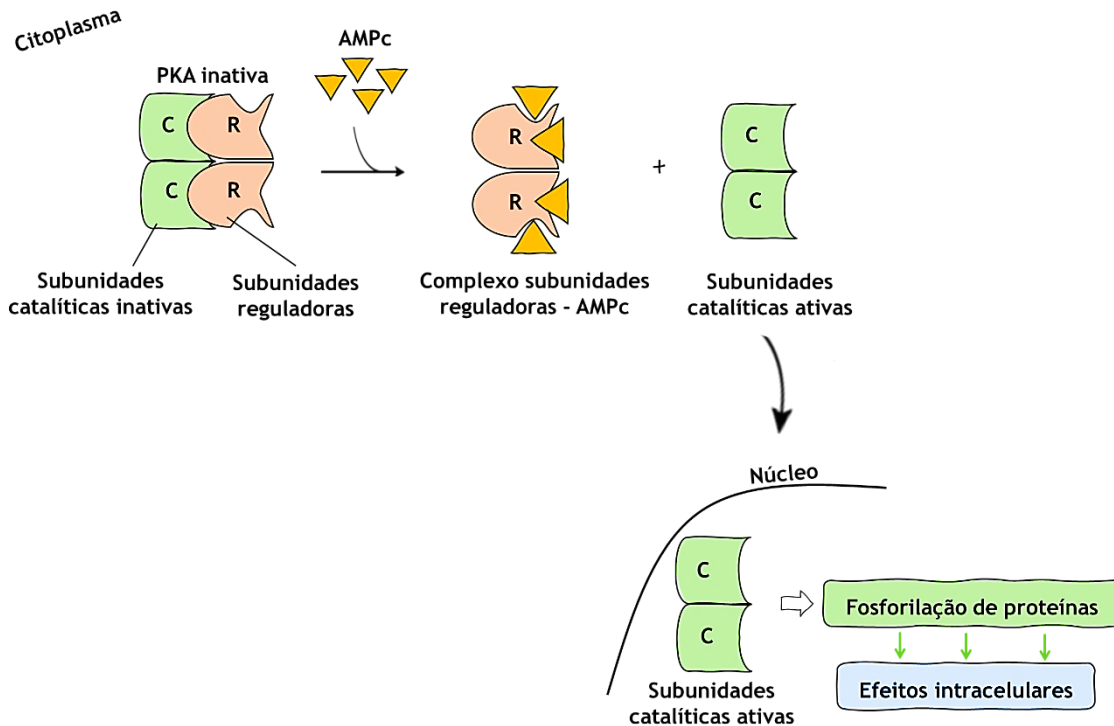
características clínicas de acromegalia e gigantismo foram observados em 10% das crianças diagnosticadas com NF1. O excesso de GH pode ser resultado da perda da inibição somatostatinérgica hipotalâmica, do aumento da estimulação da GHRH, ou da ativação do GPR101 hipotalâmico (172, 173).

Aproximadamente 50% de todos os casos de NF1 são diagnosticados sem história familiar, representando mutações *de novo* (71). A expressão variável das manifestações clínicas de NF1 dificulta o aconselhamento genético e a determinação do prognóstico (170).

#### **1.2.1.12 Genes *PRKAR1A*, *PRKACA* e *PRKACB***

O gene *PRKAR1A*, localizado no cromossoma 17 (17q22-24), contém 11 exões e codifica a subunidade reguladora 1- $\alpha$  (RI $\alpha$ ) da proteína cinase A (PKA) dependente de AMPc (174, 175). A proteína PKA é uma proteína essencial na via de sinalização do AMPc, implicada no normal funcionamento de células endócrinas e não endócrinas. Na sua forma inativa, é composta por dois homodímeros reguladores e dois homodímeros catalíticos, e está localizada maioritariamente no citoplasma (124). Quando se verifica um aumento dos níveis de AMPc, ocorre uma dissociação entre as subunidades reguladores e catalíticas, permitindo a ligação do AMPc às subunidades reguladoras (125). Assim, as subunidades reguladoras são responsáveis pela inibição da ligação do AMPc à subunidade catalítica, permitindo que esta se torne ativa (84,123). Após a sua ativação, as subunidades catalíticas deslocam-se para o núcleo, onde têm como função fosforilar diversas proteínas envolvidas na regulação de processos celulares, como a transcrição, metabolismo, progressão do ciclo celular e apoptose (Figura 8) (176, 177).

## 1. Introdução



**Figura 8.** Representação esquemática do mecanismo de ação da PKA. Os níveis aumentados de AMPc provocam uma dissociação entre as subunidades reguladoras (R) e catalíticas (C) da PKA, permitindo que esta se ligue às subunidades reguladoras, estabelecendo um complexo. Após esta ligação, as subunidades catalíticas tornam-se ativas e difundem-se para o núcleo onde irão fosforilar diversas proteínas responsáveis pela regulação de processos celulares.

Mutações inativadoras no gene *PRKAR1A* são responsáveis por 70% dos casos de Complexo de Carney, resultando na alteração da proteína PKA (157, 178). Estas mutações inativadoras destroem a função inibidora da subunidade reguladora, levando a uma fosforilação excessiva da proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB, *cAMP Responsive Element Binding protein*), a qual desempenha um papel importante no desenvolvimento, diferenciação e proliferação de tecidos endócrinos (156, 179).

O Complexo de Carney (OMIM #160980) foi descrito pela primeira vez em 1985 por J. Aidan Carney, como sendo um complexo de mixomas, pigmentação manchada e hiperatividade endócrina (180). É uma doença autossômica dominante, cujas manifestações clínicas variam amplamente incluindo mixomas do coração, pele e outros tecidos associados a neoplasias endócrinas como tumores hipofisários, adrenocorticais, tireoideus, e neoplasias não endócrinas nomeadamente schwannomas, tumores testiculares, tumores da mama, dos ovários, e lesões ósseas (174, 178). Os mixomas

cardíacos afetam entre 20-40% dos doentes e são responsáveis por mais de 50% da mortalidade relacionada com este complexo (175, 181).

Em 2014, foi reportado que mutações germinativas na subunidade catalítica da PKA do gene *PRKACA* (19p13.12) podem levar à manifestação de adenomas adrenais (74), enquanto que no gene *PRKACB* (1p31.1) podem levar a Complexo de Carney (75). As mutações identificadas nestes estudos, resultaram num ganho do número de cópias destes genes. Em ambos os estudos, verificou-se que a atividade da PKA, observada nos doentes portadores das mutações de ganho de função, estava aumentada para níveis semelhantes aos observados em outros doentes com mutações no gene *PRKAR1A*. Este facto sugere que a expressão aumentada da subunidade catalítica beta pode afetar a atividade da PKA de forma semelhante à observada em doentes com mutações no *PRKAR1A* (74, 75).

### **1.2.1.13 Gene *RET***

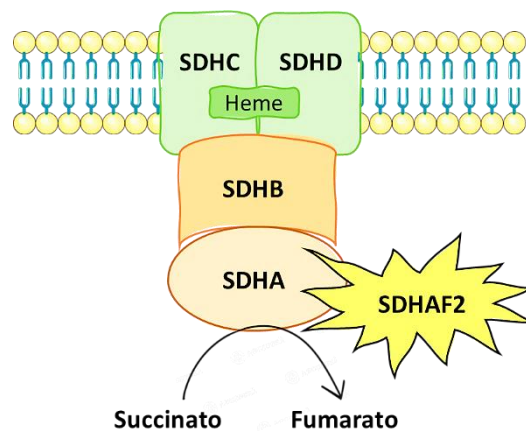
O gene *RET*, localizado no cromossoma 10 (10q11.21), é um proto-oncogene que compreende 21 exões e codifica um recetor com atividade tirosina cinase (158, 182). Este é importante para o normal desenvolvimento, maturação e manutenção de diversos tecidos e células (183). Mutações de ganho de função no gene *RET* conduzem a uma ativação aberrante do seu produto, resultando em diversos tipos de cancro, nomeadamente Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2 (MEN2) (183, 184).

A Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2 divide-se em dois subtipos independentes: MEN2A (OMIM # 171400) e MEN2B (OMIM #162300) (178). A MEN2A ou Síndrome de Sipple caracteriza-se, em 75% dos casos, por uma tríade de manifestações clínicas: carcinoma medular da tiróide que geralmente é a primeira manifestação, feocromocitoma e tumores da paratiróide (159, 185). A MEN2B manifesta-se por carcinoma medular da tiróide agressivo, feocromocitoma e neuromas mucosas, com ausência de tumores das paratiróides (186, 187).

Mutações no gene *RET* também têm sido descritas em doentes com adenomas hipofisários, nomeadamente somatotrofinomas, prolactinomas e NFPA's (76), no entanto, serão necessários mais dados de forma a avaliar se estas mutações estão de facto envolvidas na tumorigénese hipofisária ou se são apenas coincidências.

### 1.2.1.14 Genes *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* e *SDHAF2*

O complexo enzimático succinato desidrogenase (SDH) tem como função a conversão enzimática reversível de succinato em fumarato no ciclo do ácido cítrico, sendo importante para a cadeia respiratória mitocondrial (98, 188). Este complexo é composto por duas subunidades hidrofílicas (SDHA e SDHB) que formam o núcleo catalítico e que contêm o local de ligação ao succinato, e duas subunidades hidrofóbicas (SDHC e SDHD) que são responsáveis pela ancoragem do complexo à membrana mitocondrial e que contêm um grupo heme ligado e um local de ligação para a ubiquinona (Figura 9) (189). A proteína SDHAF2 é uma enzima responsável pela flavinização da subunidade SDHA tornando-a ativa, promovendo o correto funcionamento do complexo SDH (190). Todas as subunidades deste complexo são codificadas por genes nucleares: *SDHA* (5p15), *SDHB* (1p35-36), *SDHC* (1q21), *SDHD* (11q23) e *SDHAF2* (11q12) (190).



**Figura 9.** Representação esquemática do complexo SDH, localizado na membrana mitocondrial interna, e da conversão do succinato em fumarato, promovida pela ativação do complexo através da ligação da SDHAF2.

Mutações de perda de função em genes *SDHx* levam à perturbação do complexo SDH, resultando numa acumulação de succinato, que por sua vez provoca uma reprogramação metabólica do microambiente tumoral, proporcionando condições favoráveis à tumorigênese (191). Têm sido identificadas mutações nestes genes em tumores específicos, tanto familiares como esporádicos, tais como paraganglioma/feocromocitoma (192), carcinoma renal (192), cancro da tiróide (193), cancro do ovário (194) e neuroblastoma (195). Os paragangliomas/feocromocitomas podem estar associados a adenomas hipofisários num contexto designado de Associação

3P (3PA, *Phaeochromocytoma, Paraganglioma and Pituitary adenoma Association*), sendo que, nestes casos, os genes *SDHx* são os mais frequentemente mutados (77).

#### **1.2.1.15 Gene *TP53***

O gene *TP53*, localizado no cromossoma 17 (17p13.1), é um importante gene de supressão tumoral, que desempenha um papel fundamental na prevenção da acumulação de mutações que conduzem a tumores malignos, no entanto, é considerado o gene de supressão tumoral mais mutado em cancros humanos (196). As mutações germinativas no gene *TP53* estão associadas à síndrome de Li-Fraumeni, uma doença rara que predispõe ao cancro e pode manifestar-se por sarcomas de tecidos moles (197, 198), osteossarcoma (39, 40), cancro da mama (41, 42), leucemia (43, 44) e carcinoma adrenocortical (45). Nos adenomas da hipófise, foram registadas mutações somáticas em alguns casos (46-48), tendo sido também registadas mutações germinativas em doentes com adenomas hipofisários que posteriormente desenvolveram Síndrome de Li-Fraumeni (78, 199).

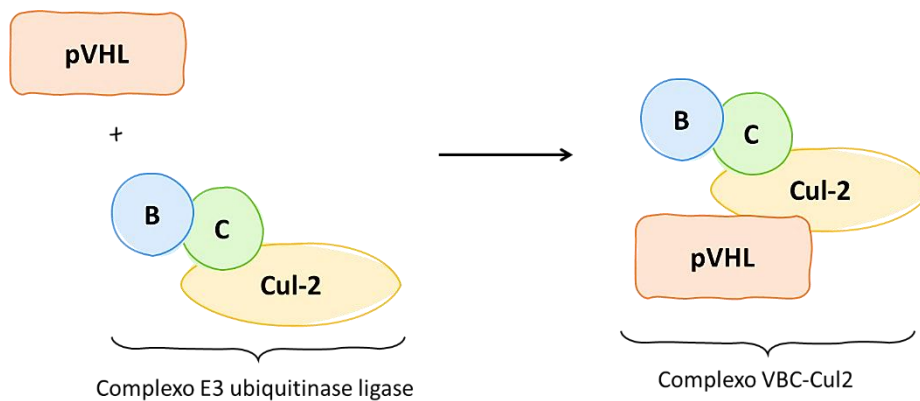
#### **1.2.1.16 Gene *USP8***

O gene *USP8*, localizado no cromossoma 15 (15q21.1), codifica a proteína USP8 responsável pela desubiquitinação de recetores de tirosina cinase, particularmente do recetor do fator de crescimento epitelial (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*) (200). Mutações ativadoras somáticas neste gene levam ao aumento da atividade da hidrolase e, conseqüentemente, à desubiquitinação, particularmente do EGFR. Este efeito leva a um aumento da sinalização de EGFR em células corticotróficas estimulando a transcrição de pró-opiomelanocortina (POMC), que por sua vez resulta na produção excessiva de ACTH (47, 201, 202).

As mutações somáticas identificadas no gene *USP8* representam o defeito genético mais frequente em casos de Doença de Cushing, estando presentes em cerca de 20-60% de todos os corticotrofinomas esporádicos (79, 201, 203, 204, 205, 206). Também neste gene foi descrita uma mutação heterozigótica germinativa *de novo* num doente jovem com uma história clínica complexa que incluía Doença de Cushing recorrente grave (79).

### 1.2.1.17 Gene *VHL*

O gene *VHL*, localizado no cromossoma 3 (3p25.3), é um gene de supressão tumoral que codifica duas isoformas da proteína VHL (pVHL) (207). Esta proteína é um componente do sistema de ubiquitinação, uma vez que atua como motivo de reconhecimento das partículas do complexo de E3 ubiquitinase ligase, que inclui a Elongina C, a Elongina B e a Culina2. Após a ligação da pVHL ao complexo E3 ubiquitinase ligase, forma-se o complexo VBC-Cul2 (Figura 10) (208).



**Figura 10.** Ligação da proteína VHL (pVHL) ao complexo E3 ubiquitinase ligase, constituído pela Elongina B (B), Elongina C (C) e Culina-2 (Cul-2), formando o complexo VBC-Cul2.

A principal função deste complexo é promover a degradação da subunidade  $\alpha$  do fator de transcrição induzido pela hipoxia (HIF $\alpha$ ) (208, 209). Em situações em que a pVHL não está funcional, nomeadamente quando se encontra mutada, a HIF $\alpha$  não é degradada promovendo o aparecimento de tumores altamente vascularizados (210).

Mutações neste gene resultam na doença de Von Hippel-Lindau, uma síndrome de cancro hereditário na qual se manifestam tumores benignos e malignos em diferentes órgãos, como hemangioblastomas da retina e do sistema nervoso central, feocromocitomas e carcinoma renal de células claras (211, 212). Foram ainda reportados dois doentes com adenomas hipofisários funcionantes esporádicos com mutações no gene *VHL* (76), no entanto, ainda está por explicar de que forma os adenomas hipofisários e a doença de Von Hippel-Lindau podem estar associados (77).

### 1.2.3 Polimorfismos de suscetibilidade genética

De forma a investigar a suscetibilidade para os adenomas hipofisários esporádicos, Ye *et al.* conduziram em 2015, o primeiro estudo de associação genómica ampla (GWAS, *Genome-Wide Association Study*) na população chinesa (115). Este estudo identificou três polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) em três loci independentes: rs2359536 no 10p12.31 (razão de probabilidade (OR, *odds ratio*) = 1,44 com um intervalo de confiança (CI) de (1,29-1,62), valor de  $p = 2,25 \times 10^{-10}$ ), rs10763170 no 10q21.1 (OR = 1,28 (1,18-1,39), valor de  $p = 6,88 \times 10^{-10}$ ) e rs17083838 no 13q12.13 (OR = 1,37 (1,23-1,53), valor de  $p = 1,89 \times 10^{-8}$ ), os quais foram associados significativamente com os adenomas hipofisários esporádicos.

Os genes mais próximos do rs2359536 são o *MIR4675* (localizado a 58.6 kb do SNP), cuja função é desconhecida, e o gene *NEBL* (localizado a 169 kb do SNP). O *NEBL* codifica uma proteína semelhante à nebulina que está envolvida na adesão celular, cujo papel é muito importante tanto na patogénese como na progressão de diversos tipos de tumor (213, 214). Considerando que a adesão celular está também implicada na tumorigénese da hipófise, é espectável que o *NEBL* possa ter um papel no desencadeamento dos adenomas hipofisários e assim, possa ser um possível gene candidato de associação genética.

O rs10763170 localiza-se a 216 kb do gene *PCDH15*, que codifica a protocaderina 15 (*PCDH15*). Esta proteína faz parte da superfamília das caderinas, e por essa razão, é uma proteína de adesão celular dependente de cálcio. Alguns estudos reportaram o envolvimento desta família no desenvolvimento e progressão de muitos tumores (215, 216). Mutações neste gene resultam em perda de audição e síndrome de Usher (217), e têm sido encontrados SNPs associados com anomalias lipídicas e com a resposta imune à vacina da varicela (218, 219). Sabe-se ainda, que durante a fase embrionária, em ratinhos, a proteína *PCDH15* é altamente expressa na bolsa de Rathke, que posteriormente origina a hipófise (217). No entanto ainda é incerto se o *PCDH15* está também envolvido na tumorigénese hipofisária.

Por fim, o rs17083838 está localizado no primeiro intrão do gene *CDK8*, o qual é considerado um oncogene em melanomas (220), cancro colorretal (221) e adenocarcinoma gástrico (222). Este gene codifica a proteína cinase 8 dependente de ciclina (*CDK8*), a qual pertence à família de proteínas dependente de ciclina que contém importantes reguladores envolvidos na progressão do ciclo celular. A proteína *CDK8* interage com o fator de transcrição E2F1, interveniente principal na progressão do ciclo

## 1. Introdução

celular, resposta a danos no DNA e apoptose (223), protegendo a  $\beta$ -catenina do efeito inibitório do E2F1 (115). A  $\beta$ -catenina interage com as proteínas Wnt, envolvidas na regulação do desenvolvimento embrionário e na renovação de tecidos na fase adulta, e desta forma, a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina é muito importante durante o desenvolvimento e regula diversos aspetos da função celular, incluindo proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (224). Relativamente à tumorigénese hipofisária, estudos anteriores revelaram que esta via de sinalização se encontra inativa em casos de adenomas hipofisários (225, 226). Assim, a interação entre a CDK8 e o E2F1 pode ser crucial na regulação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina visto que, quando inibida, poderá contribuir para a tumorigénese dos adenomas hipofisários (115). Para além destes factos, a CDK8 é um regulador positivo da p53 (supressor tumoral), que tem um papel no desencadeamento da tumorigénese hipofisária (227).

### 1.3 Objetivos da tese

O objetivo geral desta tese foi realizar um estudo de âmbito multicêntrico nacional, acerca dos fatores de risco genético para o desenvolvimento de adenomas hipofisários familiares e esporádicos, em doentes portugueses, de forma a ampliar o conhecimento sobre a tumorigénese hipofisária.

Estipularam-se os seguintes objetivos específicos:

- 1) Identificar variantes germinativas em doentes portugueses com FIPA;
- 2) Identificar variantes germinativas em doentes com macroadenomas hipofisários de início precoce ( $\leq 40$  anos);
- 3) Avaliar a patogenicidade das variantes identificadas;
- 4) Determinar a associação entre os polimorfismos rs2359536, rs10763170 e rs17083838 e a susceptibilidade para o desenvolvimento de adenomas hipofisários;
- 5) Usar a informação genética no seguimento dos doentes com adenomas hipofisários.

## 2. Materiais e Métodos



## 2. Materiais e Métodos

## **2.1 Estudo 1 - Construção de uma base de dados de variantes germinativas no gene *AIP*, identificadas na literatura, em doentes com adenomas hipofisários esporádicos e familiares**

### **2.1.1 Pesquisa Bibliográfica**

A base de dados com todas as variantes germinativas identificadas no gene *AIP*, desde a sua associação a adenomas hipofisários isolados em 2006 até ao presente, foi elaborada através da pesquisa na base de dados de literatura do NCBI PubMed de artigos em Inglês, usando os termos de pesquisa “*AIP Mutations*” e “*Pituitary Adenomas*”/“*AIP variants*” e “*Pituitary Adenomas*”. Foram incluídas variantes consideradas causais da doença pelos autores, como também variantes benignas nomeadamente polimorfismos. Estes artigos foram analisados com o intuito de verificar se haveria duplicação de dados, assim, famílias que haviam sido incluídas em estudos de variantes anteriores foram excluídas da análise.

Cada variante publicada foi verificada quanto à sua precisão por comparação com a sequência normal do gene *AIP*. Os erros devido à atribuição incorreta de números de nucleótidos, ou codões, ou erros de tradução entre codão e resíduos de aminoácidos, foram corrigidos sempre que possível. As variantes descritas na literatura apenas ao nível do aminoácido foram também descritas ao nível nucleotídico, sempre que foi possível prever a base alterada usando o código genético. A nomenclatura das variantes foi realizada com base na sequência de referência cDNA do gene *AIP* (GenBank NM\_003977.4).

### **2.1.2 Critérios de patogenicidade**

Em 2015, o *American College of Medical Genetics (ACMG)*, a *Association for Molecular Pathology* publicaram novas diretrizes para a interpretação da patogenicidade de variantes genómicas (228). Estas diretrizes sugerem o uso de um sistema de classificação de cinco categorias: (1) benignas, (2) provavelmente benignas, (3) variantes de significado indeterminados, (4) provavelmente patogénicas ou (5) patogénicas, que se baseia em diferentes critérios de evidência de patogenicidade da variante, como dados populacionais, dados computacionais, funcionais, de segregação, entre outros (228). A patogenicidade das variantes identificadas foi classificada através

## 2. Materiais e Métodos

da ferramenta de interpretação de variantes Franklin (Genoox Ltd, <https://franklin.genoox.com/>). Para melhorar a classificação da patogenicidade das variantes, existem vários dados que devem ser fornecidos ao software Franklin, nomeadamente: 1) estudos funcionais *in vivo* e/ou *in vitro* que manifestem o seu efeito patogénico (229, 230); 2) evidências de outros casos identificados como tendo a mesma variante e fenótipo (231); e/ou 3) casos de segregação familiar da variante. Para obter estas informações, efetuou-se uma revisão da literatura dos estudos funcionais *in vivo* e/ou *in vitro* existentes, bem como de casos de segregação familiar, através da base de dados NCBI PubMed, para cada variante *AIP*.

Para a análise de possíveis *hotspots* mutacionais no gene *AIP*, a frequência de cada variante germinativa identificada foi calculada com base no número total de casos esporádicos e no número total de casos familiares, considerando apenas casos *index*.

### 2.1.3 Análise estatística

Tendo em conta apenas variantes classificadas como patogénicas e provavelmente patogénicas, a frequência das variantes truncadoras (nonsense, frameshift, grandes deleções, alterações em locais de splicing ou que evidenciem alteração de splicing) e não truncadoras (missense, sinónimas, deleções in-frame, intrónicas e de 3'UTR) no gene *AIP* identificadas em casos familiares e esporádicos foram comparadas pelo Teste Qui-quadrado, a fim de obter a razão de probabilidade (OR, *odds ratio*), intervalos de confiança de 95% (IC) e probabilidade de significância (valores de p).

## **2.2 Estudo 2 – Estudo da prevalência de mutações no gene *AIP* em doentes portugueses jovens com macroadenomas hipofisários esporádicos**

### **2.2.1 Doentes**

Este estudo multicêntrico (publicado como artigo científico – Anexo 2) envolveu 218 doentes portugueses jovens recrutados consecutivamente nas principais consultas externas de endocrinologia em Portugal, de 2018 a 2022. A seleção e recolha de amostras biológicas dos doentes ocorreu nos serviços de endocrinologia do Centro Hospitalar Universitário de São João, Porto; Centro Hospitalar Universitário do Porto; Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte; Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central; Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental; Hospital Garcia de Orta, Almada; Instituto Português de Oncologia de Lisboa; Instituto Português de Oncologia de Coimbra; Hospital de Braga; Hospital Divino Espírito Santo, Ponta Delgada. Os médicos destes serviços foram responsáveis pelo fornecimento dos dados clínicos, bem como das amostras de sangue dos doentes.

Foram incluídos doentes com macroadenomas esporádicos (tumor com diâmetro  $\geq 1$  cm) diagnosticados com idade inferior a 40 anos. Foram excluídos doentes com história familiar de adenomas hipofisários (ou seja, com pelo menos um membro da família afetado de primeiro ou segundo grau) ou com evidência de alguma forma sindrómica de adenomas hipofisários. A idade média  $\pm$  desvio padrão (DP) ao diagnóstico foi de  $28,9 \pm 7,5$  anos, 118 doentes tinham menos de 30 anos aquando do diagnóstico, e 20 doentes tinham menos de 18 anos no momento do diagnóstico. A distribuição por género foi de 113 (52%) mulheres e 105 (48%) do sexo masculino. O tipo de adenoma foi baseado no exame histológico, ou no caso dos prolactinomas, no exame clínico, hormonal e radiológico. Oitenta (36,7%) doentes foram diagnosticados com prolactinomas, 61 (28,0%) com somatotrofinomas, 34 (15,6%) com adenomas hipofisários não funcionantes; 14 (6,4%) com corticotrofinomas, 15 (6,9%) com adenomas hipofisários mistos; sete (3,2%) com gonadotrofinomas, um doente com tireotrofinoma, e seis (2,8%) com adenomas com histologia indeterminada. Foi obtido o consentimento informado por escrito de todos os indivíduos e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (Ref. CE-UBI-Pj-2018-027). A descrição clínica dos doentes englobados neste estudo pode ser consultada no Anexo 3.

### **2.2.2 Extração e purificação do DNA a partir de sangue periférico**

O DNA genômico de cada doente foi extraído de leucócitos de sangue periférico, usando o método de *salting-out* (adaptado de Miller *et al.* (232)). Resumidamente, para a lise de eritrócitos, num tubo de centrífuga de 50 mL, adicionaram-se 10 mL de sangue e 30 mL de tampão de lise RBC (*Red blood cell*) a 4°C (RBC: 155 mM NH<sub>4</sub>Cl; 20 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7,4). Após mistura no vórtex, seguiu-se centrifugação a 2500 rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos a 4°C (Allegra™ X-22R, Beckman Coulter, Fullerton, Califórnia, EUA). Repetiu-se o mesmo procedimento de adição de tampão de lise e centrifugação até que o sedimento de células ficasse branco.

Com vista à lise de leucócitos, após ressuspender por vórtex o sedimento de células, adicionaram-se 5 mL de tampão SE (extração secundária) (75 mM NaCl; 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 8,0), 12,5 µL de proteinase K (20 mg/ml) e 500 µl de SDS 10% (dodecilsulfato de sódio) ficando a solução a incubar durante aproximadamente 1 hora a 55°C, num bloco térmico (Star Lab, Chennai, Índia). Cada um dos reagentes tem uma função específica: o tampão SE contém agentes quelantes que se ligam a cofatores de nucleases para evitar a degradação do DNA por estas enzimas, o SDS é um detergente que dissolve a membrana celular e desnatura as proteínas e a proteinase K digere proteínas (233).

Para a precipitação de proteínas adicionaram-se 3 mL de NaCl saturado (6M) e incubou-se novamente a solução a 55°C durante 10 minutos. Em seguida agitou-se no vórtex durante 25 segundos, aos quais se seguiu uma centrifugação a 4000 rpm, durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Com vista à precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado para um novo tubo de centrífuga de 50 mL tendo-se adicionado ao mesmo etanol a 100%, perfazendo duas vezes o volume do sobrenadante. Como o DNA é insolúvel no etanol, quando este reagente é adicionado e após diversas inversões ao tubo de centrífuga as moléculas de DNA agregam-se formando um novelo. Centrifugou-se a 4500 rpm, durante 5 minutos a 4°C e posteriormente rejeitou-se o sobrenadante observando sempre o sedimento de DNA no fundo do tubo de centrífuga. Seguidamente, efetuou-se lavagem do DNA adicionando 1 mL de etanol a 70% e transferiu-se com a ajuda de uma ponta estéril o sedimento de DNA para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, ficando este a secar à temperatura ambiente durante 30 minutos. O sedimento de DNA foi reidratado com 0,1-1 mL de tampão TRIS-EDTA (TE, ácido etilenodiamino tetra-acético de tris), consoante o tamanho do sedimento, e mantido em agitação lenta e permanente durante a noite à temperatura ambiente.

A concentração e o grau de pureza do DNA foram determinados através da medição da densidade ótica de cada amostra por espectrofotometria ultravioleta, usando comprimentos de onda de 260 e 280 nm (*NanoPhotometer Spectrophotometer B-80-3004-33*, Implen GmbH, Munique, Alemanha). O DNA absorve a comprimentos de onda de 260 nm e as proteínas a 280 nm, assim, uma amostra de DNA puro (sem contaminação por proteínas ou RNA) tem um rácio  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,8 e 2,0.

Finalmente, o DNA foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para uso corrente, procedeu-se à diluição de parte do DNA em TE com uma concentração de 100 ng/ $\mu\text{l}$  num volume de 200  $\mu\text{l}$  que ficou armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.3 Reação de polimerização em cadeia

A obtenção de uma grande quantidade de fragmentos de DNA específicos é uma ferramenta indispensável em biologia molecular. A reação de polimerização em cadeia (PCR, *Polymerase chain reaction*), desenvolvida por Mullis *et al.* em 1987 (234), é uma técnica de amplificação enzimática que pode ser utilizada, quando as sequências de nucleótidos nas extremidades de uma região particular de DNA são conhecidas, por forma a obter uma amplificação exponencial de um fragmento específico de DNA (235).

Os doentes foram rastreados para o gene com maior predisposição para o desenvolvimento de adenomas hipofisários, o gene *AIP*. Foram amplificados os 6 exões, sendo que, os oligonucleótidos e as condições otimizadas de funcionamento da PCR foram previamente descritas por Cazabat *et al.* (236). Todos os exões foram amplificados com a *Taq* (*Thermus aquaticus*) polimerase (Dream Taq Green DNA, ThermoScientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Para uma reação de 15  $\mu\text{L}$  foram adicionados cerca de 100 ng de DNA genómico, 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP) (ThermoScientific), 0,25  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido, 1 U de enzima *Taq* polimerase e respetivo tampão contendo 1,5 de  $\text{MgCl}_2$  (Anexo 4).

A reação de PCR decorreu num termociclador (T100TM, Bio-Rad, Califórnia, EUA) com um período inicial de desnaturação de 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ , seguidos de 34 ciclos em que cada um foi composto por 30 segundos de desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 segundos de emparelhamento a  $56^{\circ}\text{C}$  (Anexo 4) e 30 segundos de extensão a  $72^{\circ}\text{C}$ . Decorridos os 34 ciclos, a reação de PCR terminou com um período de extensão final a  $72^{\circ}\text{C}$ , durante 10 minutos.

### 2.2.4 Sequenciação de Sanger

Para a análise mutacional dos genes em estudo recorreu-se à sequenciação de Sanger. Em 1977, Sanger *et al.* (237) descreveram o método de terminação de cadeia didesoxi. Este método consiste na síntese de cadeias a partir do fragmento de DNA de interesse, que são marcadas numa extremidade pela presença de didesoxinucleótidos (ddNTP). Os ddNTPs são idênticos aos dNTPs que a enzima DNA polimerase usa para gerar uma cadeia de DNA a partir de outra cadeia modelo, com o contraste de que os ddNTPs não possuem um grupo 3'-hidroxilo da ribose, resultando na interrupção da polimerização da molécula de DNA. Na prática, a reação catalisada pela DNA polimerase é alimentada com uma mistura de dNTPs e ddNTPs, de modo que a cada adição de um nucleotídeo a enzima possa incorporar qualquer um deles aleatoriamente. Os ddNTPs são marcados por uma molécula de fluoróforo, de modo que cada vez que um deles for incorporado, a reação pare e a molécula resultante emita um sinal que irá reportar o último nucleotídeo incorporado (adenina, timina, citosina ou guanina), uma vez que cada um deles é marcado com um fluoróforo diferente (238). Procedeu-se à eletroforese destas cadeias para determinar a sequência de bases no DNA. Atualmente este processo está facilitado pela utilização de equipamentos de sequenciação automática de DNA. Estes equipamentos possuem detetores de fluorescência que conseguem distinguir os quatro marcadores fluorescentes para timinas, adeninas, citosinas e guaninas (239).

A metodologia inicia-se com a desnaturação de uma amostra de DNA de cadeia dupla para gerar duas cadeias simples, onde um oligonucleótido vai hibridar para se iniciar a reação de polimerização. Nestas reações, os ddNTPs, que se encontram em concentrações mais baixas quando comparando com os dNTPs, são incorporados aleatoriamente nas posições de dNTP correspondente, provocando a interrupção da síntese. Como cada um dos quatro ddNTPs tem incluído um fluorocromo específico, torna-se possível a identificação de cada fragmento truncado após a sua migração através do gel de eletroforese e, como tal, a sequência de DNA pode ser determinada pela ordem em que cada fragmento passa através do detetor de fluorescência (239).

Antes de realizar a reação de sequenciação, para confirmar se ocorreu amplificação dos fragmentos de DNA que pretendíamos, efetuou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1%, tendo sido utilizado na corrida 5 µL do produto de PCR e 2 µL do marcador apropriado (*GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Os fragmentos foram visualizados num transiluminador ultravioleta (Uvitec, Cambridge, Reino Unido) e fotografados usando o software *FireReader* (Versão 15.15, Uvitec, Cambridge, Reino Unido). O restante produto foi

purificado enzimaticamente utilizando-se as enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina (EXO-FAST, Amersham Science, USB, Cleveland, Ohio, EUA). Adicionou-se a cada amostra 0,75 µL de EXO-FAST (na proporção EXO:FAST de 1:2) e incubou-se durante 15 minutos a 37°C seguidos de 15 minutos a 80°C.

A Sequenciação por Sanger das amostras de DNA foi realizada pela empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal) através de sequenciação bidirecional utilizando um sequenciador de DNA semiautomático (ABI 3730XL, Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A preparação das mesmas foi feita de acordo com os requisitos da empresa e consistiu em colocar 5 µL de DNA purificado ( $\geq 20$  ng/µL), 3 µL de cada oligonucleótido (10 µM) e 5 µL de água destilada estéril em um dos 96 poços que constituem uma placa de sequenciação (*Sapphire*, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria). Por fim, selaram-se os poços da placa com as respectivas tiras de tampas (*Sapphire 8-cap strip*, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria).

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de referência existentes no NCBI (*National Center for Biotechnology and Information*) usando o programa de análise ChromasPro (Versão 2.1.6, Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Queensland, Austrália).

Todas as mutações identificadas foram confirmadas por PCR e sequenciadas nas duas direções do DNA *Forward* e *Reverse*. As variantes identificadas foram designadas tendo por base a nomenclatura padrão (240).

### **2.2.5 Critérios de patogenicidade**

Os SNPs são alterações de um único par de bases no DNA genómico presente em indivíduos normais, em algumas populações, com uma frequência igual ou superior a 0,01 (241). No entanto, após o aparecimento de métodos de sequenciação de nova geração (NGS, *Next Generation Sequencing*), o limite que distingue variantes raras de variantes comuns foi alvo de grande discussão na comunidade científica, sendo que vários autores estabeleceram um limite de referência. Por exemplo, Frazer *et al.* (242) sugeriram em 2009 que uma variante deverá ser considerada rara quando possuir uma frequência alélica  $<0,01$ , no entanto em 2011, Gorlov *et al.* (243) sugeriram que o limite seria 0,05.

Atualmente, existe um maior consenso entre a comunidade científica, sendo que variantes raras são definidas como aquelas com frequência  $<0,01$ , as variantes comuns

## 2. Materiais e Métodos

têm frequência  $>0,05$  e entre  $0,01-0,05$  estão definidas as variantes de baixa frequência (*low frequency*) (244, 245, 246). Foi implementada ainda outra definição para variantes com frequência inferior a  $0,001$ , sendo classificadas como variantes ultra-raras (245).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciação, variantes que se pensava serem raras numa população foram encontradas em frequências superiores a  $0,01$ . Para além disso, verifica-se ainda uma ausência de associação de algumas variantes raras com doenças humanas. Ao comparar populações separadas geograficamente, por vezes verifica-se que uma mutação causadora de doença numa população é inofensiva noutra e vice-versa (247). Assim, uma variante não deve ser classificada de acordo apenas com a sua frequência na população, nem apenas com a sua capacidade em causar doença. Esta dificuldade na categorização das diferentes alterações encontradas no DNA tornou necessário estabelecer determinados critérios de classificação.

As variantes identificadas neste estudo foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios: (1) Localizadas nos exões do gene *AIP* e até dez nucleótidos das regiões de splicing, de acordo com a sequência de referência do DNA complementar (cDNA) do gene *AIP* (GenBank NM\_003977.4) e (2) Ausente ou raras (frequência populacional  $<0,01$ ) nas bases de dados de genoma gnomAD (*Genome Aggregation Database*) (disponível em <https://gnomad.broadinstitute.org/>) (248). As variantes selecionadas foram depois classificadas pelos critérios do *American College of Medical Genetics*, através de pesquisa pelo Varsome (em <https://varsome.com/>) (249).

Variantes classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas foram consideradas mutações causais da doença.

A frequência das mutações do gene *AIP* foi determinada em doentes diagnosticados com idade inferior a 40, 30 e 18 anos.

### **2.2.6 Clonagem com o vetor pJET1.2/blunt**

Cada mutação *frameshift* heterozigótica do gene *AIP* foi confirmada por clonagem dos produtos de PCR utilizando o Kit *CloneJET PCR Cloning* (ThermoScientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) (Anexo 5), seguindo-se a sequenciação de cada alelo.

O produto de PCR foi obtido de acordo com o ponto 2.2.3, contudo a purificação foi efetuada usando o kit *GeneJET PCR Purification* (ThermoScientific, Thermo Fisher

Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Adicionou-se um volume de 1:1 de *Binding Buffer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) à mistura de PCR, e agitou-se num vórtex. De seguida, transferiu-se a solução para uma coluna de sílica disponível no kit *GeneJET PCR Purification*, e centrifugou-se a 13000 rpm por 30-60 segundos. Acrescentaram-se 700 µL de *Wash Buffer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) à coluna e realizou-se uma nova centrifugação a 13000 rpm durante um minuto, seguido de mais um minuto de forma a remover a totalidade de *Wash Buffer*. Por fim, transferiu-se a coluna para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril e adicionaram-se 30 µL de *Elution Buffer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para o centro da coluna. Centrifugou-se a 13000 rpm durante um minuto.

Após purificação do produto de PCR, procedeu-se à determinação da concentração e grau de pureza do DNA (descrito no ponto 2.2.2). De seguida, realizou-se a reação de ligação usando o kit *CloneJET PCR Cloning Kit* (ThermoScientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) numa proporção de 3:1 (3 de DNA a clonar para 1 de vetor) e, através da fórmula indicada pelo fabricante, obteve-se a quantidade de DNA a clonar. Para cada mutação *frameshift* foi realizado o protocolo de Clonagem *Sticky-End* de acordo com o kit, usando a seguinte proporção de reagentes: 10 µL de *Reaction Buffer*, 1 µL de DNA a clonar ( $\geq 20$  ng), 1 µL de *DNA Blunting Enzyme*, 1 µL de pJET1.2/Blunt e 1 µL de DNA ligase.

A reação ficou a incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos. De seguida, procedeu-se à transformação de células de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$ , tendo-se usado uma alíquota (50 µL) de células competentes por cada transformação que se efetuou. Antes que as células estivessem completamente descongeladas, adicionou-se a cada uma das alíquotas de células a totalidade da reação. A reação foi incubada no gelo durante 30 minutos, seguindo-se um choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Posteriormente foi colocada em gelo por dois minutos. Terminado o choque térmico, transferiu-se a reação para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril, adicionaram-se 200 µL de Luria-Bertani sem antibiótico e colocaram-se os tubos num agitador orbital (Agitorb 200, Aralab, Rio de Mouro, Portugal) a 37°C, 250 rpm durante duas horas. Centrifugou-se o tubo com as células a 8000 rpm durante um minuto e descartaram-se 100 µL. Após ressuspensão do pellet das células nos restantes 100 µL da reação, plaqueou-se a totalidade da reação numa placa de Luria-Bertani com agar e ampicilina (100 mg/mL) e ficou a incubar numa estufa (Binder, Tuttlingen, Germany) a 37°C, durante a noite.

## 2. Materiais e Métodos

Para podermos observar o alelo normal e o alelo mutado das mutações *frameshift*, realizou-se o *Colony PCR* que consiste num *colony screening* por PCR, seguido do protocolo de sequenciação de Sanger (ver ponto 2.2.4). Para isso, picou-se cada uma das colónias existentes na placa de Luria-Bertani com agar e ampicilina e ressuspendeu-se cada colónia em 20 µL de água destilada estéril, em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL estéreis. De seguida, o vetor foi desnaturado durante 10 minutos a 95°C, e agitado no vórtex. Para uma reação de 20 µL foram adicionados 1,5 µL da solução com o vetor desnaturado, 5 U de enzima *Taq* polimerase e respetivo tampão contendo 1,5 de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de cada dNTP (ThermoScientific) e 10 µM de cada oligonucleótido fornecidos pelo kit de clonagem (pJET1.2 *Forward* e pJET1.2 *Reverse*).

A reação de PCR decorreu num termociclador (T100™, Bio-Rad, Califórnia, EUA) com um período inicial de desnaturação de 3 minutos a 95°C, seguidos de 25 ciclos em que cada um foi composto por 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de emparelhamento a 60°C e um minuto de extensão a 72°C. Decorridos os 25 ciclos, a reação de PCR terminou com um período de extensão final a 72°C, durante 5 minutos.

A Sequenciação por Sanger das amostras bem como a análise de seqüências foram realizadas como descrito no passo 2.2.4.

## **2.3 Estudo 3 - Identificação de mutações germinativas em doentes portugueses com macroadenomas hipofisários esporádicos de início precoce, através da análise de um painel multigénico**

### **2.3.1 Doentes**

Este estudo multicêntrico incluiu 225 doentes portugueses recrutados nas principais consultas externas de endocrinologia em Portugal, de 2018 a 2023. A seleção e recolha de amostras biológicas dos doentes ocorreu nos serviços de endocrinologia do Centro Hospitalar Universitário de São João, Porto; Centro Hospitalar Universitário do Porto; Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte; Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central; Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental; Hospital Garcia de Orta, Almada; Instituto Português de Oncologia de Lisboa; Instituto Português de Oncologia de Coimbra; Hospital de Braga; Hospital Divino Espírito Santo, Ponta Delgada. Os médicos destes serviços foram responsáveis pelo fornecimento dos dados clínicos, bem como das amostras de sangue dos doentes.

Foram incluídos doentes com macroadenomas esporádicos (tumor com maior diâmetro  $\geq 1$  cm) diagnosticados com idade inferior a 40 anos. Foram excluídos doentes com história familiar de adenomas hipofisários (ou seja, com pelo menos um membro da família afetado de primeiro ou segundo grau) ou com evidência de alguma forma síndromica de adenomas hipofisários. A idade média  $\pm$  DP no momento do diagnóstico foi de  $29,1 \pm 7,3$  anos, 122 doentes tinham menos de 30 anos no momento do diagnóstico e 25 doentes tinham menos de 18 anos no momento do diagnóstico. A distribuição por gênero foi 116 (51,6%) mulheres e 109 (48,4%) homens. A classificação do tumor foi baseada no exame histológico ou, no caso dos prolactinomas, no exame clínico, hormonal e radiológico.

Oitenta e um (36,0%) doentes foram diagnosticados com prolactinomas, 62 (27,6%) com somatotrofinomas, 37 (16,4%) com adenomas hipofisários não funcionantes, 16 (7,1%) com adenomas hipofisários mistos, 15 (6,7%) com corticotrofinomas, sete (3,1%) com gonadotrofinomas, um doente (0,4%) com tireotrofinoma e seis (2,7%) com adenomas com histologia indeterminada. Um subconjunto desta coorte foi previamente estudado por sequenciamento convencional (Sanger) para o gene *AIP* (Estudo 2). A população de controlo compreendeu 298 indivíduos portugueses (50 dadores de sangue saudáveis e 248 doentes com doenças não relacionadas). O estudo foi aprovado pela

## 2. Materiais e Métodos

Comissão de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (Ref: CE-UBI-Pj-2018-027), e o consentimento informado por escrito foi obtido de todos os indivíduos. A descrição clínica dos doentes englobados neste estudo pode ser consultada no Anexo 3.

O DNA de cada doente foi extraído de leucócitos do sangue periférico usando métodos previamente descritos (ver passo 2.2.2).

### 2.3.2 Sequenciação completa do exoma

Durante muitos anos, o custo da sequenciação de um genoma completo manteve-se extremamente caro para o seu uso rotineiro na prática clínica, com um custo estimado de 20-25 milhões de dólares, por genoma, em 2006 (250). No entanto, desde 2008, quando as técnicas de NGS surgiram no contexto da investigação, verificou-se uma redução significativa dos custos de sequenciação. As técnicas de NGS permitem sequenciar todo o genoma, através da sequenciação do genoma completo (WGS, *Whole Genome Sequencing*) ou sequenciação apenas das regiões codificantes, designadas por exões (WES, *Whole Exome Sequencing*), de forma mais rápida, com maior profundidade e sensibilidade. A redução de custos tornou a aplicação clínica de WGS e de WES mais viável (251).

As amostras de DNA foram submetidas a análise WES na BGI Genomics (Hong Kong, China). A preparação das mesmas foi feita de acordo com os requisitos da empresa e consistiu em diluir, em água destilada estéril, as amostras para uma concentração  $\geq 12,5$  ng/ $\mu$ L num volume mínimo de 15  $\mu$ L, em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Todos os tubos foram identificados com um código numérico para manter a confidencialidade das amostras de DNA. Para verificar a qualidade e integridade do DNA, efetuou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1%, tendo sido utilizado na corrida 5  $\mu$ L da amostra de DNA genómico diluída em 1  $\mu$ L de LD (*6X DNA Loading Dye*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), e 2  $\mu$ L do marcador apropriado (*VC 1kb DNA Ladder*, Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malásia). Os fragmentos foram visualizados num transiluminador ultravioleta (Uvitec, Cambridge, Reino Unido) e fotografados usando o software *FireReader* (Versão 15.15, Uvitec, Cambridge, Reino Unido). Posteriormente, as amostras foram enviadas para os serviços da BGI Genomics em gelo seco, juntamente com a informação da concentração (ng/  $\mu$ L) e da integridade do DNA de cada amostra.

Na BGI Genomics, as bibliotecas de captura direcionadas foram geradas usando o kit exoma Agilent SureSelectXT All Exon V6 kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), e as amostras foram sequenciadas numa plataforma DNBSEQ™ produzindo leituras emparelhadas de 100 pb. Os arquivos FASTQ foram processados seguindo as melhores práticas recomendadas para análise de variantes com o Genome Analysis Toolkit (GATK) do Broad Institute (252), incluindo o uso do Burrows-Wheeler Aligner v0.7.17 (253) para alinhamento com o genoma humano de referência GRCh37/hg19, GATK para recalibração de qualidade e realinhamento indel e GATK HaplotypeCaller v4.1.4.1 para detecção de SNPs e InDels.

### 2.3.3 Seleção de genes para identificação de variantes

Foi elaborado um painel genético virtual composto por 29 genes nos quais já foram identificadas variantes germinativas em doentes com adenomas hipofisários familiares e esporádicos (60, 129, 254), e que foram previamente descritos na Tabela 1, nomeadamente: *AIP* (NM\_003977.3), *CABLES1* (NM\_001100619.2), *CDH23* (NM\_022124.5), *CDKN1A* (NM\_078467.3), *CDKN1B* (NM\_004064.4), *CDKN2B* (NM\_004936.4), *CDKN2C* (NM\_001262.3), *DICER1* (NM\_177438.3), *GNAS* (NM\_000516.7), *GPR101* (NM\_054021.1), *MAX* (NM\_002382), *MEN1* (NM\_130799.2), *MLH1* (NM\_000249.4), *MSH2* (NM\_000251.3), *MSH6* (NM\_000179.3), *NF1* (NM\_000267.3), *PMS2* (NM\_000535.7), *PRKAR1A* (NM\_002734.5), *PRKACA* (NM\_002730.4), *PRKACB* (NM\_182948.4), *RET* (NM\_020975.4), *SDHA* (NM\_004168.3), *SDHAF2* (NM\_017841.2), *SDHB* (NM\_003000.3), *SDHC* (NM\_003001.5), *SDHD* (NM\_003002.3), *TP53* (NM\_000546.6), *USP8* (NM\_005154.5), *VHL* (NM\_000551.3).

### 2.3.4 Critérios de patogenicidade

As variantes genéticas foram filtradas de acordo com os seguintes critérios cumulativos: 1) Localização num dos 29 genes previamente implicados em adenomas hipofisários; 2) Localização nos transcritos codificantes utilizados pelo Banco de Dados de Mutações do Genoma Humano (HGMD, *Human Gene Mutation Database*) (18); 3) Localização dentro das regiões codificantes e até dez nucleotídeos das regiões de splicing e 4) Frequência alélica populacional inferior a 0,001 no gnomAD e 1000G (19).

## 2. Materiais e Métodos

As variantes selecionadas pelos critérios mencionados acima foram classificadas em cinco categorias: benignas (B), provavelmente benignas (LB), variantes de significado indeterminado (VUS), provavelmente patogénicas (LP) ou patogénicas (P), de acordo com os critérios do ACMG (20) e as recomendações da ClinGen (255), utilizando a ferramenta de interpretação de variantes baseada na web (Franklin by Genoox, referência hg19, <https://franklin.genoox.com/>, acessada em 30 de março de 2024). As variantes classificadas como de significado indeterminado, provavelmente patogénicas e patogénicas foram consideradas potencialmente nefastas. As variantes filtradas foram despistadas numa base de dados interna de 298 indivíduos de controlo portugueses de modo a avaliar a possibilidade de as variantes serem polimorfismos comuns específicos da população.

Para determinar se as variantes identificadas já tinham sido relatadas anteriormente na literatura, foi feita uma pesquisa nas seguintes bases de dados: HGMD (<https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), Genomenon Mastermind (<https://mastermind.genomenon.com/>) e PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

As variantes classificadas como patogénicas e provavelmente patogénicas foram confirmadas por sequenciação de Sanger (ver passo 2.2.4). Os oligonucleótidos foram desenhados através do software *Primer 3 Plus* (256) para sequenciar regiões de DNA a montante e a jusante das variantes identificadas (Anexo 4). Após amplificação por PCR, os produtos foram sequenciados utilizando um sequenciador de DNA semiautomático (STAB VIDA, Caparica, Portugal; e ABI 3730XL, Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As sequências obtidas foram comparadas com os resultados do WES.

## 2.4 Estudo 4 – Estudo de associação genética caso-controlo

### 2.4.1 Doentes

Este estudo de associação genética (publicado como artigo científico – Anexo 6) foi desenhado como um estudo retrospectivo de associação caso-controlo. Os casos incluíram 570 doentes portugueses com adenomas hipofisários esporádicos (275 homens e 295 mulheres; idade de diagnóstico média  $\pm$  DP = 43,5  $\pm$  16,3 anos), recrutados em Serviços de Endocrinologia em Portugal. A seleção e recolha de amostras biológicas dos doentes ocorreu nos serviços de endocrinologia do Centro Hospitalar Universitário de São João, Porto; Centro Hospitalar Universitário do Porto; Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte; Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central; Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental; Hospital Garcia de Orta, Almada; Instituto Português de Oncologia de Lisboa; Instituto Português de Oncologia de Coimbra; Hospital de Braga; Hospital Divino Espírito Santo, Ponta Delgada. Os médicos destes serviços foram responsáveis pelo fornecimento dos dados clínicos, bem como das amostras de sangue dos doentes.

Os doentes foram selecionados a partir do exame histológico ou, no caso de prolactinomas, através de exame clínico, hormonal e imagiologia. Os subtipos de tumor foram classificados como somatotrofinoma (n = 161), prolactinoma (n = 154), não-funcionante (n = 138), gonadotrofinoma (n = 40), corticotrofinoma (n = 35), tireotrofinoma (n = 4), misto (n = 28) e indeterminado (n = 10). O tamanho do tumor foi baseado no maior diâmetro, e foi classificado como macroadenoma ( $\geq$  1 cm, n = 483), microadenoma (<1 cm, n = 65) e indeterminado (n = 22). Foram excluídos deste estudo doentes com adenomas hipofisários síndromicos.

O grupo controlo foi composto por 546 doadores de sangue saudáveis não aparentados (264 homens e 282 mulheres; idade média  $\pm$  DP = 38,1  $\pm$  12,1 anos), recrutados em centros de doação de sangue, sem história clínica conhecida de doença hipofisária, e provenientes das mesmas regiões geográficas que os doentes. Todos os participantes eram portugueses caucasianos. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (Ref: CE-UBI-Pj-2018-027), e o consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes ou dos seus responsáveis legais. A descrição clínica dos doentes englobados neste estudo pode ser consultada no Anexo 3.

A extração e purificação do DNA de cada doente foi realizada de acordo com o descrito no passo 2.2.2.

### 2.4.2 Genotipagem

Os polimorfismos *NEBL* rs2359536, *PCDH15* rs10763170 e *CDK8* rs17083838 foram selecionados para este estudo uma vez que, segundo o estudo GWAS conduzido por Ye *et al.* em 2015 na população chinesa (115), estas variantes estão entre as mais fortemente associadas com adenomas hipofisários esporádicos. As MAF relatadas no gnomAD para Europeus Não-Finlandeses são 0,337 (rs2359536 alelo C), 0,409 (rs10763170 alelo T) e 0,059 (rs17083838 alelo A), respetivamente. Para a genotipagem dos SNPs rs2359536, rs10763170 e rs17083838 foi utilizado o kit *TaqMan SNP Genotyping Assay* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, com recurso às sondas TaqMan® disponíveis comercialmente (*Assay ID*: C-1974242-10 para rs2359536; *Assay ID*: C-411660-10 para rs10763170 e *Assay ID*: C-34697393-10 para rs17083838; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Anexo 7).

A tecnologia TaqMan® foi descrita por Holland e colaboradores, em 1991, e baseia-se na deteção da atividade exonucleotídica 5'-3' da *Taq* DNA polimerase (257). É utilizada uma sonda marcada com um fluoróforo repórter na extremidade 5' (por exemplo FAM ou VIC) e um fluoróforo *quencher* (silenciador) na extremidade 3', capaz de emparelhar especificamente na sequência polimórfica de interesse. Quando a sonda está intacta, a transferência de energia fluorescente ocorre de forma que a emissão pelo repórter seja absorvida pelo *quencher* (258). Durante a fase de extensão no ciclo de *PCR*, a atividade exonucleolítica da *Taq* DNA polimerase hidrolisa a sonda TaqMan®, permitindo que o fluoróforo repórter seja separado do *quencher*, resultando num aumento de emissão de fluorescência pelo repórter que será monitorizado em tempo real durante a fase de amplificação e quantificado (258).

Para uma reação de amplificação em tempo real de 12,5 µL foram utilizados 6,25 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)* e 0,625 µL de *TaqMan® Genotyping Assay Mix (20X)*, num tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Todo o processo de pipetagem foi feito em gelo e ao abrigo da luz, uma vez que a exposição excessiva à luz pode afetar as sondas fluorescentes. Após agitar a reação no vórtex, centrifugou-se durante 5-10 segundos a fim de eliminar possíveis bolhas de ar na solução. De seguida, pipetou-se 6,875 µL da reação e 5,625 µL de 100 ng/µL de DNA genómico por poço numa placa de 96 poços (*Hard-Shell® 96-Well PCR Plates 200 µL*, Bio-Rad, Califórnia, EUA). Por fim, selou-se a placa com *Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film* (Bio-Rad, Califórnia, EUA) e centrifugou-se durante 5-10 segundos a fim de eliminar possíveis bolhas de ar na solução. A reação de *PCR* em tempo real decorreu num termociclador em tempo real

(*CFX Connect Real-Time PCR System*, Bio-Rad, Califórnia, EUA) com um período inicial de desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos em que cada um foi composto por 15 segundos de desnaturação a 95°C e um minuto de emparelhamento/extensão a 60°C. Foram usados controlos negativos em que os diferentes tipos de amostras foram substituídos por água destilada estéril. A análise dos resultados dos ensaios de PCR em tempo real foi efetuada de acordo com a interpretação dos gráficos obtidos com base nos valores de fluorescência detetados automaticamente pelo equipamento e usando o programa informático recomendado pelo fabricante (*CFX Manager™ Software*, Versão 3.1, Bio-Rad, Califórnia, EUA). Os métodos de genotipagem foram validados pela sequenciação de amostras representativas de cada genótipo de acordo com o descrito no ponto 2.2.4.

### **2.4.3 Análise Estatística**

Para a realização das análises descritivas e de associação dos polimorfismos rs2359536, rs10763170 e rs17083838 com os adenomas hipofisários, foi usada a ferramenta de associação genética de SNPs (SNPStats, Versão 3.6) disponível online em <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats> (259). O software SNPStats foi também utilizado para calcular a frequência do genótipo para cada alelo, usando a equação de equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências foram comparadas por análise de regressão logística a fim de obter a razão de probabilidade, intervalos de confiança de 95% e probabilidade de significância, ajustados para sexo e idade, para explicar qualquer efeito dessas variáveis nas frequências de alelos e genótipos. O melhor modelo de hereditariedade para cada SNP (dominante, recessivo, codominante ou aditivo) foi selecionado de acordo com o Critério de Informação de Akaike (AIC). A Correção de Bonferroni para comparações múltiplas foi usada para corrigir a significância estatística, a qual foi definida para  $p < 0,0167$  ( $p < 0,05$ , dividido pelo número de SNPs analisados). A ferramenta SNPStats foi igualmente usada para a análise múltipla de SNPs.

## 2. Materiais e Métodos

### 3. Resultados



### 3. Resultados

### **3.1 Estudo 1 - Construção de uma base de dados de variantes germinativas no gene *AIP*, identificadas na literatura, em doentes com adenomas hipofisários esporádicos e familiares**

#### **3.1.1 Atualização da base de dados de variantes germinativas no gene *AIP***

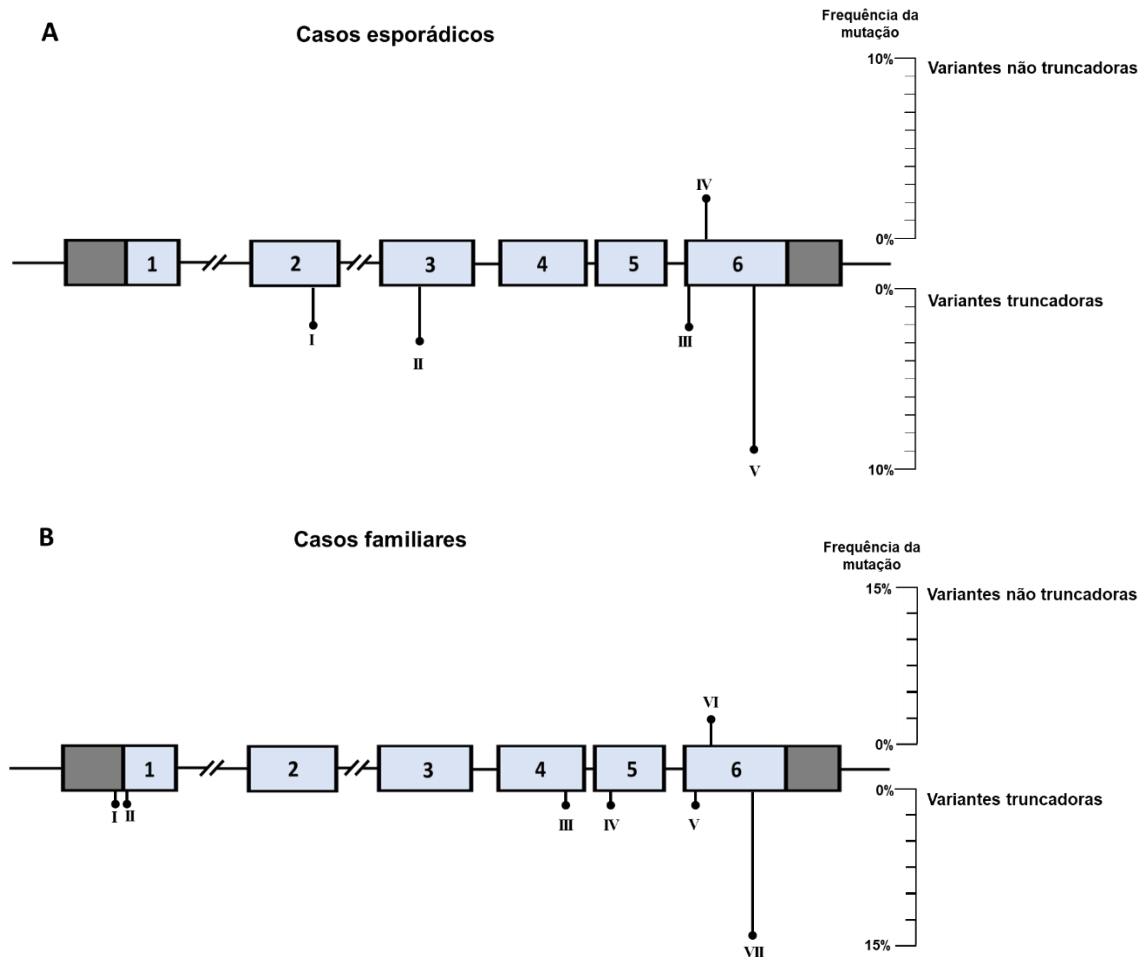
Nesta revisão bibliográfica, obteve-se um total de 235 artigos nos quais foram relatadas 158 variantes germinativas distintas entre 291 casos de adenomas hipofisários esporádicos, 71 casos familiares index e 200 indefinidos (não estando disponível informação para os inserir numa das duas categorias anteriores). As variantes germinativas (Anexo 8), distribuídas por toda a região codificadora de 1236 pb e zonas de *splice-site* do gene *AIP*, consistiram em variantes *nonsense* em 32,9% do número total de doentes, variantes *missense* em 32,4%, deleções e inserções *frameshift* em 11,6%, deleções ou inserções *in-frame* em 5,8%, deleções totais ou de alguns exões do gene em 4,3%, variantes intrónicas ou 3'UTR em 5,9%, variantes que alteram o *splicing* em 5,5% e variantes sinónimas em 1,6%.

#### **3.1.2 Patogenicidade das variantes germinativas no gene *AIP***

A classificação da patogenicidade de algumas variantes relatadas não é totalmente explícita devido a esta informação não se encontrar presente em todos os artigos considerados. Por esta razão, foi necessário verificar a patogenicidade das 158 variantes diferentes, tornando possível a sua classificação de forma uniforme. Foi utilizada toda a informação disponível acerca de estudos funcionais *in vivo* e/ou *in vitro*, bem como de casos de segregação familiar, das 158 variantes identificadas no total de 562 doentes. Após esta análise, 35,4% do total dos doentes apresentavam variantes patogénicas, 24,0% apresentavam variantes provavelmente patogénicas, 17,1% apresentavam variantes de significado indeterminado, 5,7% variantes provavelmente benignas e 17,8% variantes benignas (Anexo 8). As 86 variantes classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas foram identificadas em 334 indivíduos que correspondem a 59,4% do total de doentes. As restantes 72 variantes (classificadas como benignas, provavelmente benignas e de significado indeterminado) não apresentam evidência suficiente para associação à doença.

### 3. Resultados

Várias variantes classificadas como patogénicas e provavelmente patogénicas, foram partilhadas por casos com adenomas hipofisários esporádicos e/ou familiares index, indicando assim potenciais *hotspots* mutacionais ou efeitos fundadores (Figura 11 e Tabela 2A e 2B).



**Figura 11.** Representação esquemática do gene *AIP* e das variantes patogénicas e provavelmente patogénicas mais frequentemente encontradas neste gene em doentes com adenomas da hipófise. O gene *AIP* humano é constituído por 6 exões e codifica uma proteína de 330 aminoácidos. A região codificadora (indicada pela região azul) está organizada em 6 exões. **(A)** São apresentados os locais das 5 variantes germinativas (I-V) que ocorrem com uma frequência > 1,5% (Tabela 2A) em casos esporádicos e as respetivas frequências (escala apresentada à direita) são indicadas pelas linhas verticais acima do gene. Estas variantes germinativas são: I, c.241C>T; II, c.350delG; III, c.804C>A; IV, c.811C>T; V, c.910C>T. **(B)** Os locais das 7 variantes germinativas (I-VII) que ocorrem com uma frequência > 1,5% (Tabela 2B) em casos familiares index são mostrados e as respetivas frequências (escala mostrada à direita) são indicadas pelas linhas verticais acima do gene. Estas variantes germinativas são: I, c.1-?\_993+?del; II, c.1104\_-109\_279+578 III, c.521\_525delAGAAG; IV, c.649C>T; V, c.805\_825dupTTCAAGCGGGCAAGGCCAC; VI, c.811C>T; VII, c.910C>T.

**Tabela 2A.** Variantes patogénicas e provavelmente patogénicas na linha germinativa do *AIP* que ocorrem em mais de 1,5% do total de 291 casos esporádicos.

Mutação <sup>(a)</sup>	Alteração da sequência de DNA <sup>(b)</sup>	Exão	Codão	Efeito previsto	Frequência (%) <sup>(c)</sup>
I	c.241C>T	2	81	ns, p.Arg81Ter	2,1
II	c.350delG	3	117	fs, p.Gly117AlafsTer39	3,1
III	c.804C>A	6	268	ns, p.Tyr268Ter	2,4
IV	c.811C>T	6	271	ms, p.Arg271Trp	2,4
V	c.910C>T	6	304	ns, p.Arg304Ter	8,9

<sup>a</sup> Número da variante conforme referido na Figura 2A.

<sup>b</sup> As variantes estão numeradas em relação à sequência de referência do cDNA da *AIP* (NM\_003977.2).

<sup>c</sup> Frequências das variantes germinativas independentes relatadas no gene *AIP* em casos esporádicos de adenomas hipofisários.

fs, variante *frameshift*; ms, variante *missense*; ns, variante *nonsense*.

**Tabela 2B.** Variantes patogénicas e provavelmente patogénicas na linha germinativa da *AIP* que ocorrem em mais de 1,5% do total de 71 casos familiares index.

Mutação <sup>(a)</sup>	Alteração da sequência de DNA <sup>(b)</sup>	Exão	Codão	Efeito previsto	Frequência (%) <sup>(c)</sup>
I	c.1-?_993+?del	-	-	Deleção do gene	2,8
II	c.1104_-109_279+578	-	-	Deleção exão 1 e 2	2,8
III	c.521_525delAGAAG	4	174	fs, p.Glu174GlyfsTer47	2,8
IV	c.649C>T	5	217	ns, p.Gln217Ter	2,8
V	c.805_825dupTTCAAGCGGGGCAAGGCCAC	6	269	if, p.Phe269_His275dup	2,8
VI	c.811C>T	6	271	ms, p.Arg271Trp	4,2
VII	c.910C>T	6	304	ns, p.Arg304Ter	14,1

<sup>a</sup> Número da variante conforme referido na Figura 2B.

<sup>b</sup> As variantes estão numeradas em relação à sequência de referência do cDNA da *AIP* (NM\_003977.2).

<sup>c</sup> Frequências das variantes germinativas independentes relatadas no gene *AIP* em casos index familiares de adenomas hipofisários.

fs, variante *frameshift*; if, variante *in-frame*; ms, variante *missense*; ns, variante *nonsense*.

A comparação do tipo de variante (truncadoras e não truncadoras), entre casos esporádicos e familiares (casos index), tendo em conta variantes patogénicas e

### 3. Resultados

provavelmente patogénicas (Tabela 3), não evidenciou diferenças estatisticamente significativas.

**Tabela 3.** Análise estatística de variantes patogénicas e provavelmente patogénicas truncadoras e não truncadoras entre casos esporádicos e familiares.

	<b>Esporádicos, n (%)</b>	<b>Familiares, n (%)</b>	<b>OR (95% IC)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Truncadoras</b>	109 (83,2%)	42 (79,2%)		
<b>Não Truncadoras</b>	22 (16,8%)	11 (20,8%)	1,30 (0,58-2,91)	0,526

n, número; OR, razão de probabilidades; IC, intervalo de confiança.

## **3.2 Estudo 2 – Estudo da prevalência de mutações no gene *AIP* em doentes portugueses com macroadenomas hipofisários esporádicos**

### **3.2.1 Descobertas genéticas**

A análise da sequência de toda a região codificadora do gene *AIP*, incluindo as regiões de limite exão-intrão, revelou que 18 (8,3%) doentes apresentavam 12 variantes raras heterozigóticas. No entanto, oito dessas variantes (c.47G>A (p.Arg16His), c.132C>T (p.Asp44Asp), c.753G>A (p.Leu251Leu), c.891C>A (p.Ala297Ala), c.896C>T (p.Ala299Val), c.\*14C>A, c.\*60G>C e c.\*64G>C) foram excluídas deste estudo por terem sido classificadas como benignas de acordo com os critérios da ACMG (Tabela 4). As quatro variantes restantes (c.158\_165delGCCGGGCT (p.Ser53Thrfs\*36), c.241C>T (p.Arg81\*), c.343delC (p.Leu115Trpfs\*41) e c.736G>T (p.Glu246\*)) foram classificados como patogénicas ou provavelmente patogénicas (Tabela 4, Figura 12) e encontram-se distribuídas ao longo do gene (Figura 13).

Assim, 1,8% (4/218) dos doentes com macroadenomas hipofisários esporádicos foram considerados como tendo mutações causais no gene *AIP*. Os quatro doentes com mutações *AIP* foram diagnosticados antes dos 30 anos de idade. Em doentes diagnosticados com menos de 30 anos, a prevalência de mutações *AIP* neste grupo foi de 3,4% (4/118). Na faixa etária pediátrica (<18 anos), a prevalência de mutações *AIP* foi de 5,0% (1/20).

**Tabela 4.** Características clínicas e genéticas de doentes com variantes raras no gene *AIP*.

Identificação do doente	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo do adenoma	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (nível do nucleótido, proteína) (a)	Frequência alélica GnomAD	Classificação ACMG (critérios) (b)	Publicado anteriormen
Variantes patogénicas e provavelmente patogénicas								
8215	F	20	Secretor de GH	20	c.158_165delGCCGGGCT (p.Ser53Thrfs*36)	0	LP (PVS1, PM2)	Não
7879	M	22	Secretor de GH	26	c.241C>T (p.Arg81*)	0	P (PVS1, PP5, PM2)	(260)
7329	M	14	Secretor de GH/PRL	14	c.343delC (p.Leu115Trpfs*41)	0	LP (PVS1, PM2)	(261)
7632	F	25	Secretor de GH	28	c.736G>T (p.Glu246*)	0	LP (PVS1, PM2)	Não
Variantes benignas								
8313	M	18	Secretor de PRL	>10	c.47G>A (p.Arg16His)	0,0020820	B (BS1, BS2, BP1, BP4, BP6)	(262)
7637	F	20	Secretor de GH	34	c.132C>T (p.Asp44Asp)	0,0079840	B (BA1, BP4, BP6, BP7)	(263)
8189	M	33	Secretor de GH/PRL/FSH/LH	>10	c.132C>T (p.Asp44Asp)	0,0079840	B (BA1, BP4, BP6, BP7)	(263)
7820	F	37	Secretor de PRL	20	c.132C>T (p.Asp44Asp)	0,0079840	B (BA1, BP4, BP6, BP7)	(263)
8094	F	40	Secretor de PRL	31	c.132C>T (p.Asp44Asp)	0,0079840	B (BA1, BP4, BP6, BP7)	(263)
8343	F	40	Secretor de GH	27	c.753G>A (p.Leu251Leu) c.*14C>A	0,0001757 0,0004049	B (BS1, BS2, BP4, BP7) B (BS1, BS2, BP4)	(264)
8330	F	28	Secretor de ACTH	11	c.891C>A (p.Ala297Ala) c.*64G>A	0,0018130 0,0054470	B (BS1, BS2, BP4, BP6, BP7)	(86, 265)

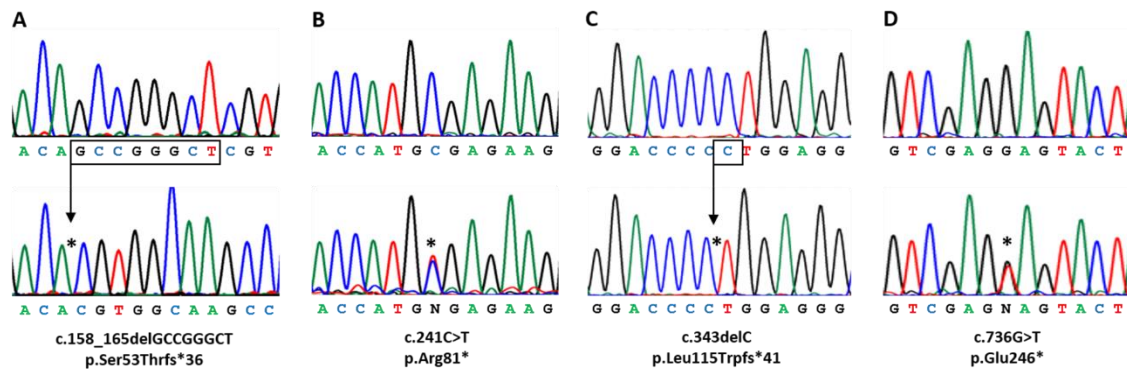
Identificação do doente	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo do adenoma	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (nível do nucleótido, proteína) <sup>(a)</sup>	Frequência alélica GnomAD	Classificação ACMG (critérios) <sup>(b)</sup>	Publicado anteriormente
							B (BS1, BS2, BP4, BP6)	
8075	F	17	Secretor de PRL	>10	c.896C>T (p.Ala299Val)	0,0005441	B (BS1, BS2, BP1, BP4)	(87)
7995	F	26	Secretor de PRL	12	c.896C>T (p.Ala299Val)	0,0005441	B (BS1, BS2, BP1, BP4)	(87)
8182	F	30	Secretor de PRL	15	c.896C>T (p.Ala299Val)	0,0005441	B (BS1, BS2, BP1, BP4)	(87)
8079	F	36	Secretor de ACTH	14	c.896C>T (p.Ala299Val)	0,0005441	B (BS1, BS2, BP1, BP4)	(87)
8158	M	37	Secretor de GH	>10	c.896C>T (p.Ala299Val)	0,0005441	B (BS1, BS2, BP1, BP4)	(87)
8179	M	28	Secretor de PRL	>40	c.*60G>C	0,0078700	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	(266)
7870	M	29	Secretor de PRL	26	c.*60G>C	0,0078700	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	(266)

F, feminino; M, masculino; ACTH, hormona adrenocorticotrófica; FSH, hormona folículo-estimulante; GH, hormona de crescimento; LH, hormona luteinizante; PRL, prolactina; mm, milímetros; gnomAD, *Genome Aggregation Database*.

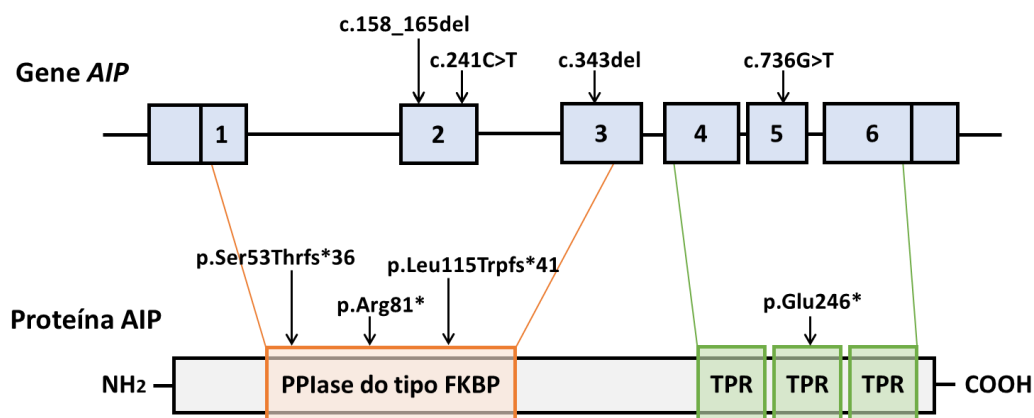
<sup>(a)</sup> Todas as variantes eram heterozigóticas e a numeração dos nucleótidos foi baseada na sequência de referência do transcrito codificante NM\_003977.4.

<sup>(b)</sup> A classificação de variantes do American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (P, patogénica; LP, provavelmente patogénica; B, benigna) foi baseada na evidência de patogenicidade (*very strong* (PVS1), *moderate* (PM1-6), ou *supporting* (BP1-7)). As classificações ACMG foram baseadas na ferramenta VarSome (<https://varsome.com/>), acedida a 27 de dezembro de 2022.

### 3. Resultados



**Figura 12.** Mutações *AIP* identificadas em doentes. Para cada mutação (A-D), são mostradas as sequências de DNA de um indivíduo normal (acima) e do doente (abaixo). As posições das mutações são indicadas por asteriscos. Todas as mutações eram heterozigóticas. Para maior clareza, as mutações de deleção (A e C) são mostradas apenas nas sequências clonadas dos alelos mutados.



**Figura 13.** Localização das mutações identificadas no gene *AIP* no nível da proteína. COOH, extremidade carboxi-terminal; FKBP, proteína de ligação a FK506; PPIase, domínio peptidil-prolil cis/trans isomerase; NH<sub>2</sub>, extremidade amino-terminal; TPR, domínios de repetição de tetratricopeptídeo.

#### 3.2.2 Características clínicas dos doentes com mutações *AIP*

##### Doente 8215

Uma mulher de 20 anos de idade apresentou-se com amenorreia secundária. A amenorreia tinha sido atribuída à anorexia nervosa diagnosticada aos 15 anos, mas não houve reversão com a recuperação do peso corporal. A doente também relatava cefaleias frontais, hipersudorese e traços faciais grosseiros. Negava quaisquer defeitos visuais. A sua altura e peso eram de 167 cm e 59 kg, respetivamente. A análise ao sangue revelou

GH 14 ng/mL (valor de referência (VR) <8), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) 1100 ng/mL (VR 102–231), FSH 5,4 mUI/mL (VR 1,2–9), LH 2,1 mUI/mL (VR 1,1–11,6), estradiol < 5 pg/mL, PRL 45 ng/mL (VR 4,7–23,0), ACTH 30 pg/mL (VR 7,2–63,3), cortisol 15,1 µg/dL (VR 6,2–18,0), TSH 1,6 mUI/mL (VR 0,3–4,2) e T4 livre (FT4) 1,1 ng/dL (VR 0,85–1,7). O teste oral de tolerância à glucose (TOTG) demonstrou falha na supressão de GH, com um nadir de GH de 1,4 ng/mL. A RM mostrou a presença de um adenoma hipofisário de 20 mm. Foi feito diagnóstico de acromegalia e a doente foi submetida à cirurgia transesfenoidal com excisão do macroadenoma hipofisário. A histopatologia revelou um adenoma hipofisário com predomínio de células acidófilas. Os exames pós-cirúrgicos revelaram normalização dos níveis de GH, mas persistência do hipogonadismo hipogonadotrófico. Aos 29 anos, a doente foi submetida a tratamento de fertilidade que resultou numa gravidez gemelar. No último acompanhamento, aos 37 anos, os exames de sangue revelaram GH basal 0,42 ng/mL (VR < 8), IGF1 102 ng/mL (VR 102–231), FSH 1,4 mUI/mL (VR 1,2–9), LH 0,16 mUI/mL (VR 1,1–11,6), estradiol < 5 pg/mL, PRL 14,8 ng/mL (VR 4,7–23,0), ACTH 22,2 pg/mL (VR 7,2–63,3), cortisol 16,1 µg/dL (VR 6,2–18,0), TSH 0,95 mUI/mL (VR 0,3–4,2) e FT4 1,2 ng/dL (VR 0,85–1,7). Não havia história familiar conhecida de adenomas hipofisários. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *AIP* (c.158\_165delGCCGGGCT, p.Ser53Thrfs\*36) na doente. Nenhum outro membro da família estava disponível para rastreio genético.

#### Doente 7879

Um homem de 23 anos apresentou-se no serviço de urgência com histórico de cefaleias frequentes e fortes, sem defeitos visuais. A RM mostrou um tumor hipofisário de 20 x 18 mm com extensão supra-selar em contacto com o quiasma ótico e evidência de hemorragia no tumor. Registou-se crescimento acral e prognatismo. A sua altura e peso eram de 189 cm e 97 kg, respetivamente. O nível sérico de IGF1 era de 704 ng/mL (VR 115-340), o nível basal de GH era de 6,40 ng/mL e o de PRL era de 17,40 ng/mL (VR 4,04-15,20), enquanto os níveis de FT4, TSH, cortisol e eletrólitos estavam dentro dos valores normais. O TOTG demonstrou falha na supressão de GH com um nadir de GH de 5,82 ng/mL. Foi feito o diagnóstico de acromegalia e proposto cirurgia transesfenoidal. Entretanto, apresentou-se no serviço de urgência com cefaleias refratárias, défice visual e ptose. A RM mostrou um tumor de 24 x 22 x 26 mm com extensão supra-selar e cavernosa e hemorragia aguda no tumor. O doente foi submetido a cirurgia transesfenoidal e o exame histopatológico revelou um adenoma hipofisário

### 3. Resultados

com células imunorreativas frequentes para a GH e mais raras para a PRL e com áreas de hemorragia intra-tumoral recente e antiga, sugestivas de apoplexia hipofisária. Os exames pós-cirúrgicos revelaram deficiências de cortisol e tiroxina que foram corrigidas com hidrocortisona 15 mg/dia e levotiroxina 50 ug/dia. No último acompanhamento, oito meses após a cirurgia, os níveis de PRL e testosterona estavam normais, o nível de IGF1 era de 127 ng/mL (VR 115-340) e o nível mais baixo de GH pós-glicose era de 0,1 ng/mL. O doente iniciou redução das dosagens da terapia de reposição. Não havia história familiar conhecida de adenomas hipofisários. A análise genética revelou mutação heterozigótica no *AIP* (c.241C>T, p.Arg81\*) no doente e no seu pai assintomático, que foi encaminhado para avaliação clínica, bioquímica e imagiológica.

#### Doente 7329

Um menino de 13 anos foi observado devido a alta estatura. Desde os 8 anos de idade demonstrou aumento da velocidade de estatura e começou a ultrapassar os percentis de estatura, permanecendo acima do percentil 97. O doente também relatava cefaleias frontais há 2 anos, mas sem manifestação de defeito visual. A sua altura e peso eram de 180,8 cm (+3,3 DP) e 57 kg, respetivamente. O doente exibia traços faciais grosseiros com protuberâncias frontais e prognatismo leve, mãos e pés grandes. O seu estado pubertário era compatível com estágio 5 de Tanner (volume testicular 20 mL). O historial médico anterior não apresentava alterações. A altura média dos pais era de 178,5 cm. A investigação hipofisária basal mostrou níveis aumentados de IGF1 (587,5 ng/mL, VR 74–450), GH aleatório 11,3 ng/mL (VR 0,12–8,1), hiperprolactinemia com PRL 35,1 ng/mL (VR 4,4–19), hipotireoidismo central com TSH 2,3 µUI/mL (VR 0,51–4,30) e FT4 6,96 pmol/L (VR 12,6–21), cortisol matinal de 10,3 µg/dL (VR 6,2–12,5), testosterona total 238 ng/dL (VR 105–545), FSH 3,49 U/L (VR 1,5–8,6), LH 1,64 U/L (VR 1,7–8,6). O TOTG demonstrou falha na supressão de GH, com um nadir de GH de 8,1 ng/mL. A RM da região selar mostrou um adenoma hipofisário, medindo 13 × 12 × 14 mm, sem sinais de invasão do seio cavernoso, extensão supra-selar ou compressão do quiasma ótico. Os exames de campo visual foram normais. A idade óssea era coincidente com a idade cronológica. Foi feito um diagnóstico de gigantismo hipofisário devido a um macroadenoma hipofisário secretor de GH e hipotireoidismo central associado. Foi iniciado tratamento com levotiroxina e o doente foi submetido a cirurgia transesfenoidal com excisão do macroadenoma hipofisário, sem intercorrências. A histopatologia revelou adenoma mamosomatotrófico com índice Ki-67 <1%. Três meses após a cirurgia, apresentou normalização dos níveis de IGF1, o nadir de GH durante o TOTG foi <1

ng/mL e nenhum tumor residual foi encontrado na RM. Observou-se também a recuperação do hipotireoidismo central após a cirurgia, encontrando-se o doente atualmente em estado eutiroideu sem tratamento com levotiroxina. O doente manteve-se em remissão sete anos após a cirurgia com IGF1 sérico de 308 µg/L (VR 93–449), nível nadir de GH < 1 ng/mL durante TOTG e altura de 189,5 cm. Não era conhecida história familiar de adenomas hipofisários. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *AIP* (c.343delC, p.Leu115Trpfs\*41) no doente. Nenhum outro membro da família estava disponível para rastreamento genético.

#### Doente 7632

Uma mulher de 25 anos apresentava características faciais acromegálicas, crescimento acral e amenorreia secundária. A sua altura e peso eram de 159 cm e 61 kg, respectivamente. As análises ao sangue revelaram GH basal 29,8 ng/mL (VR 0,06–5,0), IGF1 895 ng/mL (VR 117–329), FSH 3,2 mUI/mL (VR 1,2–9), LH 1,69 mUI/mL (VR 1,1–11,6), estradiol 15 pg/mL (VR 15–160), PRL 42 ng/mL (VR 3,46–19,4), ACTH 30,5 pg/mL (VR 5–46), cortisol 9,8 µg/dL (VR 5–25), TSH 1,95 mUI/mL (VR 0,4–4,0) e FT4 0,8 ng/dL (VR 0,8–1,9). O TOTG não conseguiu suprimir os níveis de GH. A RM revelou um adenoma hipofisário de 28 × 25 × 12 mm com invasão do seio cavernoso esquerdo, extensão supra-selar e compressão do quiasma ótico. A doente foi submetida a uma cirurgia transesfenoidal sem sucesso, seguida de craniotomia pterional, com excisão subtotal do tumor. A histopatologia revelou um adenoma hipofisário com imunorreatividade para GH e Ki-67 < 2%. Dois meses mais tarde, os níveis de GH permaneceram inalterados e os níveis de IGF1 foram de 547 ng/mL (VR 117–329). A análise de outras hormonas hipofisárias revelou pan-hipopituitarismo, tendo sido iniciada terapia de substituição hormonal. O teste de octreótido resultou numa diminuição de 63% dos níveis de GH. A doente iniciou tratamento com lanreótido 120 mg a cada quatro semanas e cabergolina 2 mg por semana, o que resultou numa resposta parcial. Seis meses mais tarde, a RM mostrou persistência de um grande resíduo tumoral. Dezoito meses depois, a doente foi submetida a radiocirurgia estereotáxica e manteve tratamento com lanreótido e cabergolina. Dois anos após a radiocirurgia, a doente apresentou melhoria clínica, bioquímica e imagiológica, sendo o tratamento farmacológico reduzido gradualmente para lanreótido 120 mg a cada nove semanas e cabergolina 0,5 mg por semana. No último seguimento, nove anos após a cirurgia, a doente interrompeu o tratamento com lanreótido e manteve cabergolina 0,25 mg por semana e restante terapia de substituição hormonal hipofisária. Os testes subsequentes

### 3. Resultados

mostraram um nível de GH pós-glicémia de 2,87 ng/mL, mas com níveis normais de IGF1. A RM mostrou tumor residual próximo ao seio cavernoso esquerdo. Não era conhecida história familiar de adenomas hipofisários. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *AIP* (c.736G>T, p.Glu246\*) na doente e na sua mãe assintomática, que foi encaminhada para avaliação clínica, bioquímica e imagiológica.

### **3.3 Estudo 3 - Identificação de mutações germinativas em doentes portugueses com macroadenomas hipofisários esporádicos de início precoce, através da análise de um painel multigénico**

#### **3.3.1 Variantes raras identificadas nos 29 genes analisados**

A sequenciação de exoma completo detetou um total de 154 variantes raras (141 diferentes), com uma frequência populacional  $<0,001$ , na coorte de 225 doentes, em 25 dos 29 genes analisados. De todas essas variantes, três foram classificadas como patogénicas, 13 como provavelmente patogénicas (11 diferentes), 63 como variantes de significado indeterminado (56), 64 como provavelmente benignas (61 diferentes) e 11 como benignas (10 diferentes) (Anexo 9). Oitenta e quatro (79 diferentes) variantes ainda não foram relatadas na literatura. Todas as variantes foram identificadas em heterozigotia.

#### **3.3.2 Variantes patogénicas e provavelmente patogénicas**

Foram identificadas variantes patogénicas e provavelmente patogénicas (categorias 5 e 4, respetivamente) em 16 (7,1%) doentes portugueses com macroadenomas hipofisários esporádicos de início jovem. Estas variantes consistiram em quatro mutações no gene *AIP* (previamente descritas no Estudo 2 - Anexo 2). (p.Ser53Thrfs\*36, p.Arg81\*, p.Leu115Trpfs\*41, e p.Glu246\*), duas mutações no gene *PMS2* (p.Asn335Ser, e p.Asp486Glufs\*109), duas mutações no gene *MEN1* (p.Trp183\*, e p.Arg314\_Asp315del), duas mutações no gene *VHL* (p.Lys196Glu, e p.Glu52\*), uma mutação no gene *MSH2* (p.Arg524His), uma mutação no gene *SDHB* (p.Ile127Leu), uma mutação no gene *TP53* (p.Arg282Gln) e uma mutação no gene *CDH23* (p.Glu2520Lys) (Tabela 5, Figura 14).

**Tabela 5.** Características clínicas e genéticas dos doentes com variantes patogénicas e provavelmente patogénicas raras.

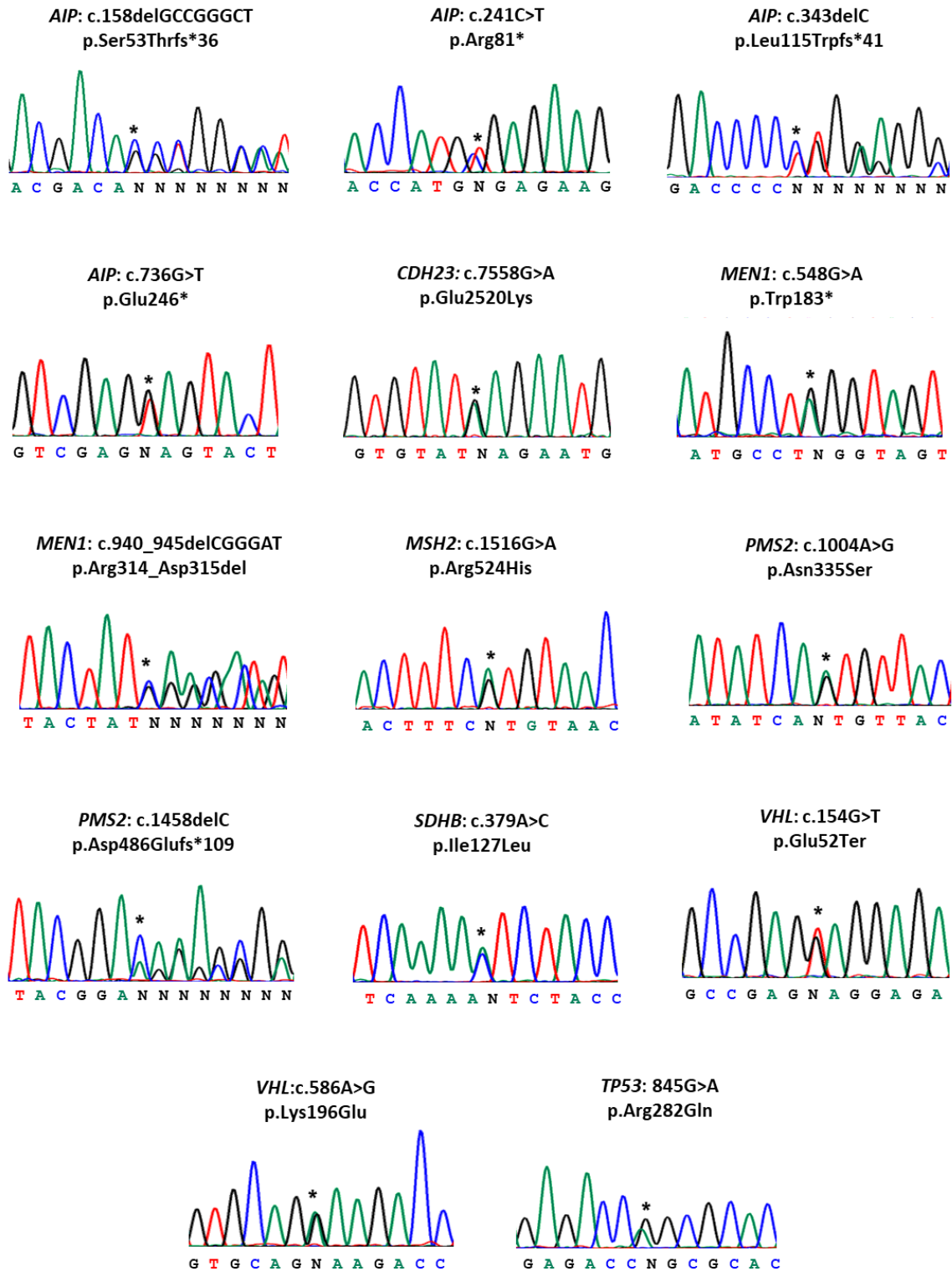
Gene (Sequência de Referência, Transcrito)	Identificação do doente	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (nível do nucleótido, proteína) ( <sup>a</sup> )	Frequência alélica (gnomAD)	Classificação ACMG (critérios) ( <sup>b</sup> )	Reportado por:
<i>AIP</i> (NM_003977.3)	1 (8215)	F	20	Secretor de GH	20	c.158_165delGCCGGGCT (p.Ser53Thrfs*36)	0	LP (PVS1, PM2)	(267)
	2 (7879)	M	22	Secretor de GH	26	c.241C>T (p.Arg81*)	0	P (PVS1, PP5, PM2)	(260)
	3 (7329)	M	13	Secretor de GH/PRL	14	c.343delC (p.Leu11Trp5fs*41)	0	LP (PVS1, PM2)	(261)
<i>CDH23</i> (NM_022124.5)	4 (7632)	F	25	Secretor de GH	28	c.736G>T (p.Glu246*)	0	LP (PVS1, PM2)	(267)
	5 (7791)	M	23	Secretor de GH	25	c.7558G>A (p.Glu2520Lys)	0	LP (PM2, PP3, PP5)	(268)
<i>MEN1</i> (NM_130799.2)	6 (7850)	M	32	Secretor de GH/PRL	60	c.548G>A (p.Trp183*)	0	P (PVS1, PP5, PM2)	(142)
	7 (7971)	F	22	Secretor de GH/PRL/TSH	40	c.940_945delCGGGAT (p.Arg314_Asp315del)	0	LP (PM2, PM4, PM1)	Não
<i>MSH2</i> (NM_022124.5)	8 (7642)	F	20	Secretor de PRL	>10	c.1571G>A (p.Arg524His)	0,0000132	LP (PM2, PM5, PP3)	(269)
<i>PMS2</i> (NM_000535.7)	9 (8072)	M	37	Secretor de GH	>10	c.1004A>G (p.Asn335Ser)	0,0002563	LP (PP3, PM2, BP6)	(270)

Gene (Sequência de Referência, Transcrito)	Identificação do doente	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (nível do nucleótido, proteína) <sup>(a)</sup>	Frequência alélica (gnomAD)	Classificação ACMG (critérios) <sup>(b)</sup>	Reportado por:
<i>SDHB</i> (NM_003000.3)	10 (8094)	F	40	Secretor de PRL	31	c.1004A>G (p.Asn335Ser)	0,0002563	LP (PP3, PM2, BP6)	(270)
	11 (8095)	F	33	Não secretor	40	c.1004A>G (p.Asn335Ser)	0,0002563	LP (PP3, PM2, BP6)	(270)
	12 (7648)	M	25	Secretor de PRL	>20	c.1458delC (p.Asp486Glufs*109)	0	LP (PVS1, PM2)	Não
	13 (7887)	F	21	Secretor de PRL	20	c.379A>C (p.Ile127Leu)	0,000004	LP (PM1, PP2, PM2, PM5, PP3)	(192)
	14 (8079)	F	36	Secretor de ACTH	14	c.845G>A (p.Arg282Gln)	0,0000132	LP (PM1, PM2, PM5, PP3, PP5)	(271)
	15 (6906)	F	17	Secretor de PRL	>10	c.154G>T (p.Glu52*)	0,000018	LP (PVS1, PM2)	(212)
<i>VHL</i> (NM_000551.3)	16 (7792)	M	18	Secretor de TSH	10	c.586A>G (p.Lys196Glu)	0	P (PM1, PP2, PM2, PP3, PP5)	(272)

F, feminino; M, masculino; ACTH, hormona adrenocorticotrófica; FSH, hormona foliculo-estimulante; GH, hormona de crescimento; LH, hormona luteinizante; PRL, prolactina; TSH, hormona tireoestimulante; mm, milímetros; gnomAD, *Genome Aggregation Database*.

<sup>(a)</sup> Todas as variantes eram heterozigóticas e a numeração dos nucleótidos foi baseada na sequência de referência do transcrito codificante de cada gene (NM). <sup>(b)</sup> A classificação de variantes do American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (P, patogénica; LP, provavelmente patogénica) foi baseada na evidência de patogenicidade (*very strong* (PVS1), *moderate* (PM1-6), ou *supporting* (BP1-7)). As classificações ACMG foram baseadas na ferramenta de interpretação de variantes baseada no Franklin (Genoox Ltd, <https://franklin.genoox.com/>), acedida em 21 de dezembro de 2023.

### 3. Resultados



**Figura 14.** Variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas identificadas em doentes, nos genes *AIP*, *CDH23*, *MEN1*, *MSH2*, *PMS2*, *SDHB*, *VHL* e *TP53*. As posições das mutações são indicadas por asteriscos. Todas as mutações são heterozigóticas.

### 3.3.3 Prevalência de mutações de acordo com a idade do diagnóstico

A prevalência de mutações foi maior nos doentes com idades mais jovens aquando do diagnóstico. A prevalência de mutações em doentes diagnosticados até aos 40, 30 e 18 anos foi de 7,1% (16/225), 9,0% (11/122) e 12% (3/25), respetivamente.

### 3.3.4 Características clínicas dos doentes com mutações patogénicas ou provavelmente patogénicas

Doentes 1 (8215), 2 (7879), 3 (7329), 4 (7632)

A caracterização clínica e genética destes doentes com mutações no gene *AIP* foi relatada anteriormente (Ponto 3.2.2).

Doente 5 (7791)

Um homem de 23 anos de idade apresentava características faciais acromegálicas, crescimento acral, hiperidrose, parestesias nas mãos e artralguas dos membros inferiores. A sua altura era de 171 cm. As análises sanguíneas revelaram GH basal de 53 ng/mL (intervalo normal (NR) < 8) e IGF1 de 524 ng/mL (NR 122-400). A RM mostrou um tumor hipofisário de 25 mm com invasão do seio cavernoso. Foi feito o diagnóstico de acromegalia e o doente foi submetido a tratamento pré-operatório com octreótido (10 ug, subcutâneo, tid), que não normalizou os níveis hormonais, seguido de cirurgia transesfenoidal com excisão do tumor. A histopatologia revelou um adenoma hipofisário com imunoreactividade para a GH. Os exames pós-cirúrgicos revelaram a persistência da hipersecreção de GH e o doente foi submetido a radioterapia. No entanto, o doente continuou a necessitar de tratamento farmacológico para controlar os níveis de GH, enquanto desenvolvia deficiência das restantes hormonas hipofisárias. No último seguimento, aos 51 anos de idade, mantinha uma massa selar residual de 15 mm com extensão ao seio cavernoso direito e apresentava um nível de IGF1 de 236 ng/mL (NR 48-209). Mantinha-se em tratamento com octreótido de ação prolongada (30 mg, intramuscular, uma vez por mês), prednisolona, testosterona e levotiroxina. Não havia história familiar conhecida de tumores hipofisários ou outros tumores endócrinos. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *CDH23* (c.7558G>A, p.Glu2520Lys).

### 3. Resultados

#### Doente 6 (7850)

Um homem de 32 anos foi trazido ao serviço de urgência devido a perda de consciência. A RM mostrou uma massa selar e supra-selar de 60 mm de maior diâmetro, com hidrocefalia associada. O doente foi submetido a cirurgia com colocação de um *shunt* ventrículo-peritoneal que resultou na melhoria do seu estado. Após ter recuperado a consciência, o doente referiu que tinha cefaleias frequentes e perturbações visuais que tinham progredido em gravidade ao longo dos últimos anos. Mais recentemente, descreveu fraqueza generalizada e episódios frequentes de náuseas e vômitos. Também referiu hipersudorese, perda de libido e diminuição da frequência com que se barbeia. O exame físico revelou características faciais grosseiras, mas sem aumento acral. A sua altura era de 183 cm. As análises sanguíneas revelaram GH basal 287 ng/mL (NR <8), IGF1 1932 ng/mL (NR 102-231) e prolactina 4546 ng/mL (NR 4,7-23). Outras avaliações endócrinas revelaram hipogonadismo hipogonadotrófico, hipotireoidismo secundário e insuficiência suprarrenal secundária. Foi-lhe diagnosticado um macroadenoma hipofisário misto secretor de GH/prolactina. Iniciou tratamento com cabergolina e octreótido de ação prolongada, e terapêutica de substituição com hidrocortisona, tiroxina e testosterona. Manteve-se controlado com este tratamento durante os seis anos seguintes. A RM mostrou apenas uma massa residual no seio cavernoso direito. As análises sanguíneas revelaram GH basal < 0,05 ng/mL (NR <8), IGF1 140 ng/mL (NR 102-231) e prolactina 14 ng/mL (NR 4-15). Manteve tratamento com octreótido de ação prolongada (20 mg, intramuscular, uma vez por mês), cabergolina (0,5 mg, três vezes por semana), prednisolona, testosterona e levotiroxina. Não havia história familiar conhecida de tumores hipofisários ou outros tumores endócrinos. A análise genética revelou uma mutação no gene *MEN1* em heterozigotia (c.548G>A, p.Trp183Ter). Foi então efetuado um rastreio bioquímico para MEN1, que revelou cálcio sérico 11,7 mg/dL (NR 8,6-10,2), fósforo 3,0 mg/dL (NR 2,5-4,5) e hormona paratiroideia (PTH) 101 pg/mL (NR 10-65).

#### Doente 7 (7971)

Uma mulher de 22 anos apresentou-se com amenorreia secundária e galactorreia. Não tinha historial de cefaleias ou defeitos visuais. As análises ao sangue revelaram prolactina 3736 ng/mL (NR 4,7-23,0). Os resultados da química sanguínea, incluindo o cálcio, eram normais e não apresentava outras alterações hormonais hipofisárias. A RM mostrou um tumor hipofisário de 30 × 25 mm com extensão para o seio cavernoso esquerdo. Foi-lhe diagnosticado um macroprolactinoma. Iniciou tratamento com

bromocriptina (dose máxima de 25 mg por dia), com restabelecimento dos ciclos menstruais e redução do diâmetro do tumor. Foi perdida no seguimento durante quatro anos e, quando regressou, o volume do adenoma tinha aumentado e os níveis de prolactina eram tão elevados como na observação inicial. Parou a medicação. A partir daí, passou a faltar frequentemente às consultas de seguimento e ao cumprimento da medicação. Aos 30 anos, foi submetida a um teste oral de tolerância à glicose (TOTG) que revelou falha na supressão de GH, com um nadir de GH de 5,82 ng/mL. Os seus níveis de IGF1 eram de 381 ng/mL (NR 96-502). Foi submetida a cirurgia transesfenoidal com remoção parcial do adenoma. A imunohistopatologia revelou um adenoma pluri-hormonal positivo para prolactina, GH, FSH e subunidade alfa. Os exames pós-cirúrgicos não revelaram défices hormonais hipofisários e havia um pequeno tumor remanescente junto ao seio cavernoso esquerdo. Aos 33 anos, teve uma gravidez espontânea e nasceu um bebé normal por cesariana. Não tomou qualquer medicação durante a gravidez. Dois meses após o parto, foi-lhe prescrita bromocriptina, tendo-se verificado novamente uma adesão irregular e o recrudescimento do tumor. Aos 40 anos de idade, foi submetida a radioterapia. No último seguimento, aos 42 anos, estava sob cabergolina 0,75 mg duas vezes por semana e terapêutica estroprogestativa. As análises sanguíneas revelaram prolactina 898 ng/mL (NR 4,7-23,0), GH aleatória 1,38 ng/mL (NR <8), IGF1 195 ng/mL (NR 43-209) e níveis normais de hormona tiroideia e cortisol. A RM mostrou que o tumor residual tinha um pequeno aumento de volume que se estendia ao seio cavernoso direito. Foi planeada uma segunda intervenção cirúrgica. Não havia história familiar conhecida de tumores hipofisários ou outros tumores endócrinos. A análise genética revelou uma mutação no gene *MEN1* em heterozigotia (c.940\_945delCGGGAT, p.Arg314\_Asp315del). Enquanto decorriam os estudos genéticos, o pai foi diagnosticado com hiperparatiroidismo primário na investigação de nefrolitíase. Testes subsequentes revelaram hiperparatiroidismo primário na doente e no seu irmão assintomático. A doente foi submetida a uma paratiroidectomia de três paratiroides e meia. Até ao momento não foram encontradas alterações pancreáticas.

#### Doente 8 (7642)

Uma mulher de 20 anos foi diagnosticada com um prolactinoma noutra instituição, depois de se ter queixado de amenorreia secundária desde os 16 anos. Foi tratada com bromocriptina, mas interrompeu o tratamento ao fim de quatro anos. Os seus resultados laboratoriais e imagiológicos não estavam disponíveis. Foi observada mais tarde, aos 27 anos de idade, devido aos mesmos sintomas. As suas análises sanguíneas revelaram uma

### 3. Resultados

prolactina de 861 ng/mL (NR 3,46-19,4). A RM mostrou um macroadenoma hipofisário (tamanho exato não disponível) com extensão ao seio cavernoso esquerdo. Retomou o tratamento com bromocriptina (dose máxima de 10 mg por dia) com boa resposta. Aos 31 anos, a RM mostrou um adenoma residual com 7 mm. Teve duas gravidezes sem intercorrências, durante as quais o tratamento foi suspenso. No último seguimento, aos 44 anos, estava sob bromocriptina (1,25 mg por dia) e terapêutica estroprogestativa. As análises sanguíneas revelaram uma prolactina de 22,7 ng/mL (NR 3,46-19,4) e a RM não revelou qualquer evolução do tumor. Nesta altura, a doente não tinha antecedentes pessoais de outros tumores. Não havia história familiar conhecida de tumores hipofisários ou outros tumores endócrinos. Referiu que o seu pai tinha cancro colorrectal e da laringe, a sua tia materna tinha cancro da mama e o seu avô materno tinha cancro gástrico. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *MSH2* (c.1571G>A, p.Arg524His).

#### Doente 9 (8072)

Um homem de 37 anos apresentou-se com apneia do sono e características acromegálicas. Os testes laboratoriais confirmaram a hipersecreção de GH e a TAC mostrou um macroadenoma hipofisário (tamanho exato não disponível). O doente foi submetido a cirurgia transesfenoidal para remoção do tumor. A histopatologia revelou um adenoma da hipófise com expressão de GH. As análises laboratoriais subsequentes revelaram uma normalização dos níveis hormonais. No último seguimento, aos 72 anos, mantinha níveis hormonais normais, com GH aleatória 0,09 ng/mL (NR < 3) e IGF1 147 ng/mL (NR < 184). Nesta altura, não tinha antecedentes pessoais de outros tumores. Não havia história familiar conhecida de tumores hipofisários ou outros tumores endócrinos. Referiu que a sua mãe tinha cancro colorrectal e o seu pai cancro da próstata. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *PMS2* (c.1004A>G, p.Asn335Ser).

#### Doente 10 (8094)

Uma mulher de 40 anos apresentou sintomas de alterações da visão, amenorreia e galactorreia. As análises ao sangue revelaram prolactina 2338 ng/mL (NR 4,8-23,3), sem outras anomalias hormonais. A RM da região selar revelou um tumor hipofisário com 31 mm. Foi feito o diagnóstico de macroprolactinoma. Foi submetida a uma cirurgia

transesfenoidal para descomprimir a via ótica. O exame histopatológico revelou um adenoma hipofisário com coloração para prolactina. Iniciou tratamento com agonistas dopaminérgicos e os níveis de prolactina normalizaram ao fim de três meses. Contudo, três anos mais tarde, os níveis de prolactina aumentaram para 559 ng/mL (NR 4,8-23,3) e a RM mostrou um crescimento supra-selar do tumor. Foi submetida a uma nova cirurgia transesfenoidal com remoção parcial do tumor e a histopatologia revelou um adenoma hipofisário, desta vez com expressão de prolactina e GH. No ano seguinte, foi também submetida a radioterapia selar fracionada. Manteve tratamento com agonistas dopaminérgicos e obteve normalização dos níveis de prolactina. Apresentou manifestações bioquímicas e clínicas de hipopituitarismo e foi submetida à reposição hormonal com prednisolona e levotiroxina. No último seguimento, aos 56 anos, mantinha este estado e a RM mostrava um tumor residual da hipófise com necrose central. Nessa altura, a doente não tinha antecedentes pessoais de outros tumores. Não havia história familiar conhecida de tumores hipofisários ou outros tumores endócrinos. Referiu que o seu pai teve um tumor intracraniano não especificado. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *PMS2* (c.1004A>G, p.Asn335Ser).

#### Doente 11 (8095)

Uma mulher de 33 anos foi diagnosticada com um adenoma hipofisário gigante (40 mm), depois de se queixar de defeitos visuais. Foi submetida a cirurgia transesfenoidal, tendo sido posteriormente reoperada por via transcraniana devido ao agravamento da visão. Foi também submetida a radioterapia externa fracionada. Os seus resultados laboratoriais e imagiológicos não estavam disponíveis, mas assumiu-se que tinha um adenoma hipofisário não funcionante. Foi observada novamente, aos 66 anos de idade, onde se verificou que tinha hipopituitarismo parcial. Tem sido tratada com prednisolona e levotiroxina. No último seguimento, aos 71 anos, a RM mostrava um alargamento da sela turca e restos de tumor com componente quístico-necrótico, estendendo-se para o seio cavernoso direito e provocando desvio da haste hipofisária. Nesta altura, a doente não tinha antecedentes pessoais de outros tumores. Não havia história familiar conhecida de tumores hipofisários ou outros tumores endócrinos. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *PMS2* (c.1004A>G, p.Asn335Ser).

### 3. Resultados

#### Doente 12 (7648)

Um homem de 25 anos foi diagnosticado com um prolactinoma, após queixas de disfunção erétil. Foi tratado com cabergolina (0,5 mg, uma vez por semana). Os seus resultados laboratoriais e imagiológicos não estavam disponíveis, mas referiu níveis de prolactina >600 ng/mL na altura do diagnóstico. Foi observado, novamente, com 48 anos de idade. Os seus níveis de prolactina eram de 20,4 ng/mL (NR 3,46-19,4) e a RM mostrava um tumor hipofisário com 24 mm e necrose parcial. Manteve o tratamento com cabergolina. Nesta altura, não tinha antecedentes pessoais de outros tumores. Não havia história familiar conhecida de tumores hipofisários ou outros tumores endócrinos. Referiu que o seu pai tinha cancro colorrectal. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *PMS2* (c.1458delC, p.Asp486GlufsTer109).

#### Doente 13 (7887)

Uma mulher de 21 anos apresenta-se com amenorreia secundária e galactorreia. Referiu que, desde a menarca aos 10 anos de idade, os seus ciclos menstruais eram irregulares, o que a levou a tomar uma pílula contraceptiva oral entre os 14 e os 18 anos de idade. Após a paragem da pílula, não voltou a ter ciclos menstruais. Desenvolveu então galactorreia bilateral e cefaleias ocasionais. Não referiu alterações visuais ou outras queixas. O exame físico não apresentava alterações. As análises ao sangue revelaram prolactina 931 ng/mL (NR 4,7-23). Não apresentava outras alterações hormonais hipofisárias. A TAC revelou um tumor hipofisário de 20 mm com extensão supra-selar. Foi-lhe diagnosticado um macroprolactinoma. Iniciou tratamento com cabergolina (0,5 mg, duas vezes por semana). Quatro meses mais tarde, enquanto aguardava reavaliação, apresentou um quadro agudo sugestivo de apoplexia hipofisária. A RM confirmou a presença de um tumor hipofisário com hemorragia intratumoral. A doente foi tratada de forma conservadora. Os exames subsequentes revelaram a ocorrência de hipopituitarismo. A doente iniciou uma terapêutica de substituição com hidrocortisona, tiroxina e desmopressina. No último seguimento, aos 28 anos de idade, a doente continuava a ser tratada com cabergolina (0,5 mg, duas vezes por semana) e com terapêutica de substituição para o hipopituitarismo. A RM não revelou qualquer sinal de tumor residual. Nessa altura, a doente não tinha antecedentes pessoais de outros tumores. Não havia história familiar conhecida de tumores hipofisários ou outros tumores endócrinos. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *SDHB* (c.379A>C, p.Ile127Leu).

Doente 14 (8079)

Uma mulher de 36 anos foi diagnosticada com um macroadenoma hipofisário após ter apresentado amenorreia secundária. A RM mostrou um tumor hipofisário com 14 mm e um componente predominantemente cístico. Os seus níveis de prolactina eram de 82 ng/mL (NR 3,46-19,4). Iniciou cabergolina (0,25 mg, uma vez por semana) e retomou ciclos menstruais normais. Dois anos mais tarde, foi observada devido a defeitos visuais. Os seus testes laboratoriais eram compatíveis com a doença de Cushing, embora não houvesse sinais ou sintomas óbvios da doença. A RM revelou um tumor hipofisário com 15 mm e uma área central de necrose. Foi submetida a cirurgia transesfenoidal para remoção do adenoma e a análise imunohistoquímica revelou que este expressava ACTH. As análises ao sangue e os exames imagiológicos revelaram que a cirurgia tinha sido curativa. Dez anos mais tarde, foi readmitida devido a recidiva bioquímica da doença de Cushing. A RM mostrou um tumor hipofisário com 9 mm. Foi efetuada uma nova cirurgia transesfenoidal para remoção do tumor. No entanto, desta vez, a imunohistoquímica do tumor foi negativa para ACTH. No último seguimento, aos 50 anos de idade, mantinha-se bem, com análises sanguíneas normais e sem evidência de tumor na RM. Nessa altura, a doente não tinha antecedentes pessoais de outros tumores. Não havia história familiar conhecida de tumores hipofisários ou outros tumores endócrinos. A doente referiu que o seu avô paterno tinha tido cancro colorrectal e que o seu avô materno tinha tido um tumor cerebral. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *TP53* (NM\_000546.6: c.845G>A, p.Arg282Gln).

Doente 15 (6906)

Uma rapariga de 17 anos apresentou-se com amenorreia primária. Os seus níveis de prolactina eram superiores a 1000 ng/mL. A RM mostrou um macroadenoma hipofisário (tamanho exato não disponível) que invadiu o seio cavernoso esquerdo. Iniciou tratamento com bromocriptina e depois cabergolina, com normalização dos níveis de prolactina. No último seguimento, aos 35 anos, mantinha-se bem, com níveis normais de prolactina e um tumor hipofisário residual (< 10 mm). Nessa altura, a doente não tinha antecedentes pessoais de outros tumores. Não havia história familiar conhecida de tumores hipofisários ou outros tumores endócrinos. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *VHL* (c.154G>T, p.Glu52Ter).

### 3. Resultados

#### Doente 16 (7792)

Uma descrição clínica completa deste doente foi relatada (273). Em resumo, um homem de 19 anos apresentou sintomas de alterações de humor e perda de peso, tendo-se verificado que sofria de tirotoxicose com TSH inapropriadamente elevada. As análises ao sangue revelaram TSH 1,6 mU/L (NR 0,27-4,2), triiodotironina livre (FT3) 7,79 pg/mL (NR 2,0-4,4) e tiroxina livre (FT4) 1,76 ng/dL (NR 0,93-1,7). A RM da região selar mostrou um tumor hipofisário com 10 mm. Um teste de estimulação com a TRH revelou uma resposta anormal de TSH reduzida. Um teste genético para o gene *THRB* não revelou quaisquer alterações que indicassem resistência às hormonas tiroideias. Foi feito o diagnóstico de adenoma hipofisário secretor de TSH. O doente iniciou tratamento com um análogo de somatostatina de ação prolongada, que normalizou os níveis de hormonas da tiroide ao fim de dois meses. O doente foi então submetido a uma cirurgia transesfenoidal para remoção do adenoma, no entanto, a histopatologia não revelou evidência de neoplasia. Embora o doente tenha permanecido eutiroideu durante os três anos seguintes, verificou-se um aumento gradual dos níveis de TSH, FT4 e FT3 ao longo do tempo. Cinco anos após a cirurgia, o doente voltou a apresentar manifestações bioquímicas e clínicas de tirotoxicose e a RM revelou um novo tumor hipofisário de 8 mm. Foi realizada uma segunda cirurgia transesfenoidal e a análise imunohistoquímica revelou um adenoma hipofisário com expressão do fator de transcrição PIT1 e positividade para TSH e prolactina. O doente foi considerado cirurgicamente curado e o último seguimento, aos 25 anos de idade, mostrou que se encontrava clínica e bioquimicamente eutiroideu, sem necessidade de tratamento adicional. Nessa altura, o doente não tinha antecedentes pessoais de outros tumores. Não havia história familiar conhecida de tumores hipofisários ou outros tumores endócrinos. A análise genética revelou uma mutação heterozigótica no gene *VHL* (c.586A>G, p.Lys196Glu).

### 3.4 Estudo 4 – Estudo de associação genética caso-controlo

O genótipo e as frequências alélicas de *NEBL* rs2359536, *PCDH15* rs10763170 e *CDK8* rs17083838 observadas nos casos e controlos estão apresentados na Tabela 6. As frequências genótípicas observadas não se desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que de outro modo sugeriria viés de seleção, estratificação populacional ou erros de genotipagem. O alelo menor *CDK8* rs17083838 (alelo A) foi significativamente associado com adenomas hipofisários esporádicos sob um modelo de hereditariedade aditivo (OR 1,73, IC 95% 1,19–2,50,  $p = 0,004$ ) e dominante (OR 1,82, 95 % CI 1,24–2,68,  $p = 0,002$ ) (Tabela 6). Essas associações permaneceram estatisticamente significativas, mesmo após a aplicação da correção conservadora de Bonferroni ( $p < 0,0167$ ). Para os SNPs *NEBL* rs2359536 e *PCDH15* rs10763170, não foram observadas diferenças significativas entre casos e controlos.

Na análise com base no subtipo de tumor, o alelo menor de *PCDH15* rs10763170 (alelo T) foi associado a somatotrofinomas sob um modelo de hereditariedade dominante (OR 1,55, IC 95% 1,02–2,35,  $p = 0,035$ ) (Tabela 7); no entanto, essa associação deixou de ser significativa após a aplicação da correção de Bonferroni. Para os restantes subtipos e tamanhos de tumores, não foram observadas associações.

O número combinado de alelos menores (de risco) de *NEBL*, *PCDH15* e *CDK8* que cada indivíduo possuía não foi significativamente associado ao risco de adenomas hipofisários (Tabela 8).

**Tabela 6.** Distribuição dos genótipos e alelos *NEBL*, *PCDH15* e *CDK8* em adenomas hipofisários esporádicos e controlos.

	<i>NEBL</i> rs2359536	Casos, n (%)	Controlos, n (%)	OR (IC 95%)	Valor de <i>p</i>	OR ajustado (IC 95%) <sup>†</sup>	Valor de <i>p</i> ajustado <sup>†</sup>
Genótipos	TT	225 (39,5)	213 (39,0)				
	TC	271 (47,5)	258 (47,3)				
	CC	74 (13,0)	75 (13,7)	0,94 (0,66–1,32) <sup>¶</sup>	0,71	0,89 (0,63–1,27) <sup>¶</sup>	0,53
Alelos	T	721 (63,2)	684 (62,6)				
	C	419 (36,8)	408 (37,4)	0,97 (0,82–1,16) <sup>§</sup>	0,76	0,95 (0,80–1,13) <sup>§</sup>	0,57
<b><i>PCDH15</i> rs10763170</b>							
Genótipos	CC	184 (32,3)	180 (33,0)				
	CT	276 (48,4)	247 (45,2)				
	TT	110 (19,3)	119 (21,8)	0,86 (0,64–1,15) <sup>¶</sup>	0,30	0,86 (0,64–1,15) <sup>¶</sup>	0,31
Alelos	C	644 (56,5)	607 (55,6)				

### 3. Resultados

	T	496 (43,5)	485 (44,4)	0,97 (0,82–1,14) <sup>§</sup>	0,67	0,96 (0,81–1,13) <sup>§</sup>	0,62
<b>CDK8</b>							
<b>rs17083838</b>							
	GG	487 (85,4)	498 (91,2)				
Genótipos	GA	82 (14,4)	46 (8,4)				
	AA	1 (0,2)	2 (0,4)	1,77 (1,21–2,58) <sup>‡</sup>	0,003	1,82 (1,24–2,68) <sup>‡</sup>	0,002
Alelos	G	1056 (92,6)	1042 (95,4)				
	A	84 (7,3)	50 (4,6)	1,67 (1,16–2,41) <sup>§</sup>	0,005	1,73 (1,19–2,50) <sup>§</sup>	0,004

n, número; OR, razão de probabilidades; IC, intervalo de confiança, <sup>†</sup> ajustado por sexo e idade; <sup>‡</sup> modelo recessivo; <sup>‡</sup> modelo dominante; <sup>§</sup> modelo log-aditivo.

**Tabela 7.** Distribuição de genótipos e alelos *PCDH15* em somatotrofinomas e todos os outros tipos de adenomas.

<i>PCDH15</i> rs10763170	Somatotrofinomas, n (%)	Todos os outros tipos de adenomas, n (%)	OR (95% IC)	Valor de p	OR ajustado (95% IC) <sup>†</sup>	Valor de p ajustado <sup>†</sup>	
	CC	41 (25,5)	138 (34,6)				
Genótipos	CT	85 (52,8)	193 (48,4)				
	TT	35 (21,7)	68 (17,0)	1,55 (1,03–2,33) <sup>‡</sup>	0,036	1,55 (1,02–2,35) <sup>‡</sup>	0,035
Alelos	C	167 (51,9)	469 (58,8)				
	T	155 (48,1)	329 (41,2)	1,32 (1,02–1,72) <sup>§</sup>	0,035	1,31 (1,00–1,71) <sup>§</sup>	0,046

n, número; OR, razão de probabilidades; IC, intervalo de confiança, <sup>†</sup> ajustado por sexo e idade; <sup>‡</sup> modelo dominante; <sup>§</sup> modelo log-aditivo.

**Tabela 8.** Distribuição de combinações de alelos menores (de risco).

Número de alelos menores	Casos, n (%)	Controles, n (%)	OR (95% IC)	Valor de p
0	56 (9,8)	60 (11,0)		
1	180 (31,6)	176 (32,2)		
2	208 (36,5)	187 (34,2)		
3	102 (17,9)	102 (18,7)		
4	23 (4,0)	18 (3,3)		
5	1 (0,2)	3 (0,6)		
6	0 (0,0)	0 (0,0)		
2 ou menos	444 (77,9)	423 (77,5)		
3 ou mais	126 (22,1)	123 (22,5)	0,98 (0,74–1,29)	0,866

n, número; OR, razão de probabilidades; IC, intervalo de confiança.

## 4. Discussão



#### 4. Discussão

#### **4.1 Estudo 1 - Construção de uma base de dados de variantes germinativas no gene *AIP*, identificadas na literatura, em doentes com adenomas hipofisários esporádicos e familiares**

A construção de bases de dados de variantes germinativas é crucial em diversas áreas, principalmente na genética e medicina personalizada. Este tipo de base de dados auxilia a identificação de variantes associadas a diversas doenças, permitindo diagnósticos mais precisos e a compreensão dos mecanismos de doenças hereditárias. Através destes estudos, é possível estabelecer relações entre genótipos e fenótipos e, ainda, monitorizar o tipo de variantes em diversas populações ao longo do tempo, sendo importante em contextos epidemiológicos e de saúde pública.

Nesta revisão, foi construída uma base de dados das variantes germinativas identificadas no gene *AIP* em doentes com adenomas hipofisários esporádicos e familiares. A escolha deste gene deve-se ao facto de ter sido o primeiro associado a adenomas hipofisários (61), apresentando uma prevalência de mutações entre os 3-20% (262, 265, 274), estando assim disponíveis na literatura um maior número de estudos de coorte, relativamente a outros genes. Os testes genéticos para a deteção de variantes germinativas no gene *AIP* podem ser extremamente úteis na prática clínica, uma vez que a identificação de uma mutação pode reconhecer pessoas em risco de desenvolver adenomas hipofisários potencialmente agressivos, permitindo um diagnóstico precoce e subsequente tratamento mais eficaz (275). O aparecimento de abordagens baseadas na sequenciação de nova geração, incluindo a sequenciação do exoma completo, facilitou a deteção precisa de variantes genéticas em grande escala, reduzindo simultaneamente o custo dos testes genéticos (129, 276).

Após uma revisão literária exaustiva, foram identificados e avaliados 235 artigos nos quais tinham sido relatadas 158 variantes germinativas diferentes, num total de 562 doentes com adenomas hipofisários esporádicos ou familiares, não sendo claro o efeito patogénico de todas estas variantes. Para além das variantes *nonsense* e *frameshift*, que são de uma forma geral patogénicas, a classificação da patogenicidade das variantes *missense* e de outras variantes pode ser um desafio, colocando uma questão fundamental para o aconselhamento genético e a tomada de decisões (277).

#### 4. Discussão

De acordo com as diretrizes do ACMG, a patogenicidade das 158 variantes germinativas foi categorizada utilizando todos os dados disponíveis, de modo a atualizar a sua classificação de patogenicidade, de forma uniforme, pois nem todos os artigos considerados para este estudo demonstraram o efeito patogénico de todas as variantes. Neste sentido, recorreu-se ao uso da ferramenta de interpretação de variantes Franklin (Genoox). Esta ferramenta, usada atualmente por mais de 1700 organizações de cuidados de saúde em mais de 44 países em todo o mundo (278), fornece uma classificação sugerida com base nas diretrizes da ACMG-AMP com uma sensibilidade de 94,5% e uma especificidade de 96,6% (279). Não sendo uma ferramenta estática, está sujeita a atualizações com relativa frequência, pois vão sendo realizados diversos estudos para as variantes identificadas, que vão alterando a classificação de patogenicidade periodicamente.

Dos 562 doentes, 35,4% apresentavam variantes patogénicas, 24,0% apresentavam variantes provavelmente patogénicas, 17,1% apresentavam variantes de significado indeterminado, 5,7% variantes provavelmente benignas e 17,8% variantes benignas. Deste modo, foi estabelecida uma causa genética em 59,4% dos 562 doentes considerados. Os restantes 40,6% dos doentes não apresentam uma causa genética definitiva. Destes, 23,5% apresentam variantes benignas e provavelmente benignas que nos fazem supor que a verdadeira causa genética poderá estar associada a uma mutação somática no mesmo gene ou a mutações em outros genes, ou poderão ser casos esporádicos sem causa genética. Em 17,1% dos doentes foram identificadas variantes de significado indeterminado, que nos deixam dúvidas quanto ao seu verdadeiro poder patogénico. A principal fonte de incerteza no diagnóstico genético reside no grande número de variantes de significado indeterminado, que representam uma grande parte da variabilidade do genoma (280, 281).

Aquando do levantamento das diversas variantes, verificou-se que algumas se encontravam erradamente classificadas pelos respetivos autores. Ocorreram casos em que os autores classificaram as variantes identificadas como sendo de significado indeterminado e que, após a aplicação do Franklin, foram classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas. Tem-se como exemplo a variante c.250G>A (p.Glu84Lys) (101) cuja classificação passou de variante de significado indeterminado para provavelmente patogénica. O oposto a esta situação também se verificou, sendo que variantes classificadas pelos respetivos autores como nefastas, ao serem analisadas pela ferramenta bioinformática, passaram a ser classificadas como benignas, provavelmente benignas ou de significado indeterminado. Por exemplo, a variante c.911G>A (p.Arg304Gln) (89, 264, 282) descrita pelos autores como patogénica, após a atualização

da classificação pelo Franklin passou a benigna, e a variante c.807C>T (p.Phe269Phe) (89) classificada pelo autor como patogénica, passou para provavelmente benigna. Para além destes casos, após a aplicação do programa bioinformático Franklin, 16,3% dos doentes com variantes provavelmente patogénicas teriam permanecido como variantes de significado indeterminado, se não tivéssemos incluído manualmente os critérios em falta na ferramenta, particularmente PP1/BS4 para dados de segregação e/ou PS3/BS3 para estudos funcionais. São exemplos desta situação as variantes c.208C>A (p.Leu70Met) (283) e c.512C>T (p.Thr171Ile) (284). Deste modo, as bases de dados de variantes deverão ser atualizadas, regularmente, bem como a sua patogenicidade, não só do gene *AIP* mas também de outros genes cujas alterações genéticas poderão estar na base desta ou de outras doenças. Esta base de dados permite, ainda, a consulta rápida por parte dos investigadores e clínicos, tanto de variantes patogénicas como polimórficas, auxiliando a interpretação de variantes, essencial para a tomada de decisões de tratamento.

Várias mutações patogénicas e provavelmente patogénicas foram partilhadas por doentes com adenomas hipofisários esporádicos e familiares, indicando assim potenciais *hotspots* mutacionais ou efeitos fundadores. Nomeadamente, a variante c.910C>T (p.Arg304Ter) tem sido observada em diversas populações (61, 81, 101, 260, 262, 274, 275, 285, 286, 287, 288), e nesta revisão representou uma frequência de 8,9% em casos esporádicos e de 14,1% em casos familiares index. Da mesma forma, a variante *missense* c.811C>T (p.Arg271Trp) foi identificada em indivíduos geograficamente dispersos e não relacionados (57, 89, 101, 102, 274, 289).

Foi ainda realizada análise estatística de forma a comparar o tipo de variante (truncadoras e não truncadoras) entre casos index familiares e esporádicos, com o objetivo de clarificar a relação entre o tipo de variante e a expressividade da doença. As variantes truncadoras podem conduzir a um códon *stop* prematuro e, conseqüentemente, à formação de uma proteína mais curta ou ao decaimento mediado por *nonsense* (290). Por conseguinte, tratam-se de mutações de perda de função que podem eliminar domínios proteicos importantes para a ligação da proteína *AIP* aos seus parceiros de interação, sendo consideradas variantes mais disruptivas (291). Tendo em conta as variantes truncadoras e não truncadoras (patogénicas e provavelmente patogénicas), a análise estatística não revelou diferenças estatisticamente significativas entre casos esporádicos e familiares index.

Este estudo apresenta algumas limitações. Primeiro, o número reduzido de casos familiares index e o elevado número de casos de doentes indeterminados que, por não

#### 4. Discussão

haver informação clínica disponível não foram considerados para análise estatística, diminuiu o poder das análises estatísticas realizadas. Análises com coortes de maior dimensão poderão ajudar a esclarecer a associação do tipo de mutação com a forma de apresentação do tumor (esporádico ou familiar), idade de diagnóstico, agressividade e subtipo de tumor. Segundo, a ausência de estudos funcionais realizados para as variantes identificadas, comprometem a elucidação do verdadeiro poder patogénico de um grande número de variantes de significado indeterminado. Terceiro, na maioria dos artigos analisados para esta revisão, não foi feita a pesquisa de variações de número de cópias (CNVs, *Copy number variations*) do gene *AIP*, e embora alguns estudos indiquem que estas deleções podem ser pouco frequentes (101, 236), foram recentemente identificadas algumas deleções parciais e totais do gene *AIP* em doentes com adenomas hipofisários esporádicos e familiares (275, 288, 292). Por último, a ferramenta de interpretação de variantes Franklin, na qual a patogenicidade foi baseada, não é 100% sensível nem específica (279), podendo ocorrer erros na classificação de variantes, especialmente na ausência de estudos funcionais e de segregação familiar.

## **4.2 Estudo 2 – Estudo da prevalência de mutações no gene *AIP* em doentes portugueses com macroadenomas hipofisários esporádicos**

A prevalência de variantes patogénicas e provavelmente patogénicas identificadas no gene *AIP* na nossa coorte de doentes com macroadenomas hipofisários esporádicos diagnosticados com idade inferior a 40 anos foi de 1,8% (4/218). Isto representa uma prevalência baixa quando comparada com a de outros estudos realizados em França (16/222, 7,2%) (236), no Brasil (11/132, 8,3%) (265) e na Austrália (6/34, 17,6%) (274). Outros estudos utilizaram limites de idade mais baixos para analisar a prevalência de mutações no gene *AIP*. Por exemplo, uma colaboração pan-europeia (101) analisou uma coorte de 163 doentes diagnosticados com macroadenomas hipofisários esporádicos antes dos 30 anos de idade e registou uma prevalência de 11,7% (19/163) de mutações no gene *AIP*. Da mesma forma, outros estudos realizados na Turquia (293), México (286) e Espanha (102), em doentes com menos de 30 anos, relataram prevalências de mutações neste gene de 9% (1/11), 7% (5/55) e 6% (9/148), respetivamente. Em contraste, o nosso estudo mostrou que apenas 3,4% (4/118) dos doentes portugueses diagnosticados com idade inferior a 30 anos tinham mutações no gene *AIP*. Além disso, apenas 5,0% (1/20) dos nossos doentes pediátricos apresentavam mutações neste gene, o que também representa uma prevalência mais baixa do que noutros estudos (101, 102, 236, 265, 286). Curiosamente, as prevalências registadas no Reino Unido (2/100, 2%, com menos de 40 anos) (282) e na Alemanha (2/82, 2,4%, com menos de 30 anos) (292) mostraram ser mais próximas das observadas no nosso estudo. Mais recentemente, um estudo realizado na Polónia, que incluiu 131 doentes com macroadenomas de todas as idades, não conseguiu identificar quaisquer mutações patogénicas no gene *AIP* (294).

Pode haver várias explicações para as diferenças observadas nas populações estudadas. Em primeiro lugar, podem existir diferenças geográficas e étnicas na composição genética das populações e efeitos fundadores que aumentam a frequência de determinadas mutações. Em segundo lugar, as características clínicas gerais dos doentes podem diferir entre as coortes. Por exemplo, como as mutações no gene *AIP* ocorrem mais frequentemente em tumores secretores de GH (288), as coortes que são enriquecidas por doentes com acromegalia podem apresentar uma maior prevalência destas mutações. Por último, os critérios para classificar as variantes genéticas como patogénicas variam frequentemente entre os estudos. Várias variantes genéticas reportadas como patogénicas ou VUS em estudos anteriores são agora consideradas variantes benignas. Por exemplo, as variantes benignas *missense* (p.Arg16His e

#### 4. Discussão

p.Ala299Val) e não codificantes (c.\*14C>A e c.\*64G>A), que excluimos do nosso estudo, foram incluídas nos dados de prevalência de outros estudos (236, 265). A inclusão de VUS em estudos de prevalência é particularmente problemática porque a sua interpretação é frequentemente difícil e, ao longo do tempo, muitas são reclassificadas como variantes benignas (295). Assim, é possível que estudos anteriores tenham sobrestimado a prevalência de verdadeiras variantes patogénicas nos macroadenomas hipofisários de início jovem.

Foram identificadas quatro mutações no gene *AIP*, incluindo duas novas (c.158\_165delGCCGGGCT (p.Ser53Thrfs\*36) e c.736G>T (p.Glu246\*)) e duas que já tinham sido descritas anteriormente em doentes de outros países (c.241C>T (p.Arg81\*) e c.343delC (p.Leu115Trpfs\*41)) (260, 261). As mutações identificadas neste estudo foram todas identificadas em doentes com adenomas secretores de GH. Este facto não é inesperado, uma vez que se verificou que as mutações no gene *AIP* são mais prevalentes neste tipo de tumor (288). Para além da idade jovem dos doentes, a evolução clínica da doença não era particularmente invulgar e a cirurgia hipofisária foi curativa em todos os doentes, à exceção de um. Assim, neste grupo limitado de doentes, não foi possível confirmar relatos anteriores que sugeriam um resultado mais desfavorável em doentes com mutações no gene *AIP* (99, 296).

Nenhum dos doentes com mutações neste gene referiu história familiar de adenomas hipofisários. No entanto, em dois casos, a mutação foi também identificada num progenitor assintomático que será agora submetido a uma avaliação clínica, bioquímica e imagiológica. Resta saber se estes portadores da mutação têm adenomas clinicamente silenciosos ou se a penetrância das mutações é incompleta. Estima-se que mutações neste gene estejam associadas a uma penetrância da doença de apenas 20-25% (89) e isto explica porque é que os membros da família que partilham a mesma mutação frequentemente não expressam a doença. No entanto, a nossa identificação de doentes com mutações no gene *AIP* permitirá o rastreio genético em cascata dos membros da família, a identificação de portadores de mutações adicionais, o rastreio clínico destes portadores de mutações e um diagnóstico e tratamento mais precoces e, possivelmente, um melhor resultado a longo prazo de quaisquer tumores hipofisários existentes (275).

Este estudo tem algumas limitações. Em primeiro lugar, não procurámos grandes deleções no gene *AIP* que foram relatadas anteriormente (81, 292, 297). No entanto, os estudos que utilizam Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) em grandes coortes de doentes não identificaram quaisquer deleções genéticas, indicando que é pouco provável que estas

sejam frequentes (101, 236). Em segundo lugar, embora tenhamos excluído os doentes com evidência de outros tumores endócrinos coexistentes ou outras características sugestivas de formas sindrômicas de adenomas hipofisários, não podemos excluir a possibilidade de um adenoma hipofisário ser a primeira manifestação de uma síndrome não diagnosticada.

#### 4. Discussão

### 4.3 Estudo 3 - Identificação de mutações germinativas em doentes portugueses com macroadenomas hipofisários esporádicos de início precoce, através da análise de um painel multigénico

Nos adenomas da hipófise, tanto nos casos familiares como nos esporádicos, a ocorrência e a frequência de mutações no gene *AIP* têm sido amplamente estudadas e têm contribuído para o diagnóstico e tratamento da doença (101, 102, 236, 265, 293). No entanto, começam a surgir estudos recentes que relatam mutações noutros genes associados a adenomas hipofisários, levando a novos conhecimentos sobre a doença (60, 98, 157). Um estudo realizado na Austrália por De Sousa *et al.* (274) relatou que 20% dos doentes recrutados com adenomas hipofisários apresentavam variantes raras potencialmente nefastas (categorias 3-5) em 3 genes associados a síndromes de adenomas hipofisários familiares (*AIP*, *SDHB* e *SDHC*). No entanto, se apenas forem consideradas as variantes patogénicas, a prevalência diminuiu para 11% (4/36), sendo o *AIP* o único gene a apresentar variantes patogénicas.

No presente estudo, descrevemos a utilização de um painel multigénico de 29 genes associados a adenomas hipofisários, numa coorte alargada de doentes portugueses com macroadenomas hipofisários diagnosticados com idade inferior a 40 anos. A nossa análise de 225 doentes com macroadenomas hipofisários esporádicos de início precoce mostrou que 16 (7,1%) doentes apresentavam mutações germinativas em genes que estão associados a formas familiares de adenomas hipofisários. Estas mutações envolveram os genes *AIP* (1,8% dos doentes), *PMS2* (1,8%), *MEN1* (0,9%), *VHL* (0,9%), *CDH23* (0,4%), *MSH2* (0,4%), *SDHB* (0,4%) e *TP53* (0,4%).

O gene *AIP* está associado a FIPA (61), mas também tem sido amplamente estudado em doentes com adenomas hipofisários esporádicos. A prevalência de mutações germinativas neste gene em doentes com macroadenomas hipofisários esporádicos com idade inferior a 40 anos foi descrita como variando entre 0% e 18% (267), dependendo do país de origem, das características clínicas da coorte e dos critérios utilizados para a classificação de variantes genéticas. Identificámos quatro (1,8%) doentes com mutações no gene *AIP*, que consistiram em mutações *frameshift* (p.Ser53Thrfs\*36, e p.Leu115Trpfs\*41) e *nonsense* (p.Arg81\*, e p.Glu246\*) as quais se espera que conduzam a um códon *stop* prematuro e, conseqüentemente, à formação de uma proteína truncada ou ao decaimento mediado por *nonsense* (290). Estas mutações *AIP* foram todas encontradas em doentes com adenomas secretores de GH, em concordância com a maior

#### 4. Discussão

prevalência de mutações *AIP* neste tipo de tumor (288). Estes resultados confirmam os resultados da nossa anterior sequenciação Sanger do gene *AIP* nesta coorte de doentes (Estudo 2 – Anexo 2).

O gene *PMS2* está associado à Síndrome de Lynch, que se caracteriza pela ocorrência de diversos tipos de cancro como colorretal, endometrial, ovárico e gástrico e tumores cerebrais malignos (168). Embora alguns casos de tumores hipofisários agressivos, incluindo corticotrofinomas, macroprolactinomas e NFPA, tenham sido relatados em doentes com Síndrome de Lynch (70, 72, 169), a prevalência de mutações no gene *PMS2* em adenomas hipofisários esporádicos nunca foi relatada. Identificámos quatro (1,8%) doentes com mutações no gene *PMS2*, sem outras manifestações aparentes desta Síndrome. Estas mutações consistiram numa mutação missense (p.Asn335Ser) previamente descrita (270), identificada simultaneamente em três doentes, diagnosticados com somatotrofinoma, prolactinoma e NFPA e uma nova mutação *frameshift* (p.Asp486Glufs\*109) num doente diagnosticado com prolactinoma. O nosso estudo relata uma mutação provavelmente patogénica recorrente no gene *PMS2*, a qual foi observada em três doentes não relacionados, mostrando que este gene pode desempenhar um papel importante na tumorigénese hipofisária.

O gene *MEN1* está associado à Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 1 (MEN1), que se caracteriza pela ocorrência de tumores da paratiroide, do pâncreas e da hipófise (142, 298). As mutações neste gene são ocasionalmente encontradas em doentes com adenomas hipofisários sem outras manifestações de MEN1. Um estudo anterior identificou mutações no gene *MEN1* em 3,4% dos doentes com macroadenomas hipofisários esporádicos diagnosticados antes dos 30 anos de idade (262). Neste estudo foram identificados dois (0,9%) doentes com mutações neste gene, as quais consistiram numa mutação *nonsense* previamente relatada (142) (p.Trp183\*) e uma nova deleção *in-frame* (p.Arg314\_Asp315del). Ambos os doentes foram diagnosticados com adenomas mistos secretores de GH. É interessante notar que, embora não houvesse outras manifestações aparentes da síndrome MEN1 na altura do diagnóstico do adenoma hipofisário, ambos os doentes acabaram por serem diagnosticados com hiperparatiroidismo durante ou após a realização dos estudos genéticos.

O gene *VHL* está associado à Síndrome de Von Hippel-Lindau, que se caracteriza por tumores em vários órgãos, como hemangioblastomas da retina e do sistema nervoso central, feocromocitomas e carcinoma renal de células claras (299). Também foram descritos adenomas da hipófise em doentes com a síndrome VHL (76). No entanto, a prevalência de mutações no gene *VHL* em adenomas hipofisários esporádicos não foi

relatada. Neste estudo, foram identificados dois (0,9%) doentes com mutações neste gene, sem outras manifestações aparentes da síndrome VHL. Estas consistiram numa mutação *nonsense* (p.Glu52\*) previamente descrita (212) num doente com um prolactinoma e numa mutação *missense* (p.Lys196Glu) previamente descrita (30) num doente com um tirotrofinoma. Esta última mutação foi previamente descrita em homozigotia num doente com eritrocitose congénita autossómica recessiva, mas sem evidência da síndrome VHL (272). Por conseguinte, continua por esclarecer se a heterozigotia para esta mutação específica, tal como encontrada no nosso doente, pode causar a síndrome VHL.

O gene *MSH2* também está associado à síndrome de Lynch e, como já foi referido, alguns casos de adenomas hipofisários agressivos têm sido associados a mutações neste gene (70, 72, 169). Neste contexto, identificámos um (0,5%) doente, diagnosticado com um prolactinoma, com uma mutação *missense* no gene *MSH2* (p.Arg524His) previamente descrita (269).

O gene *SDHB* está associado a paragangliomas e feocromocitomas (300). Ocasionalmente, os adenomas da hipófise ocorrem em associação com estes (síndrome 3PA) (77). No entanto, a prevalência de mutações no gene *SDHB* em doentes com adenomas hipofisários esporádicos é desconhecida. Um estudo francês com uma coorte de 263 doentes com adenomas hipofisários esporádicos revelou duas mutações no gene *SDHA*, uma no gene *SDHC*, mas nenhuma no *SDHB* (301). No presente estudo, identificámos um doente (0,5%) com uma mutação *missense* no gene *SDHB* (p.Ile127Leu) previamente descrita (192), diagnosticado com um prolactinoma sem quaisquer outras manifestações sindrómicas.

O gene *TP53* é considerado o gene supressor de tumores mais mutado em cancros humanos (196). As mutações germinativas neste gene estão associadas à síndrome de Li-Fraumeni, uma doença rara que predispõe a cancro e pode manifestar-se em sarcomas de tecidos moles (197, 198), osteossarcoma (302, 303), cancro da mama (304, 305), leucemia (306, 307) e carcinoma adrenocortical (308). Neste estudo, identificámos um (0,4%) doente com uma mutação *missense* (p.Arg282Gln) no gene *TP53*, previamente descrita (271), diagnosticado com um corticotrofinoma sem quaisquer outras manifestações sindrómicas. Assim, o nosso estudo relata uma mutação patogénica germinativa no gene *TP53* num caso de adenoma hipofisário.

Por fim, o gene *CDH23* está associado à Síndrome de Usher, autossómica recessiva, que se caracteriza por surdez congénita (309). No entanto, um estudo de Zhang et al. (58) demonstrou a presença de mutações em heterozigotia neste gene em 33% e 12% dos

#### 4. Discussão

adenomas hipofisários familiares e isolados, respetivamente. Até à data, estes resultados não foram confirmados de forma independente. Além disso, não há relatos de uma maior incidência de adenomas hipofisários em doentes com síndrome de Usher ou nos seus familiares heterozigóticos. Neste estudo, foi identificado um (0,5%) doente diagnosticado com um adenoma secretor de GH com uma mutação *missense* no gene *CDH23* (p.Glu2520Lys) previamente descrita (268). Assim, o nosso estudo representa a primeira confirmação independente do papel do gene *CDH23* no desenvolvimento de adenomas hipofisários.

Nenhum dos doentes incluídos no nosso estudo apresentava história familiar conhecida de adenomas hipofisários ou coexistência de outros tumores endócrinos que levantasse a suspeita de uma mutação germinativa. A identificação inesperada de mutações germinativas num subconjunto de doentes com tumores esporádicos pode ter várias explicações. Em primeiro lugar, a história familiar foi auto-relatada pelos doentes e pode ter sido imprecisa ou incompleta. Em segundo lugar, a ausência de outros membros da família afetados pode ter sido devida a uma penetrância incompleta da mutação ou a uma mutação *de novo* no doente. Em terceiro lugar, outras manifestações sindrómicas podem ter passado despercebidas no rastreio clínico ou estar ausentes devido à expressão variável da mutação. É importante salientar que a nossa identificação de doentes com mutações germinativas irá melhorar a sua gestão clínica e permitir a identificação de outros membros da família afetados que podem ser rastreados para a doença (254).

Estudos anteriores de adenomas hipofisários esporádicos centraram-se principalmente no gene *AIP*, uma vez que este é o gene mais frequentemente mutado nestes casos (100). Apenas outros três estudos realizaram análises de painéis de genes em doentes com adenomas hipofisários esporádicos, mas com um número limitado de genes ( $\leq 9$ ) que não incluíam, por exemplo, os genes *VHL*, *PMS2* ou *CDH23* (102, 274, 301). No entanto, estes estudos foram capazes de identificar variantes patogénicas em 3,8% a 10% dos doentes com adenomas hipofisários esporádicos de início jovem.

No nosso estudo, analisámos o maior painel de genes até à data em doentes com adenomas hipofisários esporádicos. Confirmámos que o gene *AIP* é o gene mais frequentemente envolvido nestes doentes, mas também descobrimos outras causas genéticas mais raras de adenomas hipofisários. No total, as mutações germinativas estavam presentes em 7,1% dos nossos doentes diagnosticados com macroadenomas esporádicos com idade inferior a 40 anos. No entanto, esta proporção aumentou para 9,0% e 12% em doentes diagnosticados com idades inferiores a 30 e 18 anos,

respetivamente. Este facto está de acordo com a observação geral de que os tumores que surgem em idades mais jovens têm maior probabilidade de ter uma causa genética.

A existência de subconjuntos de doentes com maior risco de albergar mutações germinativas levou a recomendações para o teste de mutações para os genes *AIP* e *MEN1* em doentes com macroadenomas hipofisários diagnosticados com idade inferior a 30 (101, 262) ou 40 anos (236). No entanto, não existem atualmente recomendações para testes genéticos adicionais em adenomas hipofisários esporádicos que se tenham revelado negativos para mutações nestes genes. O nosso estudo sugere que testar estes doentes para um painel genético mais alargado pode revelar mais casos de adenomas hipofisários geneticamente determinados.

Este estudo tem algumas limitações. Em primeiro lugar, não procurámos variantes no número de cópias ou mutações em regiões genómicas não codificantes. Em segundo lugar, não procurámos mutações noutros genes para além dos que até agora têm sido associados a adenomas hipofisários. Em terceiro lugar, encontramos um grande número de VUS, para as quais não existem atualmente provas suficientes de uma associação com a doença, mas que podem necessitar de reclassificação ao longo do tempo (295). Por último, não confirmámos as variantes identificadas por estudos funcionais e/ou de segregação familiar.

#### 4. Discussão

#### 4.4 Estudo 4 – Estudo de associação genética caso-controlo

Este estudo de caso-controlo revelou um aumento da frequência do alelo menor de *CDK8* rs17083838 (alelo A) em doentes diagnosticados com adenomas hipofisários esporádicos. Os indivíduos com genótipos que contêm pelo menos um alelo menor (A) foram associados a um risco 1,82 vezes maior de desenvolver adenomas hipofisários esporádicos, em comparação com indivíduos com o genótipo homocigótico GG (modelo de hereditariedade dominante, OR 1,82, IC 95% 1,24-2,68,  $p = 0,002$ ). Estes resultados sugerem que esta variante genética, que foi identificada como um locus de risco num GWAS anterior (115), é também uma variante de suscetibilidade para adenomas hipofisários esporádicos na população portuguesa.

Até à data, não existem estudos funcionais do polimorfismo rs17083838, pelo que continua a não ser claro o mecanismo pelo qual este polimorfismo influencia a patogénese dos adenomas hipofisários. O polimorfismo rs17083838 está localizado no primeiro intrão do gene *CDK8*, que está sobreexpresso em vários tipos de tumores (310). Este gene codifica a CDK8, pertencente à família das proteínas dependentes da ciclina, e que inclui importantes reguladores envolvidos na progressão do ciclo celular (310). A proteína CDK8 interage com E2F1, protegendo a  $\beta$ -catenina do efeito inibitório de E2F1, permitindo a sua interação com as proteínas Wnt (311). A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina é importante durante o desenvolvimento, regula vários aspetos da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência celular (312), e demonstrou estar sobreexpressa nos adenomas hipofisários (225, 226). Além disso, estudos de modelos animais de adenomas hipofisários mostraram que vários genes alvo da CDK8 são diferencialmente expressos nestes tumores, sugerindo um papel desta cinase na tumorigénese hipofisária (313).

As variantes do *NEBL* rs2359536 (T>C) e *PCDH15* rs10763170 (C>T) não foram associadas a adenomas hipofisários esporádicos no nosso estudo, apesar da sua associação relatada na população chinesa Han (115). No entanto, o alelo menor do *PCDH15* rs10763170 (alelo T) apresentou uma associação quase significativa com somatotrofinomas (modelo de hereditariedade dominante, OR 1,55, 95% CI 1,02-2,35,  $p = 0,035$ ). O polimorfismo rs10763170 está localizado a montante do gene *PCDH15* que codifica a proteína PCDH15. Como já referido anteriormente, esta proteína é um membro da superfamília das caderinas que está envolvida na adesão celular, morfogénese, reconhecimento e sinalização celular (314), e no desenvolvimento e progressão de diversos tumores (315). A PCDH15 é mais conhecida pelo seu papel na perda auditiva hereditária (síndrome de Usher tipo 1F) (316). No entanto, foi demonstrado que a

#### 4. Discussão

expressão reduzida de PCDH15 aumenta a proliferação de células progenitoras de oligodendrócitos e a progressão de gliomas (317). Mais importante ainda, foi demonstrado que a PCDH15 interage com a CDH23 (318), que foi implicada em formas esporádicas e familiares de tumores da hipófise (58). São necessários mais estudos para determinar se a PCDH15 também está envolvida na tumorigênese da hipófise.

Os mecanismos exatos através dos quais estes SNPs contribuem para a tumorigênese dos adenomas hipofisários são ainda desconhecidos. Estas variantes genéticas estão localizadas em regiões não codificantes, e desconhece-se atualmente se têm um efeito direto na expressão genética ou se estão em desequilíbrio de ligação com outras variantes funcionais próximas. Serão necessários estudos adicionais para determinar as consequências funcionais destes SNPs.

Os resultados deste estudo validam parcialmente os obtidos pelo GWAS na população chinesa Han (115). Resta determinar se as associações observadas também podem ser replicadas noutras populações europeias e não europeias, com diferentes exposições ambientais e perfis genéticos. Para além disso, estudos com amostras de maior dimensão poderão ajudar a esclarecer se as associações são mais fortes em subtipos específicos de tumores.

## **5. Conclusões e perspetivas futuras**



## 5. Conclusões e perspectivas futuras

No decorrer desta tese, diversas estratégias foram desenvolvidas e implementadas de forma a determinar quais os fatores de risco genético mais associados a adenomas hipofisários esporádicos e familiares.

A descoberta do gene *AIP* como um gene envolvido em adenomas hipofisários esporádicos e familiares trouxe novas informações sobre as causas genéticas desta doença e, embora as técnicas baseadas em NGS tenham proporcionado avanços significativos na genética humana, é crucial classificar com precisão a patogenicidade de novas variantes genéticas identificadas. Em particular, a busca contínua de variantes germinativas no gene *AIP* e o esclarecimento da patogenicidade das VUS, utilizando dados atualizados, em casos esporádicos e familiares, podem ajudar a identificar indivíduos em risco e conduzir a um diagnóstico pré-clínico, tratamento e acompanhamento. Neste sentido, foi conduzida a mais alargada e atualizada revisão de variantes germinativas identificadas no gene *AIP*, em casos esporádicos e familiares de adenomas hipofisários, com o intuito de chamar a atenção para a atualização contínua destas variantes, encontradas no contexto desta doença, e para a importância da classificação de patogenicidade das mesmas. Esta atualização poderá ser um ponto de partida para uma reclassificação contínua da patogenicidade das variantes, de modo a realizar um diagnóstico genético mais preciso.

No seguimento desta ideia, considerámos relevante determinar a frequência de variantes germinativas no gene *AIP* em doentes portugueses diagnosticados com macroadenomas hipofisários esporádicos de início jovem. Assim, através da sequenciação de Sanger, foi possível determinar uma frequência de variantes germinativas no gene *AIP* de 8,3% da nossa coorte. No entanto, apenas 1,8% dos doentes apresentavam variantes patogénicas neste gene, sendo que em doentes com idade inferior a 30 e 18 anos esta frequência foi de 3,4% e 5%, respetivamente. É importante salientar que o presente trabalho permitiu a identificação de novas variantes patogénicas no gene *AIP*, ou seja, não descritas na literatura, contribuindo assim para a expansão do espetro conhecido de causas genéticas desta doença, e para a compreensão da tumorigénese hipofisária.

Nesta tese foi ainda realizada, até à data, a maior análise multigénica de doentes com macroadenomas hipofisários esporádicos de início jovem. Identificámos os genes *AIP* e *PMS2* como genes predominantes e, pela primeira vez, evidenciamos uma confirmação independente da contribuição do gene *CDH23* na tumorigénese hipofisária. Com 7,1% dos doentes da nossa coorte a apresentarem mutações patogénicas germinativas, este trabalho sublinha a importância de um rastreio genético abrangente, especialmente para

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

os doentes diagnosticados com menos de 30 e 18 anos (9,0% e 12% de frequências de mutação, respetivamente). Estes resultados não só melhoram a nossa compreensão do panorama genético dos adenomas hipofisários, como também orientam estratégias de rastreio genético direcionadas, oferecendo conhecimentos fundamentais para a gestão personalizada dos macroadenomas hipofisários de início jovem.

Os resultados obtidos nesta tese sugerem ainda que o polimorfismo rs17083838, localizado perto do gene *CDK8*, e possivelmente o polimorfismo rs10763170, perto do gene *PCDH15*, podem aumentar a suscetibilidade a adenomas hipofisários esporádicos na população portuguesa. Estas evidências contribuem para uma melhor compreensão acerca da etiologia genética dos adenomas hipofisários esporádicos.

Embora os objetivos principais desta tese de doutoramento tenham sido alcançados, os resultados obtidos abrem novas perspectivas futuras. Em primeiro lugar, nos doentes em que foram identificadas variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas, seria interessante determinar as suas consequências funcionais ao nível das proteínas codificadas e a sua co-segregação com outros membros da família. Neste sentido, as ferramentas bioinformáticas serão úteis para avaliar os aspetos funcionais e estruturais das variantes e o seu potencial impacto na proteína codificada. Em segundo lugar, o elevado número de VUS poderá estar a comprometer o verdadeiro diagnóstico genético de alguns doentes. Assim, também o uso de estudos de segregação familiar e estudos funcionais *in vitro* e *in silico* poderão ajudar a clarificar a patogenicidade destas variantes. Em terceiro lugar, seria importante a atualização contínua do painel multigénico com outros genes que possam estar implicados na tumorigénese hipofisária e que possam estar na base da doença nos doentes em que não foram identificadas mutações causais. A utilização das técnicas de NGS para a avaliação de múltiplos genes em simultâneo pode assim melhorar a compreensão da tumorigénese hipofisária e, consequentemente, abrir caminho a novas ofertas diagnósticas e terapêuticas para doentes com adenomas hipofisários e seus familiares.

## **6. Referências bibliográficas**



## 6. Referências Bibliográficas

1. Barkhoudarian G & Kelly DF. The Pituitary Gland: Anatomy, Physiology, and its Function as the Master Gland. In *Cushing's Disease*, ch. 1, pp 1–41. Elsevier, 2017.
2. Dorton A. The Pituitary Gland: Embryology, Physiology, and Pathophysiology. *Neonatal Network* 2000 **19** 9–17. (doi:10.1891/0730-0832.19.2.9)
3. Asa SL & Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nature Reviews Cancer* 2002 **2** 836–849. (doi:10.1038/nrc926)
4. Vidal S, Horvath E, Kovacs K, & Scheithauer BW. Tumors of the Adenohypophysis. In *Endocrine Pathology*, pp 61–74. New Jersey: Humana Press, 2003.
5. Galván A. Puberty. In *The Neuroscience of Adolescence*, pp 21–49. Cambridge University Press, 2013.
6. Stanfield JP. The Blood Supply Of The Human Pituitary Gland. *Journal of anatomy* 1960 **94** 257–273.
7. Hong GK, Payne SC, & Jane JA. Anatomy, Physiology, and Laboratory Evaluation of the Pituitary Gland. *Otolaryngologic Clinics of North America* 2016 **49** 21–32. (doi:10.1016/j.otc.2015.09.002)
8. Fox SI. Endocrine glands - secretion and action of hormones. In *Fundamentals of Humans Physiology*, edn 12nd, pp 311–354. McGrawHill, 2011.
9. Hadley M & Levine JE. Endocrinology. Toronto: Simon & Schuster, 1996.
10. Dubois PM & ElAmraoui A. Embryology of the pituitary gland. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 1995 **6** 1–7. (doi:10.1016/1043-2760(94)00090-Q)
11. Davis SW, Ellsworth BS, Pérez Millan MI, Gergics P, Schade V, Foyouzi N, Brinkmeier ML, Mortensen AH, & Camper SA. Pituitary Gland Development and Disease. In *Current Topics in Developmental Biology*, pp 1–47. 2013.
12. Yeung CM, Chan CB, Leung PS, & Cheng CHK. Cells of the anterior pituitary. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2006 **38** 1441–1449. (doi:10.1016/j.biocel.2006.02.012)
13. Kovacs K & Asa S. Functional Endocrine Pathology. edn 2nd, Oxford: Blackwell

## 6. Referências Bibliográficas

- Science,1998.
14. Nelson DL & Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. edn 4th, W. H. Freeman,2004.
  15. Ben-Shlomo A & Melmed S. Hypothalamic Regulation of Anterior Pituitary Function. In *The Pituitary*, edn 3rd, pp 21–45. Elsevier,2011.
  16. Borrow AP, Stover SA, Bales NJ, & Handa RJ. Posterior Pituitary Hormones. In *Hormonal Signaling in Biology and Medicine: Comprehensive Modern Endocrinology*, G. Litwack. pp 203–226. Elsevier,2019.
  17. Theodros D, Patel M, Ruzevick J, Lim M, & Bettegowda C. Pituitary adenomas: historical perspective, surgical management and future directions. *CNS Oncology* 2015 **4** 411–429. (doi:10.2217/cns.15.21)
  18. Lake MG, Krook LS, & Cruz S V. Pituitary adenomas: an overview. *American family physician* 2013 **88** 319–327.
  19. Melmed S. Pituitary Tumors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2015 **44** 1–9. (doi:10.1016/j.ecl.2014.11.004)
  20. Varlamov E V., McCartney S, & Fleseriu M. Functioning pituitary adenomas - Current treatment options and emerging medical therapies. *European Endocrinology* 2019 **15** 30–40. (doi:10.17925/EE.2019.15.1.30)
  21. Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nature Reviews Endocrinology* 2011 **7** 257–266. (doi:10.1038/nrendo.2011.40)
  22. Gold EB. Epidemiology of pituitary adenomas. *Epidemiologic Reviews* 1981 **3** 163–183. (doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a036232)
  23. Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA, & Beckers A. High prevalence of pituitary adenomas: A cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006 **91** 4769–4775. (doi:10.1210/jc.2006-1668)
  24. Fernandez A, Karavitaki N, & Wass JAH. Prevalence of pituitary adenomas: A community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clinical Endocrinology* 2010 **72** 377–382. (doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03667.x)

25. Mete O, Cintosun A, Pressman I, & Asa SL. Epidemiology and biomarker profile of pituitary adenohypophysial tumors. *Modern Pathology* 2018 **31** 900–909. (doi:10.1038/s41379-018-0016-8)
26. Melmed S. Pituitary-Tumor Endocrinopathies. *New England Journal of Medicine* 2020 **382** 937–950. (doi:10.1056/nejmra1810772)
27. Hemminki K, Försti A, Ji J, & Ji A. Incidence and familial risks in pituitary adenoma and associated tumors. *Endocrine-Related Cancer* 2007 **14** 103–109. (doi:10.1677/ERC-06-0008)
28. Ntali G & Wass JA. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary* 2018 **21** 111–118. (doi:10.1007/s11102-018-0869-3)
29. Kopczak A, Renner U, Stalla G, & Karl Stalla G. Advances in understanding pituitary tumors. *F1000Prime Reports* 2014 **6** 4–9. (doi:10.12703/p6-5)
30. Molitch ME. Diagnosis and treatment of pituitary adenomas: A review. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 2017 **317** 516–524. (doi:10.1001/jama.2016.19699)
31. Lecoq AL, Kamenický P, Guiochon-Mantel A, & Chanson P. Genetic mutations in sporadic pituitary adenomas - What to screen for? *Nature Reviews Endocrinology* 2015 **11** 43–54. (doi:10.1038/nrendo.2014.181)
32. Aflorei ED & Korbonits M. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. *Journal of Neuro-Oncology* 2014 **117** 379–394. (doi:10.1007/s11060-013-1354-5)
33. Araujo-Castro M, Berrocal VR, & Pascual-Corrales E. Pituitary tumors: epidemiology and clinical presentation spectrum. *Hormones* 2020 **19** 145–155. (doi:10.1007/s42000-019-00168-8)
34. Mindermann T & Wilson CB. Age-related and gender-related occurrence of pituitary adenomas. *Clinical Endocrinology* 1994 **41** 359–364. (doi:10.1111/j.1365-2265.1994.tb02557.x)
35. Al-Brahim NY & Asa SL. My approach to pathology of the pituitary gland. *Journal of Clinical Pathology* 2006 **59** 1245–1253. (doi:10.1136/jcp.2005.031187)

## 6. Referências Bibliográficas

36. Webb SM & Badia X. Quality of Life in Growth Hormone Deficiency and Acromegaly. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2007 **36** 221–232. (doi:10.1016/j.ecl.2006.11.011)
37. Dekkers OM, Biermasz NR, Pereira AM, Roelfsema F, Aken MO van, Voormolen JHC, & Romijn JA. Mortality in patients treated for Cushing's disease is increased, compared with patients treated for non-functioning pituitary macroadenoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007 **92** 976–981. (doi:10.1210/jc.2006-2112)
38. Kauppinen-Makelin R, Sane T, Sintonen H, Kauppinen-Mäkelin R, Sane T, Sintonen H, Markkanen H, Välimäki MJ, Löyttyniemi E, Niskanen L, Reunanen A, & Stenman UH. Quality of life in treated patients with acromegaly. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006 **91** 3891–3896. (doi:10.1210/jc.2006-0676)
39. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, & McCutcheon IE. The prevalence of pituitary adenomas: A systematic review. *Cancer* 2004 **101** 613–619. (doi:10.1002/cncr.20412)
40. Marques P & Korbonits M. Genetic Aspects of Pituitary Adenomas. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 2017 **46** 335–374. (doi:10.1016/j.ecl.2017.01.004)
41. Naves LA, Jaffrain-Rea ML, Vêncio SAC, Jacomini CZ, Casulari LA, Daly AF, & Beckers A. Aggressive prolactinoma in a child related to germline mutation in the ARYL hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2010 **54** 761–767. (doi:10.1590/S0004-27302010000800017)
42. Mehta GU & Lonser RR. Management of hormone-secreting pituitary adenomas. *Neuro-Oncology* 2017 **19** 762–773. (doi:10.1093/neuonc/now130)
43. Torre D La & Falorni A. Pharmacological causes of hyperprolactinemia. *Therapeutics and clinical risk management* 2007 **3** 929–951.
44. Melmed S. Acromegaly. *New England Journal of Medicine* 2006 **355** 2558–2573. (doi:10.1056/NEJMra062453)
45. Greenspan F, Gardner DG, & Shoback D. Hipotálamo e Hipófise. In *Endocrinologia*

- Básica e Clínica*, 9<sup>a</sup>. pp 99–135. McGrawHill Interamericana,2013.
46. Holdaway IM, Bolland MJ, & Gamble GD. A meta-analysis of the effect of lowering serum levels of GH and IGF-I on mortality in acromegaly. *European Journal of Endocrinology* 2008 **159** 89–95. (doi:10.1530/EJE-08-0267)
  47. Lim CT & Korbonits MK. Update on the Clinicopathology of Pituitary Adenomas. *Endocrine Practice* 2018 **24** 473–488. (doi:10.4158/ep-2018-0034)
  48. Molitch ME. Nonfunctioning pituitary tumors. In *Handbook of Clinical Neurology*, edn 1, pp 167–184. Elsevier B.V.,2014.
  49. Olsson DS, Hammarstrand C, Bryngelsson IL, Nilsson AG, Andersson E, Johannsson G, & Ragnarsson O. Incidence of malignant tumours in patients with a non-functioning pituitary adenoma. *Endocrine-Related Cancer* 2017 **24** 227–235. (doi:10.1530/ERC-16-0518)
  50. Castinetti F, Dufour H, Gaillard S, Jouanneau E, Vasiljevic A, Villa C, & Trouillas J. Non-functioning pituitary adenoma: When and how to operate? What pathologic criteria for typing? *Annales d'Endocrinologie* 2015 **76** 220–227. (doi:10.1016/j.ando.2015.04.007)
  51. Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, & Melmed S. Clonal Origin of Pituitary Adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1990 **71** 1427–1433. (doi:10.1210/jcem-71-6-1427)
  52. Newey PJ, Nesbit MA, Rimmer AJ, Head RA, Gorvin CM, Attar M, Gregory L, Wass JAH, Buck D, Karavitaki N, Grossman AB, McVean G, Ansorge O, & Thakker R V. Whole-exome sequencing studies of nonfunctioning pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013 **98** 796–800. (doi:10.1210/jc.2012-4028)
  53. Ronchi CL, Peverelli E, Herterich S, Weigand I, Mantovani G, Schwarzmayr T, Sbiera S, Allolio B, Honegger J, Appenzeller S, Lania AG, Reincke M, Calebiro D, Spada A, Buchfelder M, Flitsch J, Strom TM, & Fassnacht M. Landscape of somatic mutations in sporadic GH-secreting pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology* 2016 **174** 363–372. (doi:10.1530/EJE-15-1064)
  54. Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, & Chin L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nature Reviews Genetics* 2013 **14** 703–718.

## 6. Referências Bibliográficas

(doi:10.1038/nrg3539)

55. Bi WL, Larsen AG, & Dunn IF. Genomic Alterations in Sporadic Pituitary Tumors. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2018 **18** . (doi:10.1007/s11910-018-0811-0)
56. Vasilev V, Daly AF, Zacharieva S, & Beckers A. Clinical and molecular update on genetic causes of pituitary adenomas. *Hormone and Metabolic Research* 2020 **52** 553–561. (doi:10.1055/a-1143-5930)
57. Daly AF, Vanbellinghen JFF, Khoo SK, Jaffrain-Rea MLL, Naves LA, Guitelman MA, Murat A, Emy P, Gimenez-Roqueplo APP, Tamburrano G, Raverot G, Barlier A, Herder W De, Penfornis A, Ciccarelli E, Estour B, Lecomte P, Gatta B, Chabre O, Sabaté MI, Bertagna X, Garcia Basavilbaso N, Stalldecker G, Colao A, Ferolla P, Wémeau JLL, Caron P, Sadoul JLL, Oneto A, ... Beckers A. Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: Analysis in 73 families. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007 **92** 1891–1896. (doi:10.1210/jc.2006-2513)
58. Zhang Q, Peng C, Song J, Zhang Y, Chen J, Song Z, Shou X, Ma Z, Peng H, Jian X, He W, Ye Z, Li Z, Wang YY, Ye H, Zhang Z, Shen M, Tang F, Chen H, Shi Z, Chen C, Chen Z, Shen Y, Wang YY, Lu S, Zhang J, Li Y, Li S, Mao Y, ... Zhao Y. Germline Mutations in CDH23, Encoding Cadherin-Related 23, Are Associated with Both Familial and Sporadic Pituitary Adenomas. *American journal of human genetics* 2017 **100** 817–823. (doi:10.1016/j.ajhg.2017.03.011)
59. Iacovazzo D, Caswell R, Bunce B, Jose S, Yuan B, Hernández-Ramírez LC, Kapur S, Caimari F, Evanson J, Ferraù F, Dang MN, Gabrovská P, Larkin SJ, Ansong O, Rodd C, Vance ML, Ramírez-Rentería C, Mercado M, Goldstone AP, Buchfelder M, Burren CP, Gurlek A, Dutta P, Choong CS, Cheetham T, Trivellin G, Stratakis CA, Lopes MB, Grossman AB, ... Korbonits M. Germline or somatic GPR101 duplication leads to X-linked acrogigantism: a clinico-pathological and genetic study. *Acta Neuropathologica Communications* 2016 **4** 56. (doi:10.1186/s40478-016-0328-1)
60. Vandeva S, Daly AF, Petrossians P, Zacharieva S, & Beckers A. Somatic and germline mutations in the pathogenesis of pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology* 2019 **181** R235–R254. (doi:10.1530/EJE-19-0602)
61. Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A,

- Tuppurainen K, Ebeling TMLL, Salmela PI, Paschke R, Gündogdu S, Menis E De, Mäkinen MJ, Launonen V, Karhu A, & Aaltonen LA. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science* 2006 **312** 1228–1230. (doi:10.1126/science.1126100)
62. Hernández-Ramírez LC, Gam R, Valdés N, Lodish MB, Pankratz N, Balsalobre A, Gauthier Y, Faucz FR, Trivellin G, Chittiboina P, Lane J, Kay DM, Dimopoulos A, Gaillard S, Neou M, Bertherat J, Assié G, Villa C, Mills JL, Drouin J, & Stratakis CA. Loss-of-function mutations in the CABLES1 gene are a novel cause of Cushing's disease. *Endocrine-Related Cancer* 2017 **24** 379–392. (doi:10.1530/ERC-17-0131)
63. Agarwal SK, Mateo CM, & Marx SJ. Rare germline mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes in multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2009 **94** 1826–1834. (doi:10.1210/jc.2008-2083)
64. Alrezk R, Hannah-Shmouni F, & Stratakis CA. MEN4 and CDKN1B mutations: The latest of the MEN syndromes Conflict of Interest Statement. *Endocrine-related cancer* 2017 **24** 1–41. (doi:10.1530/ERC-17-0243)
65. Kock L de, Sabbaghian N, Plourde F, Srivastava A, Weber E, Bouron-Dal Soglio D, Hamel N, Choi JH, Park SH, Deal CL, Kelsey MM, Dishop MK, Esbenshade A, Kuttesch JF, Jacques TS, Perry A, Leichter H, Maeder P, Brundler MA, Warner J, Neal J, Zacharin M, Korbonits M, Cole T, Traunecker H, McLean TW, Rotondo F, Lepage P, Albrecht S, ... Foulkes WD. Pituitary blastoma: a pathognomonic feature of germ-line DICER1 mutations. *Acta neuropathologica* 2014 **128** 111–122. (doi:10.1007/s00401-014-1285-z)
66. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, & Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the  $\alpha$  chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* 1989 **340** 692–696. (doi:10.1038/340692a0)
67. Roszko KL, Blouch E, Blake M, Powers JF, Tischler AS, Hodin R, Sadow P, & Lawson EA. Case Report of a Prolactinoma in a Patient With a Novel MAX Mutation and Bilateral Pheochromocytomas. *Journal of the Endocrine Society* 2017 **1** 1401–1407. (doi:10.1210/js.2017-00135)
68. Thakker R V, Newey PJ, Walls G V, Bilezikian J, Dralle H, Ebeling PR, Melmed S, Sakurai A, Tonelli F, & Brandi ML. Clinical practice guidelines for multiple

## 6. Referências Bibliográficas

- endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2012 **97** 2990–3011. (doi:10.1210/jc.2012-1230)
69. Uraki S, Ariyasu H, Doi A, Furuta H, Nishi M, Sugano K, Inoshita N, Nakao N, Yamada S, & Akamizu T. Atypical pituitary adenoma with MEN1 somatic mutation associated with abnormalities of DNA mismatch repair genes; MLH1 germline mutation and MSH6 somatic mutation. *Endocrine journal* 2017 **64** 895–906. (doi:10.1507/endocrj.EJ17-0036)
70. Loughrey PB, Baker G, Herron B, Cooke S, Iacovazzo D, Lindsay JR, & Korbonits M. Invasive ACTH-producing pituitary gland neoplasm secondary to MSH2 mutation. *Cancer genetics* 2021 **256–257** 36–39. (doi:10.1016/j.cancergen.2021.03.008)
71. Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandebroucke I, Roy N Van, Speleman F, & Paepe AD. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Human mutation* 2000 **15** 541–555. (doi:10.1002/1098-1004(200006)15:6<541::AID-HUMU6>3.0.CO;2-N)
72. Bengtsson D, Joost P, Aravidis C, Askmalm Stenmark M, Backman AS, Melin B, Salomé J von, Zagoras T, Gebre-Medhin S, & Burman P. Corticotroph Pituitary Carcinoma in a Patient With Lynch Syndrome (LS) and Pituitary Tumors in a Nationwide LS Cohort. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2017 **102** 3928–3932. (doi:10.1210/jc.2017-01401)
73. Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, & Stratakis CA. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I- $\alpha$  regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nature Genetics* 2000 **26** 89–92. (doi:10.1038/79238)
74. Beuschlein F, Fassnacht M, Assié G, Calebiro D, Stratakis CA, Osswald A, Ronchi CL, Wieland T, Sbiera S, Faucz FR, Schaak K, Schmittfull A, Schwarzmayer T, Barreau O, Vezzosi D, Rizk-Rabin M, Zabel U, Szarek E, Salpea P, Forlino A, Vetro A, Zuffardi O, Kisker C, Diener S, Meitinger T, Lohse MJ, Reincke M, Bertherat J, Strom TM, & Allolio B. Constitutive activation of PKA catalytic subunit in adrenal Cushing's syndrome. *The New England journal of medicine* 2014 **370** 1019–1028. (doi:10.1056/NEJMoa1310359)
75. Forlino A, Vetro A, Garavelli L, Ciccone R, London E, Stratakis CA, & Zuffardi O.

- PRKACB and Carney complex. *The New England journal of medicine* 2014. pp 1065–1067. . (doi:10.1056/NEJMc1309730)
76. Dénes J, Swords F, Rattenberry E, Stals K, Owens M, Cranston T, Xekouki P, Moran L, Kumar A, Wassif C, Fersht N, Baldeweg SE, Morris D, Lightman S, Agha A, Rees A, Grieve J, Powell M, Boguszewski CL, Dutta P, Thakker R V., Srirangalingam U, Thompson CJ, Druce M, Higham C, Davis J, Eeles R, Stevenson M, O’Sullivan B, ... Korbonits M. Heterogeneous genetic background of the association of pheochromocytoma/paraganglioma and pituitary adenoma: Results from a large patient cohort. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2015 **100** E531–E541. (doi:10.1210/jc.2014-3399)
77. O’Toole SM, Dénes J, Robledo M, Stratakis CA, & Korbonits M. 15 YEARS OF PARAGANGLIOMA: The association of pituitary adenomas and phaeochromocytomas or paragangliomas. *Endocrine-related cancer* 2015 **22** T105-22. (doi:10.1530/ERC-15-0241)
78. Birk H, Kandregula S, Cuevas-Ocampo A, Wang CJ, Kosty J, & Notarianni C. Pediatric pituitary adenoma and medulloblastoma in the setting of p53 mutation: case report and review of the literature. *Child’s nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 2022 **38** 1783–1789. (doi:10.1007/s00381-022-05478-8)
79. Cohen M, Persky R, Stegemann R, Hernández-Ramírez LC, Zeltser D, Lodish MB, Chen A, Keil MF, Tatsi C, Faucz FR, Buchner DA, Stratakis CA, & Tiosano D. Germline USP8 Mutation Associated with Pediatric Cushing Disease and Other Clinical Features: A New Syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2019 **104** 4676–4682. (doi:10.1210/jc.2019-00697)
80. Beckers A & Daly AF. The clinical, pathological, and genetic features of familial isolated pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology* 2007 **157** 371–382. (doi:10.1530/EJE-07-0348)
81. Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, Chapple JP, Trivellin G, Gueorguiev M, Guegan K, Stals K, Khoo B, Kumar A V., Ellard S, Grossman AB, Korbonits M, Akker S, Atkinson B, Aylwin S, Baldeweg S, Bevan J, Cheetham T, Chew S, Choudry K, Clayton R, Damjanovic S, Darzy K, Dattani M, Davis J, ... Yoshimoto K. Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Human*

## 6. Referências Bibliográficas

- Mutation* 2010 **31** 950–960. (doi:10.1002/humu.21292)
82. Williams F, Hunter S, Bradley L, Chahal HS, Storr HL, Akker SA, Kumar A V., Orme SM, Evanson J, Abid N, Morrison PJ, Korbonits M, & Brew Atkinson A. Clinical experience in the screening and management of a large kindred with familial isolated pituitary adenoma due to an aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2014 **99** 1122–1131. (doi:10.1210/jc.2013-2868)
83. Daly AF, Tichomirowa MA, & Beckers A. Genetic, molecular and clinical features of familial isolated pituitary adenomas. *Hormone research* 2009 **71 Suppl 2** 116–122. (doi:10.1159/000192448)
84. Xekouki P, Azevedo M, & Stratakis CA. Anterior pituitary adenomas: Inherited syndromes, novel genes and molecular pathways. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism* 2010 **5** 697–709. (doi:10.1586/eem.10.47)
85. Chahal HS, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, & Korbonits M. Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA). *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2010 **21** 419–427. (doi:10.1016/j.tem.2010.02.007)
86. Cazabat L, Libè R, Perlemoine K, René-Corail F, Burnichon N, Gimenez-Roqueplo APP, Dupasquier-Fediaevsky L, Bertagna X, Clauser E, Chanson P, Bertherat J, & Raffin-Sanson MLL. Germline inactivating mutations of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in a large cohort of sporadic acromegaly: Mutations are found in a subset of young patients with macroadenomas. *European Journal of Endocrinology* 2007 **157** 1–8. (doi:10.1530/EJE-07-0181)
87. Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, Tuppurainen K, Mäkinen MJ, Vierimaa O, Paschke R, Saeger W, Luijt RB van der, Sane T, Robledo M, Menis E De, Weil RJ, Wasik A, Zielinski G, Lucewicz O, Lubinski J, Launonen V, Vahteristo P, & Aaltonen LA. Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007 **104** 4101–4105. (doi:10.1073/pnas.0700004104)
88. Daly AF, Tichomirowa MA, Petrossians P, Heliövaara E, Jaffrain-Rea MLL, Barlier A, Naves LA, Ebeling T, Karhu A, Raappana A, Cazabat L, Menis E De, Montañana CF, Raverot G, Weil RJ, Sane T, Maiter D, Neggens S, Yaneva M,

- Tabarin A, Verrua E, Eloranta E, Murat A, Vierimaa O, Salmela PI, Emy P, Toledo RA, Sabaté MI, Villa C, ... Beckers A. Clinical characteristics and therapeutic responses in patients with germ-line AIP mutations and pituitary adenomas: An international collaborative study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95** 373–383. (doi:10.1210/jc.2009-2556)
89. Hernández-Ramírez LC, Gabrovská P, Dénes J, Stals K, Trivellin G, Tilley D, Ferrau F, Evanson J, Ellard S, Grossman AB, Roncaroli F, Gadelha MRMR, Korbonits M, International FIPA Consortium, Ferrau F, Evanson J, Ellard S, Grossman AB, Roncaroli F, Gadelha MRMR, & Korbonits M. Landscape of Familial Isolated and Young-Onset Pituitary Adenomas: Prospective Diagnosis in AIP Mutation Carriers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2015 **100** E1242-54. (doi:10.1210/jc.2015-1869)
90. Ozfirat Z & Korbonits M. AIP gene and familial isolated pituitary adenomas. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010 **326** 71–79. (doi:10.1016/j.mce.2010.05.001)
91. Linnert M, Lin YJJ, Manns A, Haupt K, Paschke AKK, Fischer G, Weiwad M, & Lücke C. The FKBP-type domain of the human aryl hydrocarbon receptor-interacting protein reveals an unusual Hsp90 interaction. *Biochemistry* 2013 **52** 2097–2107. (doi:10.1021/bi301649m)
92. Morgan RMLL, Hernández-Ramírez LC, Trivellin G, Zhou L, Roe SM, Korbonits M, & Prodromou C. Structure of the TPR Domain of AIP: Lack of Client Protein Interaction with the C-Terminal  $\alpha$ -7 Helix of the TPR Domain of AIP Is Sufficient for Pituitary Adenoma Predisposition. *PLoS ONE* 2012 **7** e53339. (doi:10.1371/journal.pone.0053339)
93. Goebel M & Yanagida M. The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends in biochemical sciences* 1991 **16** 173–177. (doi:10.1016/0968-0004(91)90070-c)
94. Cox MB & Miller CA. Cooperation of heat shock protein 90 and p23 in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Cell Stress & Chaperones* 2004 **9** 4–20. (doi:10.1379/460.1)
95. Bolger GB, Peden AH, Steele MR, MacKenzie C, McEwan DG, Wallace DA, Huston E, Baillie GS, & Houslay MD. Attenuation of the Activity of the cAMP-specific Phosphodiesterase PDE4A5 by Interaction with the Immunophilin XAP2. *Journal*

## 6. Referências Bibliográficas

- of Biological Chemistry* 2003 **278** 33351–33363. (doi:10.1074/jbc.M303269200)
96. Daly AF, Jaffrain-Rea MLL, Ciccarelli A, Valdes-Socin H, Rohmer V, Tamburrano G, Borson-Chazot C, Estour B, Ciccarelli E, Brue T, Ferolla P, Emy P, Colao A, Menis E De, Lecomte P, Penfornis F, Delemer B, Bertherat J, Wémeau JL, Herder W De, Archambeaud F, Stevenaert A, Calender A, Murat A, Cavagnini F, & Beckers A. Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006 **91** 3316–3323. (doi:10.1210/jc.2005-2671)
97. Daly AF & Beckers A. Familial Isolated Pituitary Adenomas (FIPA) and Mutations in the Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein (AIP) Gene. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2015 **44** 19–25. (doi:10.1016/j.ecl.2014.10.002)
98. Pepe S, Korbonits M, & Iacovazzo D. Germline and mosaic mutations causing pituitary tumours: genetic and molecular aspects. *Journal of Endocrinology* 2019 **240** R21–R45. (doi:10.1530/JOE-18-0446)
99. Dénes J & Korbonits M. The clinical aspects of pituitary tumour genetics. *Endocrine* 2021 **71** 663–674. (doi:10.1007/s12020-021-02633-0)
100. Iacovazzo D, Hernández-Ramírez LC, & Korbonits M. Sporadic pituitary adenomas: the role of germline mutations and recommendations for genetic screening. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism* 2017 **12** 143–153. (doi:10.1080/17446651.2017.1306439)
101. Tichomirowa MA, Barlier A, Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ronchi C, Yaneva M, Urban JD, Petrossians P, Elenkova A, Tabarin A, Desailoud R, Maiter D, Schürmeyer T, Cozzi R, Theodoropoulou M, Sievers C, Bernabeu I, Naves LA, Chabre O, Fajardo Montañana C, Hana V, Halaby G, Delemer B, Labarta Aizpún JI, Sonnet E, Ferrandez Longás Á, Hagelstein MT, Caron P, Stalla GK, ... Beckers A. High prevalence of AIP gene mutations following focused screening in young patients with sporadic pituitary macroadenomas. *European Journal of Endocrinology* 2011 **165** 509–515. (doi:10.1530/EJE-11-0304)
102. Martínez de LaPiscina I, Portillo Najera N, Rica I, Gaztambide S, Webb SM, Santos A, Moure MD, Paja Fano M, Hernandez MI, Chueca-Guindelain MJ, Hernández-Ramírez LC, Soto A, Valdés N, Castaño L, LaPiscina IM de, Najera NP, Rica I, Gaztambide S, Webb SM, Santos A, Moure MD, Fano MP, Hernandez MI, Chueca-

- Guindelain MJ, Hernández-Ramírez LC, Soto A, Valdés N, & Castaño L. Clinical and genetic characteristics in patients under 30 years with sporadic pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology* 2021 **185** 485–496. (doi:10.1530/EJE-21-0075)
103. Roussel-Gervais A, Couture C, Langlais D, Takayasu S, Balsalobre A, Rueda BR, Zukerberg LR, Figarella-Branger D, Brue T, & Drouin J. The Cables1 Gene in Glucocorticoid Regulation of Pituitary Corticotrope Growth and Cushing Disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2016 **101** 513–522. (doi:10.1210/jc.2015-3324)
104. Yamochi T, Semba K, Tsuji K, Mizumoto K, Sato H, Matsuura Y, Nishimoto I, & Matsuoka M. ik3-1/Cables is a substrate for cyclin-dependent kinase 3 (cdk 3). *European journal of biochemistry* 2001 **268** 6076–6082. (doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02555.x)
105. Matsuoka M, Matsuura Y, Semba K, & Nishimoto I. Molecular cloning of a cyclin-like protein associated with cyclin-dependent kinase 3 (cdk 3) in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 2000 **273** 442–447. (doi:10.1006/bbrc.2000.2965)
106. Mizuno S, Tra DTH, Mizobuchi A, Iseki H, Mizuno-Iijima S, Kim JD, Ishida J, Matsuda Y, Kunita S, Fukamizu A, Sugiyama F, & Yagami K ichi. Truncated Cables1 causes agenesis of the corpus callosum in mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2014 **94** 321–330. (doi:10.1038/labinvest.2013.146)
107. Groeneweg JW, White YAR, Kokel D, Peterson RT, Zukerberg LR, Berin I, Rueda BR, & Wood AW. cables1 is required for embryonic neural development: molecular, cellular, and behavioral evidence from the zebrafish. *Molecular reproduction and development* 2011 **78** 22–32. (doi:10.1002/mrd.21263)
108. Zukerberg LR, Patrick GN, Nikolic M, Humbert S, Wu CL, Lanier LM, Gertler FB, Vidal M, Etten RA Van, & Tsai LH. Cables Links Cdk5 and c-Abl and Facilitates Cdk5 Tyrosine Phosphorylation, Kinase Upregulation, and Neurite Outgrowth. *Neuron* 2000 **26** 633–646. (doi:10.1016/S0896-6273(00)81200-3)
109. Wang N, Guo L, Rueda BR, & Tilly JL. Cables1 protects p63 from proteasomal degradation to ensure deletion of cells after genotoxic stress. *EMBO reports* 2010 **11** 633–639. (doi:10.1038/embor.2010.82)

## 6. Referências Bibliográficas

110. Shi Z, Li Z, Li ZJ, Cheng K, Du Y, Fu H, & Khuri FR. Cables1 controls p21/Cip1 protein stability by antagonizing proteasome subunit  $\alpha$  type 3. *Oncogene* 2015 **34** 2538–2545. (doi:10.1038/onc.2014.171)
111. Tsuji K, Mizumoto K, Yamochi T, Nishimoto I, & Matsuoka M. Differential effect of ik3-1/cables on p53- and p73-induced cell death. *The Journal of biological chemistry* 2002 **277** 2951–2957. (doi:10.1074/jbc.M108535200)
112. Astuto LM, Bork JM, Weston MD, Askew JW, Fields RR, Orten DJ, Ohliger SJ, Riazuddin S, Morell RJ, Khan S, Riazuddin S, Kremer H, Hauwe P van, Moller CG, Cremers CWRJRJ, Ayuso C, Heckenlively JR, Rohrschneider K, Spandau U, Greenberg J, Ramesar R, Reardon W, Bitoun P, Millan J, Legge R, Friedman TB, & Kimberling WJ. CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: A profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *American Journal of Human Genetics* 2002 **71** 262–275. (doi:10.1086/341558)
113. Brouwer APM De, Pennings RJE, Roeters M, Hauwe P Van, Astuto LM, Hoefsloot LH, Huygen PLM, Helm B Van Den, Deutman AF, Bork JM, Kimberling WJ, Cremers FPM, Cremers CWRJ, & Kremer H. Mutations in the calcium-binding motifs of CDH23 and the 35delG mutation in GJB2 cause hearing loss in one family. *Human Genetics* 2003 **112** 156–163. (doi:10.1007/s00439-002-0833-0)
114. Chang M, Yang C, Bao X, & Wang R. Genetic and Epigenetic Causes of Pituitary Adenomas. *Frontiers in Endocrinology* 2021 **11** 1–17. (doi:10.3389/fendo.2020.596554)
115. Ye Z, Zhang Y, Li Z, Wang YYY, Mao Y, Shen M, Zhang Q, Li S, Zhou L, Shou X, Chen J, Song Z, Ma Z, Zhang Z, Li Y, Ye H, Huang C, Wang T, He W, Zhang Y, Xie R, Qiao N, Qiu H, Huang S, Wang M, Shen J, Wen Z, Li W, Liu K, ... Zhao Y. Common variants at 10p12.31, 10q21.1 and 13q12.13 are associated with sporadic pituitary adenoma. *Nature Genetics* 2015 **47** 793–797. (doi:10.1038/ng.3322)
116. Thakker R V. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014 **386** 2–15. (doi:10.1016/j.mce.2013.08.002)
117. Slingerland J & Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *Journal of cellular physiology* 2000 **183** 10–17. (doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1<10::AID-JCP2>3.0.CO;2-I)

118. Møller MB. P27 in cell cycle control and cancer. *Leukemia & lymphoma* 2000 **39** 19–27. (doi:10.3109/10428190009053535)
119. Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Höfler H, Fend F, Graw J, & Atkinson MJ. Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006 **103** 15558–15563. (doi:10.1073/pnas.0603877103)
120. Bahubeshi A, Tischkowitz M, & Foulkes WD. miRNA processing and human cancer: DICER1 cuts the mustard. *Science translational medicine* 2011 **3** 111ps46. (doi:10.1126/scitranslmed.3002493)
121. Slade I, Bacchelli C, Davies H, Murray A, Abbaszadeh F, Hanks S, Barfoot R, Burke A, Chisholm J, Hewitt M, Jenkinson H, King D, Morland B, Pizer B, Prescott K, Saggari A, Side L, Traunecker H, Vaidya S, Ward P, Futreal PA, Vujanic G, Nicholson AG, Sebire N, Turnbull C, Priest JR, Pritchard-Jones K, Houlston R, Stiller C, ... Rahman N. DICER1 syndrome: clarifying the diagnosis, clinical features and management implications of a pleiotropic tumour predisposition syndrome. *Journal of medical genetics* 2011 **48** 273–278. (doi:10.1136/jmg.2010.083790)
122. Rio Frio T, Bahubeshi A, Kanellopoulou C, Hamel N, Niedziela M, Sabbaghian N, Pouchet C, Gilbert L, O'Brien PK, Serfas K, Broderick P, Houlston RS, Lesueur F, Bonora E, Muljo S, Schimke RN, Bouron-Dal Soglio D, Arseneau J, Schultz KA, Priest JR, Nguyen VH, Harach HR, Livingston DM, Foulkes WD, & Tischkowitz M. DICER1 mutations in familial multinodular goiter with and without ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. *JAMA* 2011 **305** 68–77. (doi:10.1001/jama.2010.1910)
123. Scheithauer BW, Kovacs K, Horvath E, Kim DS, Osamura RY, Ketterling RP, Lloyd R V, & Kim OL. Pituitary blastoma. *Acta neuropathologica* 2008 **116** 657–666. (doi:10.1007/s00401-008-0388-9)
124. Heravi-Moussavi A, Anglesio MS, Cheng SWG, Senz J, Yang W, Prentice L, Fejes AP, Chow C, Tone A, Kalloger SE, Hamel N, Roth A, Ha G, Wan ANC, Maines-Bandiera S, Salamanca C, Pasini B, Clarke BA, Lee AF, Lee CH, Zhao C, Young RH, Aparicio SA, Sorensen PHB, Woo MMM, Boyd N, Jones SJM, Hirst M, Marra MA, ... Huntsman DG. Recurrent somatic DICER1 mutations in nonepithelial ovarian cancers. *The New England journal of medicine* 2012 **366** 234–242.

## 6. Referências Bibliográficas

- (doi:10.1056/NEJMoa1102903)
125. Wang Y, Chen J, Yang W, Mo F, Senz J, Yap D, Anglesio MS, Gilks B, Morin GB, & Huntsman DG. The oncogenic roles of DICER1 RNase IIIb domain mutations in ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 2015 **17** 650–660. (doi:10.1016/j.neo.2015.08.003)
126. Ricarte-Filho JC, Casado-Medrano V, Reichenberger E, Spangler Z, Scheerer M, Isaza A, Baran J, Patel T, MacFarland SP, Brodeur GM, Stewart DR, Baloch Z, Bauer AJ, Wasserman JD, & Franco AT. DICER1 RNase IIIb domain mutations trigger widespread miRNA dysregulation and MAPK activation in pediatric thyroid cancer. *Frontiers in endocrinology* 2023 **14** 1083382. (doi:10.3389/fendo.2023.1083382)
127. Hayward BE, Barlier A, Korbonits M, Grossman AB, Jacquet P, Enjalbert A, & Bonthron DT. Imprinting of the G(s)alpha gene GNAS1 in the pathogenesis of acromegaly. *The Journal of clinical investigation* 2001 **107** R31-6. (doi:10.1172/JCI11887)
128. Taboada GF, Neto LV, Luque RM, Córdoba-Chacón J, Oliveira Machado E De, Carvalho DP De, Kineman RD, & Gadelha MR. Impact of gsp oncogene on the mRNA content for somatostatin and dopamine receptors in human somatotropinomas. *Neuroendocrinology* 2011 **93** 40–47. (doi:10.1159/000322040)
129. Shen AJJ, Jia, King J, Scott H, Colman P, Yates CJ, Jia, King J, Scott H, Colman P, & Yates CJ. Insights into pituitary tumorigenesis: from Sanger sequencing to next-generation sequencing and beyond. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism* 2019 **14** 399–418. (doi:10.1080/17446651.2019.1689120)
130. Weinstein LS, Shenker A, Gejman P V, Merino MJ, Friedman E, & Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *The New England journal of medicine* 1991 **325** 1688–1695. (doi:10.1056/NEJM199112123252403)
131. Trivellin G, Daly AF, Faucz FR, Yuan B, Rostomyan L, Larco DO, Scherthaner-Reiter MH, Szarek E, Leal LF, Caberg JH, Castermans E, Villa C, Dimopoulos A, Chittiboina P, Xekouki P, Shah N, Metzger D, Lysy PA, Ferrante E, Strebkova N, Mazerkina N, Zatelli MC, Lodish M, Horvath A, Alexandre RB de, Manning AD, Levy I, Keil MF, Sierra M de la L, ... Stratakis CA. Gigantism and Acromegaly Due

- to Xq26 Microduplications and GPR101 Mutation. *New England Journal of Medicine* 2014 **371** 2363–2374. (doi:10.1056/NEJMoa1408028)
132. Iacovazzo D & Korbonits M. Gigantism: X-linked acrogigantism and GPR101 mutations. *Growth Hormone & IGF Research* 2016 **30–31** 64–69. (doi:10.1016/j.ghir.2016.09.007)
133. Trivellin G, Bjelobaba I, Daly AF, Larco DO, Palmeira L, Faucz FR, Thiry A, Leal LF, Rostomyan L, Quezado M, Schernthaner-Reiter MH, Janjic MM, Villa C, Wu TJ, Stojilkovic SS, Beckers A, Feldman B, & Stratakis CA. Characterization of GPR101 transcript structure and expression patterns. *Journal of molecular endocrinology* 2016 **57** 97–111. (doi:10.1530/JME-16-0045)
134. Moran A, Asa SL, Kovacs K, Horvath E, Singer W, Sagman U, Reubi JC, Wilson CB, Larson R, & Pescovitz OH. Gigantism due to pituitary mammosomatotroph hyperplasia. *The New England journal of medicine* 1990 **323** 322–327. (doi:10.1056/NEJM199008023230507)
135. Daly AF, Lysy PA, Desfilles C, Rostomyan L, Mohamed A, Caberg JH, Raverot V, Castermans E, Marbaix E, Maiter D, Brunelle C, Trivellin G, Stratakis CA, Bours V, Raftopoulos C, Beauvoys V, Barlier A, & Beckers A. GHRH excess and blockade in X-LAG syndrome. *Endocrine-related cancer* 2016 **23** 161–170. (doi:10.1530/ERC-15-0478)
136. Trivellin G, Hernández-Ramírez LC, Swan J, & Stratakis CA. An orphan G-protein-coupled receptor causes human gigantism and/or acromegaly: Molecular biology and clinical correlations. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 2018 **32** 125–140. (doi:10.1016/j.beem.2018.02.004)
137. Loughrey PB, Roncaroli F, Healy E, Weir P, Basetti M, Casey RT, Hunter SJ, & Korbonits M. Succinate dehydrogenase and MYC-associated factor X mutations in pituitary neuroendocrine tumours. *Endocrine-Related Cancer* 2022 **29** R158. (doi:10.1530/ERC-22-0157)
138. Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F, Landa I, Leandro-García LJ, Letón R, Honrado E, Ramos-Medina R, Caronia D, Pita G, Gómez-Graña A, Cubas AA de, Inglada-Pérez L, Maliszewska A, Taschin E, Bobisse S, Pica G, Loli P, Hernández-Lavado R, Díaz JA, Gómez-Morales M, González-Neira A, Roncador G, Rodríguez-Antona C, Benítez J, Mannelli M, Opocher G, Robledo M, & Cascón A. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary

## 6. Referências Bibliográficas

- pheochromocytoma. *Nature genetics* 2011 **43** 663–667. (doi:10.1038/ng.861)
139. Romero OA, Torres-Diz M, Pros E, Savola S, Gomez A, Moran S, Saez C, Iwakawa R, Villanueva A, Montuenga LM, Kohno T, Yokota J, & Sanchez-Cespedes M. MAX inactivation in small cell lung cancer disrupts MYC-SWI/SNF programs and is synthetic lethal with BRG1. *Cancer discovery* 2014 **4** 292–303. (doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0799)
140. Daly AF, Castermans E, Oudijk L, Guitelman MA, Beckers P, Potorac I, Neggers SJCMCMM, Sacre N, Lely AJ van der, Bours V, Herder WW de, Beckers A, Lely AJ van der, Bours V, Herder WW d., & Beckers A. Pheochromocytomas and pituitary adenomas in three patients with MAX exon deletions. *Endocrine-Related Cancer* 2018 **25** L37–L42. (doi:10.1530/ERC-18-0065)
141. Kobza AO, Dizon S, & Arnaout A. Case Report of Bilateral Pheochromocytomas due to a Novel Max Mutation in a Patient Known to have a Pituitary Prolactinoma. *AACE Clinical Case Reports* 2018 **4** e453–e456. (doi:10.4158/ACCR-2018-0146)
142. Lemmens I, Ven WJ Van de, Kas K, Zhang CX, Giraud S, Wautot V, Buisson N, Witte K De, Salandre J, Lenoir G, Pugeat M, Calender A, Parente F, Quincey D, Gaudray P, Wit MJ De, Lips CJ, Höppener JW, Khodaei S, Grant AL, Weber G, Kytölä S, Teh BT, Farnebo F, & Thakker R V. Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. *Human Molecular Genetics* 1997 **6** 1177–1183. (doi:10.1093/hmg/6.7.1177)
143. Lemos MC & Thakker R V. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Human Mutation* 2008 **29** 22–32. (doi:10.1002/humu.20605)
144. Schussheim DH, Skarulis MC, Agarwal SK, Simonds WF, Burns AL, Spiegel AM, & Marx SJ. Multiple endocrine neoplasia type 1: New clinical and basic findings. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2001 **12** 173–178. (doi:10.1016/S1043-2760(00)00372-6)
145. Guru SC, Goldsmith PK, Lee Burns A, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS, & Chandrasekharappa SC. Menin, the product of the MEN1 gene, is a nuclear protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998 **95** 1630–1634. (doi:10.1073/pnas.95.4.1630)
146. Agarwal SK, Guru SC, Heppner C, Erdos MR, Collins RM, Park SY, Saggari S,

- Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Marx SJ, & Burns AL. Menin Interacts with the AP1 Transcription Factor JunD and Represses JunD-Activated Transcription. *Cell* 1999 **96** 143–152.
147. Gobl AE, Berg M, Lopez-Egido JR, Oberg K, Skogseid B, & Westin G. Menin represses JunD-activated transcription by a histone deacetylase-dependent mechanism. *Biochimica et biophysica acta* 1999 **1447** 51–56. (doi:10.1016/S0167-4781(99)00132-3)
148. Hughes CM, Rozenblatt-Rosen O, Milne TA, Copeland TD, Levine SS, Lee JC, Hayes DN, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Biondi CA, Kay GF, Hayward NK, Hess JL, & Meyerson M. Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the *hoxc8* locus. *Molecular cell* 2004 **13** 587–597. (doi:10.1016/S1097-2765(04)00081-4)
149. Heldin CH, Miyazono K, & Dijke P. TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997 **390** 465–471. (doi:10.1038/37284)
150. Kaji H, Canaff L, Lebrun JJ, Goltzman D, & Hendy GN. Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001 **98** 3837–3842. (doi:10.1073/pnas.061358098)
151. Heppner C, Bilimoria KY, Agarwal SK, Kester M, Whitty LJ, Guru SC, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Marx SJ, & Burns AL. The tumor suppressor protein menin interacts with NF- $\kappa$ B proteins and inhibits NF- $\kappa$ B-mediated transactivation. *Oncogene* 2001 **20** 4917–4925. (doi:10.1038/sj.onc.1204529)
152. Marsh D & Zori T. Genetic insights into familial cancers – update and recent discoveries. *Cancer Letters* 2002 **181** 125–164.
153. Lemmens IH, Forsberg L, Pannett AAJ, Meyen E, Piehl F, Turner JJO, Ven WJM Van de, Thakker R V., Larsson C, & Kas K. Menin Interacts Directly with the Homeobox-Containing Protein Pcm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001 **286** 426–431. (doi:10.1006/bbrc.2001.5405)
154. Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y, Schnepf RW, Krankel C, LiVolsi VA, Gibbs D, Hua X, Roeder RG, Meyerson M, & Hess JL.

## 6. Referências Bibliográficas

- Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005 **102** 749–754. (doi:10.1073/pnas.0408836102)
155. Wermer P. Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands. *The American Journal of Medicine* 1954 **16** 363–371. (doi:10.1016/0002-9343(54)90353-8)
156. Shaid M & Korbonits M. Genetics of pituitary adenomas. *Neurology India* 2017 **65** 577–587. (doi:10.4103/neuroindia.NI)
157. Caimari F & Korbonits M. Novel genetic causes of pituitary adenomas. *Clinical Cancer Research* 2016 **22** 5030–5042. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0452)
158. Thakker R V. MULTIPLE ENDOCRINE NEOPLASIA TYPE 1. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2000 **29** 541–567. (doi:10.1016/S0889-8529(05)70150-X)
159. Guimarães J. Neoplasias endócrinas múltiplas. *Acta Medica Portuguesa* 2007 **20** 65–72.
160. Tsukada T, Nagamura Y, & Ohkura N. MEN1 gene and its mutations: Basic and clinical implications. *Cancer Science* 2009 **100** 209–215. (doi:10.1111/j.1349-7006.2008.01034.x)
161. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993 **90** 10914–10921. (doi:10.1073/pnas.90.23.10914)
162. Brandi M, Gagel R, & Angeli A. Consensus – Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001 **86** 5658–5671.
163. Shapiro SE, Cote GC, Lee JE, Gagel RF, & Evans DB. The role of genetics in the surgical management of familial endocrinopathy syndromes. *Journal of the American College of Surgeons* 2003 **197** 818–831. (doi:10.1016/j.jamcollsurg.2003.07.001)
164. Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *The Journal of biological chemistry* 2006 **281** 30305–30309. (doi:10.1074/jbc.R600022200)
165. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell research* 2008 **18** 85–98. (doi:10.1038/cr.2007.115)

166. Liu Q, Thompson BA, Ward RL, Hesson LB, & Sloane MA. Understanding the Pathogenicity of Noncoding Mismatch Repair Gene Promoter Variants in Lynch Syndrome. *Human mutation* 2016 **37** 417–426. (doi:10.1002/humu.22971)
167. Freitas IN de, Campos FGCM de, Alves VAF, Cavalcante JM, Carraro D, Coudry R de A, Diniz MA, Nahas SC, & Ribeiro UJ. Proficiency of DNA repair genes and microsatellite instability in operated colorectal cancer patients with clinical suspicion of lynch syndrome. *Journal of gastrointestinal oncology* 2015 **6** 628–637. (doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2015.089)
168. Biller LH, Creedon SA, Klehm M, & Yurgelun MB. Lynch Syndrome-Associated Cancers Beyond Colorectal Cancer. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America* 2022 **32** 75–93. (doi:10.1016/j.giec.2021.08.002)
169. Teuber J, Reinhardt A, Reuss D, Hähnel S, Unterberg A, & Beynon C. Aggressive pituitary adenoma in the context of Lynch syndrome: a case report and literature review on this rare coincidence. *British journal of neurosurgery* 2021 1–6. (doi:10.1080/02688697.2021.1967881)
170. Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, & Maria BL. Neurofibromatosis type 1 revisited. *Pediatrics* 2009 **123** 124–133. (doi:10.1542/peds.2007-3204)
171. Dasgupta B, Dugan LL, & Gutmann DH. The neurofibromatosis 1 gene product neurofibromin regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-mediated signaling in astrocytes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 2003 **23** 8949–8954. (doi:10.1523/JNEUROSCI.23-26-08949.2003)
172. Bizzarri C & Bottaro G. Endocrine implications of neurofibromatosis 1 in childhood. *Hormone research in paediatrics* 2015 **83** 232–241. (doi:10.1159/000369802)
173. Hannah-Shmouni F & Stratakis CA. Growth hormone excess in neurofibromatosis 1. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics* 2019. pp 1254–1255. . (doi:10.1038/s41436-018-0312-1)
174. Liu Q, Tong D, Liu G, Yi Y, Zhang D, Zhang J, Zhang Y, Huang Z, Li Y, Chen R, Guan Y, Yi X, & Jiang J. Carney complex with PRKAR1A gene mutation: A case report and literature review. *Medicine (United States)* 2017 **96** 1–4.

## 6. Referências Bibliográficas

- (doi:10.1097/MD.0000000000008999)
175. Espiard S & Bertherat J. Carney complex. *Frontiers of Hormone Research* 2013 **41** 50–62. (doi:10.1159/000345669)
176. Rothenbuhler A & Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of Carney complex. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **24** 389–399. (doi:10.1016/j.beem.2010.03.003)
177. Correa R, Salpea P, & Stratakis CA. Carney complex: An update. *European Journal of Endocrinology* 2015 **173** M85–M97. (doi:10.1530/EJE-15-0209)
178. Hannah-Shmouni F & Stratakis CA. An update on the genetics of benign pituitary adenomas in children and adolescents. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* 2018 **1** 19–24. (doi:10.1016/j.coemr.2018.04.002)
179. Rosenberg D, Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Bertagna X, & Bertherat J. Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002 **968** 65–74. (doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04327.x)
180. CARNEY JA, GORDON H, CARPENTER PC, SHENOY BV, & W. GO VL. The Complex of Myxomas, Spotty Pigmentation, and Endocrine Overactivity. *Medicine* 1985 **64** 270–283. (doi:10.1097/00005792-198507000-00007)
181. Boikos SA & Stratakis CA. Carney complex: The first 20 years. *Current Opinion in Oncology* 2007 **19** 24–29. (doi:10.1097/CCO.0b013e32801195eb)
182. Niccoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Franc S, Chabrier G, Baldet L, Maes B, Savagner F, Giraud S, Bezieau S, Kottler ML, Morange S, & Conte-Devolx B. Familial medullary thyroid carcinoma with noncysteine RET mutations: Phenotype-genotype relationship in a large series of patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001 **86** 3746–3753. (doi:10.1210/jcem.86.8.7767)
183. Mulligan LM. RET revisited: Expanding the oncogenic portfolio. *Nature Reviews Cancer* 2014 **14** 173–186. (doi:10.1038/nrc3680)
184. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, & Papi L. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993 **363** 458–460.

(doi:10.1038/363458a0)

185. Gagel RF, Tashjian AH, Cummings T, Papathanasopoulos N, Kaplan MM, DeLellis RA, Wolfe HJ, & Reichlin S. The Clinical Outcome of Prospective Screening for Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A. *New England Journal of Medicine* 1988 **318** 478–484. (doi:10.1056/NEJM198802253180804)
186. Carney JA, Go VLW, Sizemore GW, & Hayles AB. Alimentary-Tract Ganglioneuromatosis. *New England Journal of Medicine* 1976 **295** 1287–1291. (doi:10.1056/NEJM197612022952304)
187. Williams ED & Pollock DJ. Multiple mucosal neuromata with endocrine tumours: A syndrome allied to von Recklinghausen's disease. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1966 **91** 71–80. (doi:10.1002/path.1700910109)
188. Bardella C, El-Bahrawy M, Frizzell N, Adam J, Ternette N, Hatipoglu E, Howarth K, O'Flaherty L, Roberts I, Turner G, Taylor J, Giaslakitotis K, Macaulay VM, Harris AL, Chandra A, Lehtonen HJ, Launonen V, Aaltonen LA, Pugh CW, Mihai R, Trudgian D, Kessler B, Baynes JW, Ratcliffe PJ, Tomlinson IP, & Pollard PJ. Aberrant succination of proteins in fumarate hydratase-deficient mice and HLRCC patients is a robust biomarker of mutation status. *The Journal of pathology* 2011 **225** 4–11. (doi:10.1002/path.2932)
189. Hägerhäll C. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochimica et biophysica acta* 1997 **1320** 107–141. (doi:10.1016/S0005-2728(97)00019-4)
190. Oudijk L, Gaal J, & Krijger RR de. The Role of Immunohistochemistry and Molecular Analysis of Succinate Dehydrogenase in the Diagnosis of Endocrine and Non-Endocrine Tumors and Related Syndromes. *Endocrine pathology* 2019 **30** 64–73. (doi:10.1007/s12022-018-9555-2)
191. Zhao T, Mu X, & You Q. Succinate: An initiator in tumorigenesis and progression. *Oncotarget* 2017 **8** 53819–53828. (doi:10.18632/oncotarget.17734)
192. Ricketts CJ, Shuch B, Vocke CD, Metwalli AR, Bratslavsky G, Middelton L, Yang Y, Wei MHH, Pautler SE, Peterson J, Stolle CA, Zbar B, Merino MJ, Schmidt LS, Pinto PA, Srinivasan R, Pacak K, & Linehan WM. Succinate dehydrogenase kidney cancer: An aggressive example of the warburg effect in cancer. *Journal of Urology* 2012 **188** 2063–2071. (doi:10.1016/j.juro.2012.08.030)

## 6. Referências Bibliográficas

193. Xekouki P, Pacak K, Almeida M, Wassif CA, Rustin P, Nesterova M, la Luz Sierra M de, Matro J, Ball E, Azevedo M, Horvath A, Lyssikatos C, Quezado M, Patronas N, Ferrando B, Pasini B, Lytras A, Tolis G, & Stratakis CA. Succinate dehydrogenase (SDH) D subunit (SDHD) inactivation in a growth-hormone-producing pituitary tumor: a new association for SDH? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2012 **97** E357-66. (doi:10.1210/jc.2011-1179)
194. Chen L, Liu T, Zhang S, Zhou J, Wang Y, & Di W. Succinate dehydrogenase subunit B inhibits the AMPK-HIF-1 $\alpha$  pathway in human ovarian cancer in vitro. *Journal of ovarian research* 2014 **7** 115. (doi:10.1186/s13048-014-0115-1)
195. Bardella C, Pollard PJ, & Tomlinson I. SDH mutations in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 2011 **1807** 1432–1443. (doi:10.1016/j.bbabi.2011.07.003)
196. Zhu G, Pan C, Bei JX, Li B, Liang C, Xu Y, & Fu X. Mutant p53 in Cancer Progression and Targeted Therapies. *Frontiers in oncology* 2020 **10** 595187. (doi:10.3389/fonc.2020.595187)
197. Xie Y, Zhao WH, Hua Y, Sun Q, & Wu PH. A rhabdomyosarcoma patient from a Li-Fraumeni syndrome family: a case report and literature review. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics* 2017 **19** 1263–1266. (doi:10.7499/j.issn.1008-8830.2017.12.008)
198. Hettmer S, Archer NM, Somers GR, Novokmet A, Wagers AJ, Diller L, Rodriguez-Galindo C, Teot LA, & Malkin D. Anaplastic rhabdomyosarcoma in TP53 germline mutation carriers. *Cancer* 2014 **120** 1068–1075. (doi:10.1002/cncr.28507)
199. Friedman JG & Papagiannis IG. Papillary Thyroid Carcinoma, Cushing Disease, and Adrenocortical Carcinoma in a Patient with Li-Fraumeni Syndrome. *AACE clinical case reports* 2024 **10** 127–131. (doi:10.1016/j.aace.2024.03.007)
200. Reyes-Turcu FE, Ventii KH, & Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annual review of biochemistry* 2009 **78** 363–397. (doi:10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526)
201. Reincke M, Sbiera S, Hayakawa A, Theodoropoulou M, Osswald A, Beuschlein F, Meitinger T, Mizuno-Yamasaki E, Kawaguchi K, Saeki Y, Tanaka K, Wieland T, Graf E, Saeger W, Ronchi CL, Allolio B, Buchfelder M, Strom TM, Fassnacht M, & Komada M. Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. *Nature Genetics* 2015 **47** 31–38. (doi:10.1038/ng.3166)

202. Fukuoka H, Cooper O, Ben-Shlomo A, Mamelak A, Ren SG, Bruyette D, & Melmed S. EGFR as a therapeutic target for human, canine, and mouse ACTH-secreting pituitary adenomas. *The Journal of clinical investigation* 2011 **121** 4712–4721. (doi:10.1172/JCI60417)
203. Wildemberg LE, Henriques D, Elias PCL, Lima CH de A, Musolino NR de C, Camacho AHS, Faria O, Nazato D, Abucham J, Vilar L, Mota JI, Huayllas MKP, Chimelli L, Castro M de, Kasuki L, & Gadelha MR. gsp Mutation Is Not a Molecular Biomarker of Long-Term Response to First-Generation Somatostatin Receptor Ligands in Acromegaly. *Cancers* 2021 **13** . (doi:10.3390/cancers13194857)
204. Losa M, Mortini P, Pagnano A, Detomas M, Cassarino MF, & Pecori Giraldi F. Clinical characteristics and surgical outcome in USP8-mutated human adrenocorticotrophic hormone-secreting pituitary adenomas. *Endocrine* 2019 **63** 240–246. (doi:10.1007/s12020-018-1776-0)
205. Ballmann C, Thiel A, Korah HE, Reis AC, Saeger W, Stepanow S, Köhrer K, Reifenberger G, Knobbe-Thomsen CB, Knappe UJ, & Scholl UI. USP8 Mutations in Pituitary Cushing Adenomas-Targeted Analysis by Next-Generation Sequencing. *Journal of the Endocrine Society* 2018 **2** 266–278. (doi:10.1210/js.2017-00364)
206. Ma ZY, Song ZJ, Chen JH, Wang YF, Li SQ, Zhou LF, Mao Y, Li YM, Hu RG, Zhang ZY, Ye HY, Shen M, Shou XF, Li ZQ, Peng H, Wang QZ, Zhou DZ, Qin XL, Ji J, Zheng J, Chen H, Wang Y, Geng DY, Tang WJ, Fu CW, Shi ZF, Zhang YC, Ye Z, He WQ, ... Zhao Y. Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease. *Cell research* 2015 **25** 306–317. (doi:10.1038/cr.2015.20)
207. Gossage L, Eisen T, & Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nature Reviews Cancer* 2015 **15** 55–64. (doi:10.1038/nrc3844)
208. Khacho M & Lee S. Subcellular dynamics of the VHL tumor suppressor: On the move for HIF degradation. *Future Oncology* 2009 **5** 85–95. (doi:10.2217/14796694.5.1.85)
209. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, & Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995 **92** 5510–5514. (doi:10.1073/pnas.92.12.5510)

## 6. Referências Bibliográficas

210. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews. Cancer* 2002 **2** 38–47. (doi:10.1038/nrc704)
211. Gläsker S, Vergauwen E, Koch CA, Kutikov A, & Vortmeyer AO. Von Hippel-Lindau Disease: Current Challenges and Future Prospects. *OncoTargets and therapy* 2020 **13** 5669–5690. (doi:10.2147/OTT.S190753)
212. Leonardi E, Martella M, Tosatto SCEE, & Murgia A. Identification and In Silico Analysis of Novel von Hippel-Lindau (VHL) Gene Variants from a Large Population. *Annals of Human Genetics* 2011 **75** 483–496. (doi:10.1111/j.1469-1809.2011.00647.x)
213. Bliss KT, Chu M, Jones-Weinert CM, & Gregorio CC. Investigating lasp-2 in cell adhesion: New binding partners and roles in motility. *Molecular Biology of the Cell* 2013 **24** 995–1006. (doi:10.1091/mbc.E12-10-0723)
214. Hale JS, Li M, & Lathia JD. The malignant social network: Cell-cell adhesion and communication in cancer stem cells. *Cell Adhesion and Migration* 2012 **6** 346–355. (doi:10.4161/cam.21294)
215. Haruki S, Imoto I, Kozaki K ichi, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, & Inazawa J. Frequent silencing of protocadherin 17 , a candidate tumour suppressor for esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2010 **31** 1027–1036. (doi:10.1093/carcin/bgq053)
216. Tayrac M de, Etcheverry A, Aubry M, Saïkali S, Hamlat A, Quillien V, Treut A Le, Galibert MD, & Mosser J. Integrative genome-wide analysis reveals a robust genomic glioblastoma signature associated with copy number driving changes in gene expression. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2009 **48** 55–68. (doi:10.1002/gcc.20618)
217. Ahmed ZM. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Human Molecular Genetics* 2003 **12** 3215–3223. (doi:10.1093/hmg/ddg358)
218. Huertas-Vazquez A, Plaisier CL, Geng R, Haas BE, Lee J, Greevenbroek MM, Kallen C van der, Bruin TWA de, Taskinen MR, Alagramam KN, & Pajukanta P. A nonsynonymous SNP within PCDH15 is associated with lipid traits in familial combined hyperlipidemia. *Human Genetics* 2010 **127** 83–89. (doi:10.1007/s00439-009-0749-z)

219. Ovsyannikova IG, Kennedy RB, O'Byrne M, Jacobson RM, Pankratz VS, & Poland GA. Genome-wide association study of antibody response to smallpox vaccine. *Vaccine* 2012 **30** 4182–4189. (doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.055)
220. Kapoor A, Goldberg MS, Cumberland LK, Ratnakumar K, Segura MF, Emanuel PO, Menendez S, Vardabasso C, LeRoy G, Vidal CI, Polsky D, Osman I, Garcia BA, Hernando E, & Bernstein E. The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature* 2010 **468** 1105–1109. (doi:10.1038/nature09590)
221. Firestein R, Bass AJ, Kim SY, Dunn IF, Silver SJ, Guney I, Freed E, Ligon AH, Vena N, Ogino S, Chheda MG, Tamayo P, Finn S, Shrestha Y, Boehm JS, Jain S, Bojarski E, Mermel C, Barretina J, Chan JA, Baselga J, Taberner J, Root DE, Fuchs CS, Loda M, Shivdasani RA, Meyerson M, & Hahn WC. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates  $\beta$ -catenin activity. *Nature* 2008 **455** 547–551. (doi:10.1038/nature07179)
222. Kim M, Han S, & Lim S. Roles of cyclin-dependent kinase 8 and  $\beta$ -catenin in the oncogenesis and progression of gastric adenocarcinoma. *International Journal of Oncology* 2011 **38** . (doi:10.3892/ijo.2011.948)
223. Denechaud PD, Fajas L, & Giralt A. E2F1, a Novel Regulator of Metabolism. *Frontiers in Endocrinology* 2017 **8** . (doi:10.3389/fendo.2017.00311)
224. Clevers H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 2006 **127** 469–480. (doi:10.1016/j.cell.2006.10.018)
225. Chambers TJG, Giles A, Brabant G, & Davis JRE. Wnt signalling in pituitary development and tumorigenesis. *Endocrine-Related Cancer* 2013 **20** R101–R111. (doi:10.1530/ERC-13-0005)
226. Elston MS, Gill AJ, Conaglen J V., Clarkson A, Shaw JM, Law AJJ, Cook RJ, Little NS, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, & McDonald KL. Wnt Pathway Inhibitors Are Strongly Down-Regulated in Pituitary Tumors. *Endocrinology* 2008 **149** 1235–1242. (doi:10.1210/en.2007-0542)
227. Zhou Y, Zhang X, & Klibanski A. Genetic and epigenetic mutations of tumor suppressive genes in sporadic pituitary adenoma. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014 **386** 16–33. (doi:10.1016/j.mce.2013.09.006)

## 6. Referências Bibliográficas

228. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2015 **17** 405–424. (doi:10.1038/gim.2015.30)
229. Mesman RLS, Calléja FMGR, Hendriks G, Morolli B, Misovic B, Devilee P, Asperen CJ van, Vrieling H, & Vreeswijk MPG. The functional impact of variants of uncertain significance in BRCA2. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2019 **21** 293–302. (doi:10.1038/s41436-018-0052-2)
230. Drost M, Koppejan H, & Wind N de. Inactivation of DNA mismatch repair by variants of uncertain significance in the PMS2 gene. *Human mutation* 2013 **34** 1477–1480. (doi:10.1002/humu.22426)
231. Chong JX, Yu JH, Lorentzen P, Park KM, Jamal SM, Tabor HK, Rauch A, Saenz MS, Boltshauser E, Patterson KE, Nickerson DA, & Bamshad MJ. Gene discovery for Mendelian conditions via social networking: de novo variants in KDM1A cause developmental delay and distinctive facial features. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2016 **18** 788–795. (doi:10.1038/gim.2015.161)
232. Miller SAA, Dykes DDD, & Polesky H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988 **16** 1215. (doi:10.1093/nar/16.3.1215)
233. Nasiri H, Forouzandeh M, Rasae MJ, & Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: High-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2005 **19** 229–232. (doi:10.1002/jcla.20083)
234. Mullis KB & Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in Enzymology*, pp 335–350. 1987.
235. Green MR & Sambrook J. Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols* 2019 **2019** 436–456. (doi:10.1101/pdb.top095109)

236. Cazabat L, Bouligand J, Salenave S, Bernier M, Gaillard S, Parker F, Young J, Guiochon-Mantel A, & Chanson P. Germline AIP mutations in apparently sporadic pituitary adenomas: Prevalence in a prospective single-center cohort of 443 patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012 **97** 663–670. (doi:10.1210/jc.2011-2291)
237. Sanger F, Nicklen S, & Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1977 **74** 5463–5467. (doi:10.1073/pnas.74.12.5463)
238. Garrido-Cardenas JA, Garcia-Maroto F, Alvarez-Bermejo JA, & Manzano-Agugliaro F. DNA sequencing sensors: An overview. *Sensors (Switzerland)* 2017 **17** 1–15. (doi:10.3390/s17030588)
239. Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, & Scott M. Characterizing and using cloned DNA fragments. In *Molecular Cell Biology*, 4th editio. New York: Freeman and Company, 2005.
240. Dunnen JT den, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AFF, Smith T, Antonarakis SE, & Taschner PEMM. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human Mutation* 2016 **37** 564–569. (doi:10.1002/humu.22981)
241. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999 **234** 177–186. (doi:10.1016/S0378-1119(99)00219-X)
242. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, & Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nature Reviews Genetics* 2009 **10** 241–251. (doi:10.1038/nrg2554)
243. Gorlov IP, Gorlova OY, Frazier ML, Spitz MR, & Amos CI. Evolutionary evidence of the effect of rare variants on disease etiology. *Clinical Genetics* 2011 **79** 199–206. (doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01535.x)
244. Bomba L, Walter K, & Soranzo N. The impact of rare and low-frequency genetic variants in common disease. *Genome Biology* 2017 **18** 1–17. (doi:10.1186/s13059-017-1212-4)
245. Lappalainen T, Scott AJ, Brandt M, & Hall IM. Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. *Cell* 2019 **177** 70–84.

## 6. Referências Bibliográficas

- (doi:10.1016/j.cell.2019.02.032)
246. Panoutsopoulou K, Tachmazidou I, & Zeggini E. In search of low-frequency and rare variants affecting complex traits. *Human Molecular Genetics* 2013 **22** 16–21. (doi:10.1093/hmg/ddt376)
247. Karki R, Pandya D, Elston RC, & Ferlini C. Defining ‘mutation’ and ‘polymorphism’ in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics* 2015 **8** 1–7. (doi:10.1186/s12920-015-0115-z)
248. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP, Gauthier LD, Brand H, Solomonson M, Watts NA, Rhodes D, Singer-Berk M, England EM, Seaby EG, Kosmicki JA, Walters RK, Tashman K, Farjoun Y, Banks E, Poterba T, Wang A, Seed C, Whiffin N, Chong JX, Samocha KE, ... MacArthur DG. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020 **581** 434–443. (doi:10.1038/s41586-020-2308-7)
249. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, & Massouras A. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 2019 **35** 1978–1980. (doi:10.1093/bioinformatics/bty897)
250. National Human Genome Research Institute. The Cost of Sequencing a Human Genome. <https://www.genome.gov/sequencingcosts/>.
251. Davies S. Annual Report of the Chief Medical Officer 2016, Generation Genome. *Department of Health: London* 2017 .
252. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, & DePristo MA. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* 2010 **20** 1297–1303. (doi:10.1101/gr.107524.110)
253. Li H & Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2010 **26** 589–595. (doi:10.1093/bioinformatics/btp698)
254. Coopmans EC & Korbonits M. Molecular genetic testing in the management of pituitary disease. *Clinical endocrinology* 2022 **97** 424–435. (doi:10.1111/cen.14706)

255. Pejaver V, Byrne AB, Feng BJ, Pagel KA, Mooney SD, Karchin R, O'Donnell-Luria A, Harrison SM, Tavtigian S V, Greenblatt MS, Biesecker LG, Radivojac P, & Brenner SE. Calibration of computational tools for missense variant pathogenicity classification and ClinGen recommendations for PP3/BP4 criteria. *American journal of human genetics* 2022 **109** 2163–2177. (doi:10.1016/j.ajhg.2022.10.013)
256. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, & Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research* 2007 **35** W71-4. (doi:10.1093/nar/gkm306)
257. Holland PM, Abramson RD, Watson R, & Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991 **88** 7276–7280. (doi:10.1073/pnas.88.16.7276)
258. Malkki M & Petersdorf EW. Genotyping of single nucleotide polymorphisms by 5' nuclease allelic discrimination. *Methods in Molecular Biology* 2012 **882** 173–182. (doi:10.1007/978-1-61779-842-9\_10)
259. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, & Moreno V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006 **22** 1928–1929. (doi:10.1093/bioinformatics/btl268)
260. Leontiou CA, Gueorguiev M, Spuy J van der, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JAH, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A, Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JRE, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, ... Korbonits M. The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2008 **93** 2390–2401. (doi:10.1210/jc.2007-2611)
261. Daly AF, Rostomyan L, Betea D, Bonneville JF, Villa C, Pellegata NS, Waser B, Reubi JC, Waeber Stephan C, Christ E, & Beckers A. AIP-mutated acromegaly resistant to first-generation somatostatin analogs: long-term control with pasireotide LAR in two patients. *Endocrine connections* 2019 **8** 367–377. (doi:10.1530/EC-19-0004)
262. Cuny T, Pertuit M, Sahnoun-Fathallah M, Daly A, Occhi G, Odou MF, Tabarin A,

## 6. Referências Bibliográficas

- Nunes ML, Delemer B, Rohmer V, Desailoud R, Kerlan V, Chabre O, Sadoul JLL, Cogne M, Caron P, Cortet-Rudelli C, Lienhardt A, Raingeard I, Guedj AMM, Brue T, Beckers A, Weryha G, Enjalbert A, & Barlier A. Genetic analysis in young patients with sporadic pituitary macroadenomas: Besides AIP don't forget MEN1 genetic analysis. *European Journal of Endocrinology* 2013 **168** 533–541. (doi:10.1530/EJE-12-0763)
263. Barlier A, Vanbellinhen JF, Daly AF, Silvy M, Jaffrain-Rea ML, Trouillas J, Tamagno G, Cazabat L, Bours V, Brue T, Enjalbert A, & Beckers A. Mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene are not highly prevalent among subjects with sporadic pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007 **92** 1952–1955. (doi:10.1210/jc.2006-2702)
264. Lecoq AL, Bouligand J, Hage M, Cazabat L, Salenave S, Linglart A, Young J, Guiochon-Mantel A, Chanson P, & Kamenicky P. Very low frequency of germline GPR101 genetic variation and no biallelic defects with AIP in a large cohort of patients with sporadic pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology* 2016 **174** 523–530. (doi:10.1530/EJE-15-1044)
265. Araujo PB, Kasuki L, Azeredo Lima CH de, Ogino L, Camacho AHSS, Chimelli L, Korbonits M, & Gadelha MR. AIP mutations in brazilian patients with sporadic pituitary adenomas: A single-center evaluation. *Endocrine Connections* 2017 **6** 914–925. (doi:10.1530/EC-17-0237)
266. Cai F, Zhang YD, Zhao X, Yang YK, Ma SH, Dai CX, Liu XH, Yao Y, Feng M, Wei JJ, Xing B, Jiao YH, Wei ZQ, Yin ZM, Zhang B, Gu F, & Wang RZ. Screening for AIP gene mutations in a Han Chinese pituitary adenoma cohort followed by LOH analysis. *European Journal of Endocrinology* 2013 **169** 867–884. (doi:10.1530/EJE-13-0442)
267. Gaspar LM, Gonçalves CI, Saraiva C, Cortez L, Amaral C, Nobre E, & Lemos MC. Low frequency of AIP mutations in patients with young-onset sporadic pituitary macroadenomas. *Journal of endocrinological investigation* 2023 . (doi:10.1007/s40618-023-02083-7)
268. Cesca F, Bettella E, Polli R, Leonardi E, Aspromonte MC, Sicilian B, Stanzial F, Benedicenti F, Sensi A, Ciorba A, Bigoni S, Cama E, Scimemi P, Santarelli R, & Murgia A. Frequency of Usher gene mutations in non-syndromic hearing loss: higher variability of the Usher phenotype. *Journal of Human Genetics* 2020 **65**

- 855–864. (doi:10.1038/s10038-020-0783-1)
269. Paulo P, Maia S, Pinto C, Pinto P, Monteiro A, Peixoto A, & Teixeira MR. Targeted next generation sequencing identifies functionally deleterious germline mutations in novel genes in early-onset/familial prostate cancer. *PLoS genetics* 2018 **14** e1007355. (doi:10.1371/journal.pgen.1007355)
270. Castéra L, Krieger S, Rousselin A, Legros A, Baumann JJ, Bruet O, Brault B, Fouillet R, Goardon N, Letac O, Baert-Desurmont S, Tinat J, Bera O, Dugast C, Berthet P, Polycarpe F, Layet V, Hardouin A, Frébourg T, & Vaur D. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *European journal of human genetics : EJHG* 2014 **22** 1305–1313. (doi:10.1038/ejhg.2014.16)
271. Monti P, Ciribilli Y, Jordan J, Menichini P, Umbach DM, Resnick MA, Luzzatto L, Inga A, & Fronza G. Transcriptional functionality of germ line p53 mutants influences cancer phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007 **13** 3789–3795. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2545)
272. Bento C, Almeida H, Maia TM, Relvas L, Oliveira AC, Rossi C, Girodon F, Fernandez-Lago C, Aguado-Diaz A, Fraga C, Costa RM, Araújo AL, Silva J, Vitória H, Miguel N, Silveira MP, Martin-Nuñez G, & Ribeiro ML. Molecular study of congenital erythrocytosis in 70 unrelated patients revealed a potential causal mutation in less than half of the cases (Where is/are the missing gene(s)?). *European Journal of Haematology* 2013 **91** 361–368. (doi:10.1111/ejh.12170)
273. Maia A, Cidade Rodrigues C, Ribeiro I, & Amaral C. Thyrotropin Secreting Pituitary Adenoma: A Clinical Case of Postoperative Re-Onset Thyrotoxicosis with Adenoma Recurrence. *European journal of case reports in internal medicine* 2023 **10** 3905. (doi:10.12890/2023\_003905)
274. Sousa SMCC De, McCabe MJ, Wu K, Roscioli T, Gayevskiy V, Brook K, Rawlings L, Scott HS, Thompson TJ, Earls P, Gill AJ, Cowley MJ, Dinger ME, & McCormack AI. Germline variants in familial pituitary tumour syndrome genes are common in young patients and families with additional endocrine tumours. *European Journal of Endocrinology* 2017 **176** 635–644. (doi:10.1530/EJE-16-0944)
275. Marques P, Caimari F, Hernández-Ramírez LC, Collier D, Iacovazzo D, Ronaldson A, Magid K, Lim CT, Stals K, Ellard S, Grossman AB, Korbonits M, FIPA

## 6. Referências Bibliográficas

- Consortium, Collier A, Iacovazzo D, Ronaldson A, Magid K, Lim CT, Stals K, Ellard S, Grossman AB, & Korbonits M. Significant benefits of AIP testing and clinical screening in familial isolated and young-onset pituitary tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2020 **105** e2247-60. (doi:10.1210/clinem/dgaa040)
276. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, & Shendure J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature reviews. Genetics* 2011 **12** 745–755. (doi:10.1038/nrg3031)
277. Korbonits M, Storr H, & Kumar A V. Familial pituitary adenomas - Who should be tested for AIP mutations? *Clinical Endocrinology* 2012 **77** 351–356. (doi:10.1111/j.1365-2265.2012.04445.x)
278. Rodrigues E da S, Griffith S, Martin R, Antonescu C, Posey JE, Coban-Akdemir Z, Jhangiani SN, Doheny KF, Lupski JR, Valle D, Bamshad MJ, Hamosh A, Sheffer A, Chong JX, Einhorn Y, Cupak M, & Sobreira N. Variant-level matching for diagnosis and discovery: Challenges and opportunities. *Human mutation* 2022 **43** 782–790. (doi:10.1002/humu.24359)
279. Mighton C, Smith AC, Mayers J, Tomaszewski R, Taylor S, Hume S, Agatep R, Spriggs E, Feilotter HE, Semenuk L, Wong H, Lazo de la Vega L, Marshall CR, Axford MM, Silver T, Charames GS, Gioacchino V Di, Watkins N, Foulkes WD, Clavier M, Hamel N, Chong G, Lamont RE, Parboosingh J, Karsan A, Bosdet I, Young SS, Tucker T, Akbari MR, ... Lerner-Ellis J. Data sharing to improve concordance in variant interpretation across laboratories: results from the Canadian Open Genetics Repository. *Journal of medical genetics* 2022 **59** 571–578. (doi:10.1136/jmedgenet-2021-107738)
280. Hartman P, Beckman K, Silverstein K, Yohe S, Schomaker M, Henzler C, Onsongo G, Lam HC, Munro S, Daniel J, Billstein B, Deshpande A, Hauge A, Mroz P, Lee W, Holle J, Wiens K, Karnuth K, Kemmer T, Leary M, Michel S, Pohlman L, Thayanithy V, Nelson A, Bower M, & Thyagarajan B. Next generation sequencing for clinical diagnostics: Five year experience of an academic laboratory. *Molecular genetics and metabolism reports* 2019 **19** 100464. (doi:10.1016/j.ymgmr.2019.100464)
281. Iancu IFF, Avila-Fernandez A, Arteché A, Trujillo-Tiebas MJ, Riveiro-Alvarez R, Almoguera B, Martin-Merida I, Pozo-Valero M Del, Perea-Romero I, Corton M,

- Minguez P, & Ayuso C. Prioritizing variants of uncertain significance for reclassification using a rule-based algorithm in inherited retinal dystrophies. *npj Genomic Medicine* 2021 **6** 18. (doi:10.1038/s41525-021-00182-z)
282. Preda V, Korbonits M, Cudlip S, Karavitaki N, & Grossman AB. Low rate of germline AIP mutations in patients with apparently sporadic pituitary adenomas before the age of 40: A single-centre adult cohort. *European Journal of Endocrinology* 2014 **171** 659–666. (doi:10.1530/EJE-14-0426)
283. Beckers A, Aaltonen LA, Daly AF, & Karhu A. Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the Pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. *Endocrine Reviews* 2013 **34** 239–277. (doi:10.1210/er.2012-1013)
284. Cai F, Hong Y, Xu J, Wu Q, Reis C, Yan W, Wang W, & Zhang J. A Novel Mutation of Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein Gene Associated with Familial Isolated Pituitary Adenoma Mediates Tumor Invasion and Growth Hormone Hypersecretion. *World Neurosurgery* 2019 **123** e45–e59. (doi:10.1016/j.wneu.2018.11.021)
285. Jaffrain-Rea MLL, Angelini M, Gargano D, Tichomirowa MA, Daly AF, Vanbellinghen JFF, D’Innocenzo E, Barlier A, Giangaspero F, Esposito V, Ventura L, Arcella A, Theodoropoulou M, Naves LA, Fajardo C, Zacharieva S, Rohmer V, Brue T, Gulino A, Cantore G, Alesse E, & Beckers A. Expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-interacting protein in pituitary adenomas: Pathological and clinical implications. *Endocrine-Related Cancer* 2009 **16** 1029–1043. (doi:10.1677/ERC-09-0094)
286. Ramírez-Rentería C, Hernández-Ramírez LC, Portocarrero-Ortiz L, Vargas G, Melgar V, Espinosa E, Espinosa-de-los-Monteros AL, Sosa E, González B, Zúñiga S, Unterländer M, Burger J, Stals K, Bussell AMM, Ellard S, Dang M, Iacovazzo D, Kapur S, Gabrovská P, Radian S, Roncaroli F, Korbonits M, & Mercado M. AIP mutations in young patients with acromegaly and the Tampico Giant: the Mexican experience. *Endocrine* 2016 **53** 402–411. (doi:10.1007/s12020-016-0930-9)
287. Ferraù F, Romeo PD, Puglisi S, Ragonese M, Torre ML, Scaroni C, Occhi G, Menis E De, Arnaldi G, Trimarchi F, & Cannavò S. Analysis of GPR101 and AIP genes mutations in acromegaly: a multicentric study. *Endocrine* 2016 **54** 762–767. (doi:10.1007/s12020-016-0862-4)

## 6. Referências Bibliográficas

288. Caimari F, Hernández-Ramírez LC, Dang MN, Gabrovska P, Iacovazzo D, Stals K, Ellard S, Korbonits M, & International FIPA consortium. Risk category system to identify pituitary adenoma patients with AIP mutations. *Journal of Medical Genetics* 2018 **55** 254–260. (doi:10.1136/jmedgenet-2017-104957)
289. Jennings JE, Georgitsi M, Holdaway I, Daly AF, Tichomirowa M, Beckers A, Aaltonen LA, Karhu A, & Cameron FJ. Aggressive pituitary adenomas occurring in young patients in a large Polynesian kindred with a germline R271W mutation in the AIP gene. *European journal of endocrinology* 2009 **161** 799–804. (doi:10.1530/EJE-09-0406)
290. Karousis ED & Mühlemann O. The broader sense of nonsense. *Trends in Biochemical Sciences* 2022 **47** 921–935. (doi:10.1016/j.tibs.2022.06.003)
291. Trivellin G & Korbonits M. AIP and its interacting partners. *Journal of Endocrinology* 2011 **210** 137–155. (doi:10.1530/JOE-11-0054)
292. Schöfl C, Honegger J, Droste M, Grussendorf M, Finke R, Plöckinger U, Berg C, Willenberg HS, Lammert A, Klingmüller D, Jaursch-Hancke C, Tönjes A, Schneidewind S, Flitsch J, Bullmann C, Dimopoulou C, Stalla G, Mayr B, Hoepfner W, & Schopohl J. Frequency of AIP gene mutations in young patients with acromegaly: A registry-based study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2014 **99** E2789–E2793. (doi:10.1210/jc.2014-2094)
293. Karaca Z, Taheri S, Tanriverdi F, Unluhizarci K, & Kelestimur F. Prevalence of AIP mutations in a series of Turkish acromegalic patients: are synonymous AIP mutations relevant? *Pituitary* 2015 **18** 831–837. (doi:10.1007/s11102-015-0659-0)
294. Trofimiuk-Müldner M, Domagała B, Sokołowski G, Skalniak A, & Hubalewska-Dydejczyk A. AIP gene germline variants in adult Polish patients with apparently sporadic pituitary macroadenomas. *Frontiers in endocrinology* 2023 **14** 1098367. (doi:10.3389/fendo.2023.1098367)
295. Burke W, Parens E, Chung WK, Berger SM, & Appelbaum PS. The Challenge of Genetic Variants of Uncertain Clinical Significance: A Narrative Review. *Annals of internal medicine* 2022 **175** 994–1000. (doi:10.7326/M21-4109)
296. Spada A, Mantovani G, Lania AG, Treppiedi D, Mangili F, Catalano R, Carosi G, Sala E, & Peverelli E. Pituitary Tumors: Genetic and Molecular Factors Underlying

- Pathogenesis and Clinical Behavior. *Neuroendocrinology* 2022 **112** 15–33. (doi:10.1159/000514862)
297. Georgitsi M, Heliövaara E, Paschke R, Kumar AVK, Tischkowitz M, Vierimaa O, Salmela P, Sane T, Menis E De, Cannavò S, Gündogdu S, Lucassen A, Izatt L, Aylwin S, Bano G, Hodgson S, Koch CA, Karhu A, & Aaltonen LA. Large genomic deletions in AIP in pituitary adenoma predisposition. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008 **93** 4146–4151. (doi:10.1210/jc.2008-1003)
298. Chandrasekharappa SC. Positional Cloning of the Gene for Multiple Endocrine Neoplasia-Type 1. *Science* 1997 **276** 404–407. (doi:10.1126/science.276.5311.404)
299. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, & Geil L. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science (New York, N.Y.)* 1993 **260** 1317–1320. (doi:10.1126/science.8493574)
300. Astuti D, Latif F, Dallol A, Dahia PL, Douglas F, George E, Sköldbberg F, Husebye ES, Eng C, & Maher ER. Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *American journal of human genetics* 2001 **69** 49–54. (doi:10.1086/321282)
301. Mougel G, Lagarde A, Albarel F, Essamet W, Luigi P, Mouly C, Vialon M, Cuny T, Castinetti F, Saveanu A, Brue T, Barlier A, & Romanet P. Germinal defects of SDHx genes in patients with isolated pituitary adenoma. *European Journal of Endocrinology* 2020 **183** 369–379. (doi:10.1530/EJE-20-0054)
302. Ribi S, Baumhoer D, Lee K, Edison, Teo ASM, Madan B, Zhang K, Kohlmann WK, Yao F, Lee WH, Hoi Q, Cai S, Woo XY, Tan P, Jundt G, Smida J, Nathrath M, Sung WK, Schiffman JD, Virshup DM, & Hillmer AM. TP53 intron 1 hotspot rearrangements are specific to sporadic osteosarcoma and can cause Li-Fraumeni syndrome. *Oncotarget* 2015 **6** 7727–7740. (doi:10.18632/oncotarget.3115)
303. Mirabello L, Yeager M, Mai PL, Gastier-Foster JM, Gorlick R, Khanna C, Patiño-Garcia A, Sierrasesúmaga L, Lecanda F, Andrulis IL, Wunder JS, Gokgoz N, Barkauskas DA, Zhang X, Vogt A, Jones K, Boland JF, Chanock SJ, & Savage SA. Germline TP53 variants and susceptibility to osteosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute* 2015 **107**. (doi:10.1093/jnci/djv101)

## 6. Referências Bibliográficas

304. Ginsburg OM, Akbari MR, Aziz Z, Young R, Lynch H, Ghadirian P, Robidoux A, Londono J, Vasquez G, Gomes M, Costa MM, Dimitrakakis C, Gutierrez G, Pilarski R, Royer R, & Narod SA. The prevalence of germ-line TP53 mutations in women diagnosed with breast cancer before age 30. *Familial cancer* 2009 **8** 563–567. (doi:10.1007/s10689-009-9287-z)
305. Arcand SL, Akbari MR, Mes-Masson AM, Provencher D, Foulkes WD, Narod SA, & Tonin PN. Germline TP53 mutational spectrum in French Canadians with breast cancer. *BMC medical genetics* 2015 **16** 24. (doi:10.1186/s12881-015-0169-y)
306. Powell BC, Jiang L, Muzny DM, Treviño LR, Dreyer ZE, Strong LC, Wheeler DA, Gibbs RA, & Plon SE. Identification of TP53 as an acute lymphocytic leukemia susceptibility gene through exome sequencing. *Pediatric blood & cancer* 2013 **60** E1-3. (doi:10.1002/pbc.24417)
307. Porter CC. Germ line mutations associated with leukemias. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2016 **2016** 302–308. (doi:10.1182/asheducation-2016.1.302)
308. Libé R & Bertherat J. Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. *European journal of endocrinology* 2005 **153** 477–487. (doi:10.1530/eje.1.02004)
309. Bolz H, Brederlow B von, Ramírez A, Bryda EC, Kutsche K, Nothwang HG, Seeliger M, C-Salcedó Cabrera M del, Vila MC, Molina OP, Gal A, & Kubisch C. Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nature genetics* 2001 **27** 108–112. (doi:10.1038/83667)
310. Wu D, Zhang Z, Chen X, Yan Y, & Liu X. Angel or Devil? - CDK8 as the new drug target. *European journal of medicinal chemistry* 2021 **213** 113043. (doi:10.1016/j.ejmech.2020.113043)
311. Morris EJ, Ji JY, Yang F, Stefano L Di, Herr A, Moon NS, Kwon EJ, Haigis KM, Näär AM, & Dyson NJ. E2F1 represses  $\beta$ -catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature* 2008 **455** 552–556. (doi:10.1038/nature07310)
312. Clevers H & Nusse R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* 2012 **149** 1192–1205. (doi:10.1016/j.cell.2012.05.012)

313. Bernard V, Villa C, Auguste A, Lamothe S, Guillou A, Martin A, Caburet S, Young J, Veitia RA, & Binart N. Natural and molecular history of prolactinoma: Insights from a Prlr<sup>-/-</sup> mouse model. *Oncotarget* 2018 **9** 6144–6155. (doi:10.18632/oncotarget.23713)
314. Gul IS, Hulpiau P, Saeys Y, & Roy F van. Evolution and diversity of cadherins and catenins. *Experimental cell research* 2017 **358** 3–9. (doi:10.1016/j.yexcr.2017.03.001)
315. Kaszak I, Witkowska-Piłaszewicz O, Niewiadomska Z, Dworecka-Kaszak B, Ngosa Toka F, & Jurka P. Role of Cadherins in Cancer-A Review. *International journal of molecular sciences* 2020 **21** . (doi:10.3390/ijms21207624)
316. Ahmed ZM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed Z, Khan S, Griffith AJ, Morell RJ, Friedman TB, Riazuddin S, & Wilcox ER. Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *American journal of human genetics* 2001 **69** 25–34. (doi:10.1086/321277)
317. Zhen Y, Cullen CL, Ricci R, Summers BS, Rehman S, Ahmed ZM, Foster AY, Emery B, Gasperini R, & Young KM. Protocadherin 15 suppresses oligodendrocyte progenitor cell proliferation and promotes motility through distinct signalling pathways. *Communications biology* 2022 **5** 511. (doi:10.1038/s42003-022-03470-1)
318. Kazmierczak P, Sakaguchi H, Tokita J, Wilson-Kubalek EM, Milligan RA, Müller U, & Kachar B. Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature* 2007 **449** 87–91. (doi:10.1038/nature06091)

## 6. Referências Bibliográficas

## 7. Anexos





## Anexo 1 – Permissão de utilização de figura

Permissão obtida para utilização da Figura 1:



### PARTIES:

1. **Cambridge University Press** (Licensor); and
2. **Leonor Gaspar** (Licensee).

Thank you for your recent permission request. Some permission requests for use of material published by the Licensor, such as this one, are now being facilitated by PLSclear.

Set out in this licence cover sheet (the **Licence Cover Sheet**) are the principal commercial terms under which Licensor has agreed to license certain Licensed Material (as defined below) to Licensee. The terms in this Licence Cover Sheet are subject to the attached General Terms and Conditions, which together with this Licence Cover Sheet constitute the licence agreement (the **Licence**) between Licensor and Licensee as regards the Licensed Material. The terms set out in this Licence Cover Sheet take precedence over any conflicting provision in the General Terms and Conditions.

### Licence Terms

Licence Date: 19/08/2024  
PLSclear Ref No: 95499

### The Licensor

Company name: Cambridge University Press  
Address: University Printing House  
Shaftesbury Road  
Cambridge  
CB2 8BS  
GB

### The Licensee

Licensee Contact Name: Leonor Gaspar  
Licensee Address: Av. Infante D. Henrique  
Covilhã  
6200-506  
Portugal

### Licensed Material

title: The Neuroscience of Adolescence  
ISBN/ISSN: 9781107089921  
publisher: Cambridge University Press

Are you requesting permission to reuse the cover of the publication?	No
Figure number & title	Figure 2.1 The hypothalamus regulates hormone release from the pituitary gland.
Page numbers	Chapter 2 - 24
Are you the author of the content that you are requesting to reuse?	No
Will you be changing or editing the image?	Yes
Will it be cropped?	Yes

### For Use In Licensee's Publication(s)

usage type	Book, Journal, Magazine or Academic Paper-Thesis or Dissertation
Will your dissertation be placed in an online repository?	Yes
Author	Leonor Gaspar
Estimated publication date	October 2024
Language	Other
Other language	Portuguese
Other territory	Portugal
Title of dissertation/thesis	Genetic risk factors for pituitary adenomas adenomas
University or institution	University of Beira Interior
Unlimited circulation?	No

### Rights Granted

Exclusivity:	Non-Exclusive
Format:	Thesis/Dissertation
Language:	Portuguese
Territory:	Portugal
Duration:	Lifetime of Licensee's edition
Maximum Circulation:	Maximum print circulation: 1 copies

### Payment Details

Fee Payable:	£0.00 [+ VAT if applicable]
Payment Terms:	Strictly 30 days from date of Licence

## **GENERAL TERMS AND CONDITIONS**

### **1. Definitions and Interpretation**

1.1 Capitalised words and expressions in these General Terms and Conditions have the meanings given to them in the Licence Cover Sheet.

1.2 In this Licence any references (express or implied) to statutes or provisions are references to those statutes or provisions as amended or re-enacted from time to time. The term **including** will be construed as illustrative, without limiting the sense or scope of the words preceding it. A reference to in **writing** or **written** includes faxes and email. The singular includes the plural and vice versa.

### **2. Grant of Rights**

2.1 Subject to payment by Licensee of the Licence Fee in accordance with paragraph 3 below, Licensor grants to Licensee the non-exclusive right to use the Licensed Material as specified in the Licence Cover Sheet.

2.2 The rights licensed to Licensee under this Licence do not include the right to use any third party copyright material incorporated in the Licensed Material. Licensee should check the Licensed Material carefully and seek permission for the use of any such third party copyright material from the relevant copyright owner(s).

2.3 Unless otherwise stated in the Licence Cover Sheet, the Licensed Material may be:

2.3.1 subjected to minor editing, including for the purposes of creating alternative formats to provide access for a beneficiary person (provided that any such editing does not amount to derogatory treatment); and/or

2.3.2 used for incidental promotional use (such as online retail providers' search facilities).

2.4 Save as expressly permitted in this Licence or as otherwise permitted by law, no use or modification of the Licensed Material may be made by Licensee without Licensor's prior written permission.

### **3. Payment**

3.1 Licensee must pay to Licensor the Licence Fee by means of either credit card or on receipt of an invoice, as selected by Licensee during the licence application process via the PLSclear service.

3.2 If payment is by invoice, Licensee agrees to pay the Licence Fee in full by no later than the payment date specified in the relevant invoice.

### **4. Copyright Notice and Acknowledgement**

4.1 Licensee must ensure that the following notices and acknowledgements are reproduced prominently alongside each reproduction by Licensee of the Licensed Material:

4.1.1 the title and author of the Licensed Material;

4.1.2 the copyright notice included in the Licensed Material; and

4.1.3 the statement "Reproduced with permission of the Licensor through PLSclear."

**5. Reversion of Rights**

5.1 The rights licensed to Licensee under this Licence will terminate immediately and automatically upon the earliest of the following events to occur:

5.1.1 the Licence Fee not being received by Licensor in full by the payment date specified in the relevant invoice;

5.1.2 the Licensed Material not being used by Licensee within 18 months of the Licence Date;

5.1.3 expiry of the Licence Duration; or

5.1.4 the Maximum Circulation being reached.

**6. Miscellaneous**

6.1 By using the Licensed Material, Licensee will be deemed to have accepted all the terms and conditions contained in this Licence.

6.2 This Licence contains the entire understanding and agreement of the parties relating to its subject matter and supersedes in all respects any previous or other existing arrangements, agreements or understandings between the parties whether oral or written in relation to its subject matter.

6.3 Licensee may not assign this Licence or any of its rights or obligations hereunder to any third party without Licensor's prior written consent.

6.4 This Licence is governed by and shall be construed in accordance with the laws of England and Wales and the parties hereby irrevocably submit to the non-exclusive jurisdiction of the Courts of England and Wales as regards any claim, dispute or matter arising under or in relation to this Licence.

## **Anexo 2 – “Low frequency of *AIP* mutations in patients with young-onset sporadic pituitary macroadenomas”**

*Journal of Endocrinological Investigation* **2023**, May 7

(DOI: 10,1007/s40618-023-02083-7)

Leonor M. Gaspar<sup>1</sup>, Catarina I. Gonçalves<sup>1</sup>, Catarina Saraiva<sup>2</sup>, Luísa Cortez<sup>3</sup>, Cláudia Amaral<sup>4</sup>, Ema Nobre<sup>5</sup>, Manuel C. Lemos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CICS-UBI, Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>2</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Egas Moniz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Lisboa, Portugal

<sup>3</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Curry Cabral, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, Lisboa, Portugal

<sup>4</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Santo António, Centro Hospitalar Universitário do Porto, Porto, Portugal

<sup>5</sup> Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

\* Corresponding author:

Manuel C. Lemos

CICS-UBI, Health Sciences Research Centre

University of Beira Interior

6200-506 Covilhã, Portugal

Email: mclemos@fcsaude.ubi.pt

ORCID ID 0000-0001-9326-8900



## Low frequency of *AIP* mutations in patients with young-onset sporadic pituitary macroadenomas

L. M. Gaspar<sup>1</sup> · C. I. Gonçalves<sup>1</sup> · C. Saraiva<sup>2</sup> · L. Cortez<sup>3</sup> · C. Amaral<sup>4</sup> · E. Nobre<sup>5</sup> · M. C. Lemos<sup>1</sup> Received: 5 January 2023 / Accepted: 28 March 2023  
© The Author(s) 2023

### Abstract

**Purpose** Mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (*AIP*) gene cause familial isolated pituitary adenomas (FIPA). *AIP* mutations have also been found in patients with apparently sporadic pituitary adenomas, particularly in young patients with large adenomas. The aim of this study was to determine the frequency of *AIP* germline mutations in patients with young-onset sporadic pituitary macroadenomas.

**Methods** The *AIP* gene was sequenced in 218 Portuguese patients with sporadic pituitary macroadenomas diagnosed before the age of 40 years.

**Results** Heterozygous rare sequence variants in *AIP* were identified in 18 (8.3%) patients. However, only four (1.8%) patients had pathogenic or likely pathogenic variants. These consisted of two already known mutations (p.Arg81\* and p.Leu115Trpfs\*41) and two novel mutations (p.Glu246\*, p.Ser53Thrfs\*36). All four patients had GH-secreting adenomas diagnosed between the ages of 14 and 25 years. The frequency of *AIP* pathogenic or likely pathogenic variants in patients under the age of 30 and 18 years was 3.4% and 5.0%, respectively.

**Conclusion** The frequency of *AIP* mutations in this cohort was lower than in other studies. Previous reports may have overestimated the contribution of *AIP* mutations due to the inclusion of genetic variants of uncertain significance. The identification of novel *AIP* mutations expands the known spectrum of genetic causes of pituitary adenomas and may help understand the role of *AIP* mutations in the molecular mechanisms underlying pituitary tumorigenesis.

**Keywords** Pituitary adenoma · *AIP* · Aryl hydrocarbon receptor interacting protein · Mutation

### Introduction

The vast majority of pituitary adenomas occur in a sporadic context and are likely to occur due to acquired somatic and epigenetic mutations [1, 2]. More rarely, pituitary adenomas

occur as part of syndromic diseases (e.g. multiple endocrine neoplasia) or as Familial Isolated Pituitary Adenomas (FIPA), due to inherited germline mutations [3].

Germline mutations in the Aryl Hydrocarbon Receptor-Interacting Protein (*AIP*) gene have been identified in cases of FIPA [4]. The *AIP* gene comprises six exons and encodes a 330-amino acid co-chaperone protein, which has a role in the metabolic clearance of dioxin and other toxic carcinogenic agents and in the regulation of the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) molecular pathway [5, 6]. The expression of *AIP* in pituitary cells reduces cell proliferation rate, suggesting that *AIP* may act as a tumour suppressor gene [7]. Heterozygous inactivating mutations in *AIP* have been reported along the entire coding region of the gene [8]. Tumours that arise in individuals with *AIP* mutations usually present at a younger age, have a larger size, show increased invasiveness, and are often resistant to standard treatments [1, 9]. Prospective studies have

✉ M. C. Lemos  
mclemos@fcsaude.ubi.pt

<sup>1</sup> CICS-UBI, Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6200-506 Covilhã, Portugal

<sup>2</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Egas Moniz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Lisbon, Portugal

<sup>3</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Curry Cabral, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, Lisbon, Portugal

<sup>4</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Santo António, Centro Hospitalar Universitário do Porto, Porto, Portugal

<sup>5</sup> Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, Lisbon, Portugal

shown that the identification of patients with *AIP* mutations may result in improved clinical outcomes [10].

Due to incomplete penetrance, patients with *AIP* mutations may not have a recognized family history of pituitary adenomas and may be classified as sporadic cases. Studies of patients with apparently sporadic pituitary adenomas have demonstrated that a variable proportion of these are due to germline *AIP* mutations. The prevalence of *AIP* mutations has been reported to be around 3.6% in unselected patients with sporadic pituitary adenomas [11]. However, the prevalence of *AIP* mutations increases to 7.2% in patients diagnosed under the age of 40 years [11], to 11.7% in patients with macroadenomas diagnosed under the age of 30 years [12], and to over 20% in paediatric patients [11, 12]. These findings have led to recommendations for *AIP* mutation testing in patients with pituitary macroadenomas diagnosed under the age of 30 [12] or 40 years [11].

The aim of this study was to investigate the prevalence of *AIP* mutations in a large Portuguese cohort of young-onset sporadic pituitary macroadenomas.

## Materials and methods

### Subjects

This multicentre study involved 218 Portuguese patients recruited consecutively at the main endocrinology outpatient clinics in Portugal, from 2018 to 2022. Selection criteria were patients with sporadic macroadenomas (tumour greater diameter  $\geq 1$  cm) diagnosed under the age of 40 years. Patients with a family history of pituitary adenomas (i.e. an affected first or second degree family member) or with evidence of a syndromic form of pituitary adenomas were excluded. Mean age ( $\pm$  standard deviation) at diagnosis was  $28.9 \pm 7.5$  years, 118 patients were under 30 years at diagnosis, and 20 patients were under 18 years at diagnosis. Gender distribution was 113 (52%) females and 105 (48%) males. The type of adenoma was based on histological examination, or in the case of prolactinomas, by clinical, hormonal and radiological examination. Eighty (36.7%) patients had prolactinomas, 61 (28.0%) had somatotropinomas, 34 (15.6%) had non-functioning pituitary adenomas; 14 (6.4%) had corticotropinomas, 15 (6.9%) had mixed-secreting pituitary adenomas; seven (3.2%) had gonadotropinomas, one had a thyrotropinoma, and six (2.8%) had adenomas with undetermined histology. Written informed consent was obtained from all subjects and the study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior (Ref. CE-UBI-Pj-2018-027).

### Genetic analysis

Genomic deoxyribonucleic acid (DNA) from each patient was extracted from peripheral blood leukocytes using previously described methods [13]. Patients were screened for mutations in *AIP* by Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of the six coding exons and exon–intron boundaries and through bi-directional sequencing using a semi-automated DNA sequencer (STAB VIDA, Caparica, Portugal; and ABI 3730XL, Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Primer sequences were previously described by Cazabat et al. [11]. Genomic sequence variants were selected according to the following cumulative criteria: (1) Located in the *AIP* exons and up to 10 nucleotides from the splice site regions; and (2) Absent or rare (population frequency  $< 1\%$ ) in the Genome Aggregation Database (gnomAD) [14]. Selected variants were then classified by the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) criteria [15], using the VarSome search engine [16]. Variants classified as pathogenic or likely pathogenic were considered to be causative mutations. The heterozygous frameshift mutations were confirmed by cloning of the PCR product using a CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoScientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) followed by DNA sequencing of each allele. Sequence variant nomenclature followed standard guidelines [17] and was based on the cDNA reference sequence for the *AIP* gene (GenBank accession NM\_003977.4). The frequency of *AIP* mutations was determined in patients diagnosed under the ages of 40, 30 and 18 years, respectively.

## Results

### Genetic findings

Sequence analysis of the entire coding region of *AIP*, including the exon–intron boundary regions, revealed that 18 (8.3%) patients had 12 different heterozygous rare sequence variants. However, eight of these variants [c.47G > A (p.Arg16His), c.132C > T (p.Asp44Asp), c.753G > A (p.Leu251Leu), c.891C > A (p.Ala297Ala), c.896C > T (p.Ala299Val), c.\*14C > A, c.\*60G > C and c.\*64G > C] were classified as benign according to ACMG criteria (Table 1). The remaining four variants [c.158\_165delGCCGGGCT (p.Ser53Thrfs\*36), c.241C > T (p.Arg81\*), c.343delC (p.Leu115Trpfs\*41), and c.736G > T (p.Glu246\*)] were classified as pathogenic or likely pathogenic (Table 1, Fig. 1). Thus, 1.8% (4/218) of the patients with sporadic pituitary

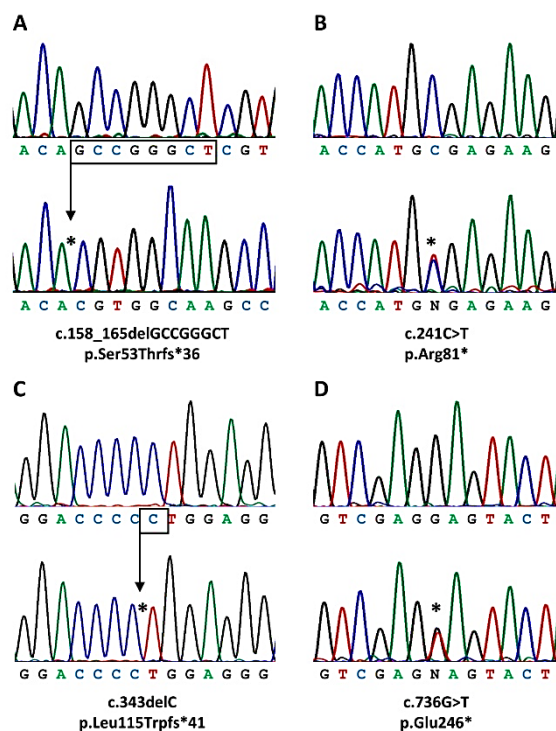
**Table 1** Clinical and genetic characteristics of patients with *AIP* rare sequence variants

Patient number	Sex	Age at diagnosis (yr)	Type of adenoma	Size of adenoma (mm)	Variant (nucleotide, protein level) (a)	GnomAD allele frequency	ACMG classification (criteria) (b)	Previously reported
<i>Pathogenic and likely pathogenic variants</i>								
1	F	20	GH-secreting	20	c.158_165delGCC GGGCT, p.Ser53Thrfs*36	0	LP (PVS1, PM2)	No
2	M	22	GH-secreting	26	c.241C>T, p.Arg81*	0	P (PVS1, PP5, PM2)	Yes [7]
3	M	14	GH/PRL-secreting	14	c.343delC, p.Leu115Trpfs*41	0	LP (PVS1, PM2)	Yes [28]
4	F	25	GH-secreting	28	c.736G>T, p.Glu246*	0	LP (PVS1, PM2)	No
<i>Benign variants</i>								
5	M	18	PRL-secreting	>10	c.47G>A, p.Arg16His	0.0020820	B (BS1, BS2, BP1, BP4, BP6)	Yes [35]
6	F	20	GH-secreting	34	c.132C>T, p.Asp44Asp	0.0079840	B (BA1, BP4, BP6, BP7)	Yes [36]
7	M	33	GH/PRL/FSH/LH-secreting	>10	c.132C>T, p.Asp44Asp	0.0079840	B (BA1, BP4, BP6, BP7)	Yes [36]
8	F	37	PRL-secreting	20	c.132C>T, p.Asp44Asp	0.0079840	B (BA1, BP4, BP6, BP7)	Yes [36]
9	F	40	PRL-secreting	31	c.132C>T, p.Asp44Asp	0.0079840	B (BA1, BP4, BP6, BP7)	Yes [36]
10	F	40	GH-secreting	27	c.753G>A, p.Leu251Leu	0.0001757	B (BS1, BS2, BP4, BP7)	Yes [37]
11	F	28	ACTH-secreting	11	c.*14C>A	0.0004049	B (BS1, BS2, BP4)	Yes [18, 38]
					c.891C>A, p.Ala297Ala	0.0018130	B (BS1, BS2, BP4, BP6, BP7)	
12	F	17	PRL-secreting	>10	c.*64G>A	0.0054470	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	Yes [39]
					c.896C>T, p.Ala299Val	0.0005441	B (BS1, BS2, BP1, BP4)	
13	F	26	PRL-secreting	12	c.896C>T, p.Ala299Val	0.0005441	B (BS1, BS2, BP1, BP4)	Yes [39]
14	F	30	PRL-secreting	15	c.896C>T, p.Ala299Val	0.0005441	B (BS1, BS2, BP1, BP4)	Yes [39]
15	F	36	ACTH-secreting	14	c.896C>T, p.Ala299Val	0.0005441	B (BS1, BS2, BP1, BP4)	Yes [39]
16	M	37	GH-secreting	>10	c.896C>T, p.Ala299Val	0.0005441	B (BS1, BS2, BP1, BP4)	Yes [39]
17	M	28	PRL-secreting	>40	c.*60G>C	0.0078700	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	Yes [40]
18	M	29	PRL-secreting	26	c.*60G>C	0.0078700	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	Yes [40]

F, female; M, male; yr, years; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; FSH, follicle stimulating hormone; GH, growth hormone; LH, luteinizing hormone; PRL, prolactin; mm, millimeters; GnomAD, Genome Aggregation Database. (a) All variants were heterozygous and nucleotide numbering was based on coding reference sequence NM\_003977.4. (b) American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) classification of variants (P, pathogenic; LP, likely pathogenic; B, benign) was based on the evidence for pathogenicity [very strong (PVS1), moderate (PM1–6), or supporting (PP1–5)] or benign impact [stand-alone (BA), strong (BS1–4), or supporting (BP1–7)]. ACMG classifications were based on the VarSome search engine (<https://varsome.com/>), accessed on 27 December 2022

macroadenomas were considered to have causative mutations in *AIP*. All four patients with *AIP* mutations had been diagnosed before the age of 30 years. In patients diagnosed under the age of 30, the prevalence of *AIP*

mutations in this group was 3.4% (4/118). In the paediatric age group (<18 years-old), the prevalence of *AIP* mutations was 5.0% (1/20).



**Fig. 1** *AIP* mutations identified in patients. For each mutation (A–D), the DNA sequences of a normal individual (above) and the patient (below) are shown. The positions of the mutations are indicated by asterisks. All mutations were heterozygous. For clarity, the deletion mutations (A, C) are shown only on the cloned sequences of the mutated alleles

### Clinical characteristics of patients with *AIP* mutations

#### Patient 1

A 20-years-old woman presented with secondary amenorrhea. The amenorrhea had been attributed to anorexia nervosa diagnosed at the age of 15, but did not reverse with the recovery of body weight. She also complained of frontal headaches, excessive sweating and coarse facial features. She denied any visual defects. Her height and weight was 167 cm and 59 kg, respectively. Blood tests revealed basal growth hormone (GH) 14 ng/mL (normal range (NR) < 8), insulin-like growth factor 1 (IGF1) 1100 ng/mL (NR 102–231), follicle-stimulating hormone (FSH) 5.4 mUI/mL (NR 1.2–9), luteinizing hormone (LH) 2.1 mUI/mL (NR 1.1–11.6), estradiol < 5 pg/mL, prolactin 45 ng/mL (NR 4.7–23.0), adrenocorticotropic hormone (ACTH) 30 pg/mL (NR 7.2–63.3), cortisol 15.1 µg/dL (NR 6.2–18.0), thyroid-stimulating hormone (TSH) 1.6 mUI/mL (NR 0.3–4.2) and

free thyroxine (FT4) 1.1 ng/dL (NR 0.85–1.7). An oral glucose tolerance test (OGTT) demonstrated failure of GH suppression, with a GH nadir of 1.4 ng/mL. A magnetic resonance imaging (MRI) showed a 20 mm pituitary tumour. A diagnosis of acromegaly was made and the patient underwent transsphenoidal surgery with excision of the pituitary macroadenoma. The histopathology showed a pituitary adenoma with a predominance of acidophilic cells. Post-surgical testing revealed normalization of GH levels, but persistence of the hypogonadotropic hypogonadism. At the age of 29, she underwent fertility treatment and had a twin pregnancy. At the last follow-up, at the age of 37, blood tests revealed basal GH 0.42 ng/mL (NR < 8), IGF1 102 ng/mL (NR 102–231), FSH 1.4 mUI/mL (NR 1.2–9), LH 0.16 mUI/mL (NR 1.1–11.6), estradiol < 5 pg/mL, prolactin 14.8 ng/mL (NR 4.7–23.0), ACTH 22.2 pg/mL (NR 7.2–63.3), cortisol 16.1 µg/dL (NR 6.2–18.0), TSH 0.95 mUI/mL (NR 0.3–4.2) and FT4 1.2 ng/dL (NR 0.85–1.7). There was no known family history of pituitary adenomas. Genetic analysis revealed an *AIP* heterozygous mutation (c.158\_165delGCCGGGCT, p.Ser53Thrfs\*36) in the patient. No other family members were available for genetic screening.

#### Patient 2

A 23-year-old man presented to the emergency department with a history of frequent and severe headaches, without visual defects. An MRI showed a 20 × 18 mm pituitary tumour with suprasellar extension contacting the optic chiasm and evidence of bleeding into the tumour. Acral growth and prognathism were noted. His height and weight were 189 cm and 97 kg, respectively. Serum IGF1 level was 704 ng/mL (NR 115–340), basal GH level was 6.40 ng/mL and prolactin was 17.40 ng/mL (NR 4.04–15.20), whereas FT4, TSH, cortisol and electrolyte levels were within the normal range. An OGTT demonstrated failure of GH suppression with a GH nadir of 5.82 ng/mL. A diagnosis of acromegaly was made and he was proposed for transsphenoidal surgery. In the meantime, he presented to the emergency department with refractory headaches, visual deficit and ptosis. MRI showed a 24 × 22 × 26 mm tumor with suprasellar and cavernous extension and acute bleeding in the tumour. The patient underwent transsphenoidal surgery and histopathology showed a pituitary adenoma with frequent immunoreactive cells for GH and rarer for prolactin and with areas of recent and old intratumoral haemorrhage, suggestive of pituitary apoplexy. Post-surgical testing revealed cortisol and thyroxine deficiencies that were corrected with hydrocortisone 15 mg/day and levothyroxine 50 µg/day. At the last follow-up, 8 months after surgery, prolactin and testosterone levels were normal, IGF1 level was 127 ng/mL (NR 115–340) and the nadir postglucose GH level was 0.1 ng/mL. The patient

began reducing the dosages of the replacement therapy. There was no known family history of pituitary adenomas. Genetic analysis revealed an *AIP* heterozygous mutation (c.241C>T, p.Arg81\*) in the patient and in his asymptomatic father, who was referred for clinical, biochemical and MRI assessment.

### Patient 3

A 13-year-old boy presented with tall stature. Since the age of 8 years, he demonstrated increased height velocity and started to cross height percentiles and remained above the 97th percentile. The patient also complained of frontal headaches for 2 years. He denied any visual defects. His height and weight was 180.8 cm (+3.3 SDS) and 57 kg, respectively. He displayed coarse facial features with frontal bossing and mild prognathism, large hands and feet. His pubertal status was compatible with Tanner stage 5 (testicular volume 20 mL). Past medical history was unremarkable. The mid-parental height was 178.5 cm. Baseline pituitary investigation showed increased levels of IGF1 (587.5 ng/mL, NR 74–450), random GH 11.3 ng/mL (NR 0.12–8.1), hyperprolactinaemia with PRL 35.1 ng/mL (NR 4.4–19), central hypothyroidism with TSH 2.3  $\mu$ UI/mL (NR 0.51–4.30) and FT4 6.96 pmol/L (NR 12.6–21), morning cortisol of 10.3  $\mu$ g/dL (NR 6.2–12.5), total testosterone 238 ng/dL (NR 105–545), FSH 3.49 U/L (NR 1.5–8.6), LH 1.64 U/L (NR 1.7–8.6). An OGTT demonstrated failure of GH suppression, with a GH nadir of 8.1 ng/mL. MRI of the sellar region showed a pituitary tumour, measuring 13  $\times$  12  $\times$  14 mm, without signs of cavernous sinus invasion, suprasellar extension or optic chiasm compression. Visual field tests were normal. Bone age was coincident with his chronological age. A diagnosis of pituitary gigantism due to a GH-secreting pituitary macroadenoma and associated central hypothyroidism was made. Treatment with levothyroxine was initiated and the patient underwent transsphenoidal surgery with excision of the pituitary macroadenoma, without complications. Histopathology revealed a mammosomatotroph adenoma with a Ki-67 index of <1%. Three months after surgery, he presented normalisation of IGF1 levels, GH nadir during OGTT was <1 ng/mL and no residual tumour was found on the MRI. Recovery of central hypothyroidism was also observed after surgery, and the patient is currently euthyroid without levothyroxine supplementation. He remains in remission 7 years after surgery with serum IGF1 of 308  $\mu$ g/L (NR 93–449), nadir GH level <1 ng/mL during OGTT, and a height of 189.5 cm. There was no known family history of pituitary adenomas. Genetic analysis revealed an *AIP* heterozygous mutation (c.343delC, p.Leu115Trpfs\*41) in the patient. No other family members were available for genetic screening.

### Patient 4

A 25-year-old woman presented with acromegalic facial features, acral growth and secondary amenorrhea. Her height and weight were 159 cm and 61 kg, respectively. Blood tests revealed basal GH 29.8 ng/mL (NR 0.06–5.0), IGF1 895 ng/mL (NR 117–329), FSH 3.2 mUI/mL (NR 1.2–9), LH 1.69 mUI/mL (NR 1.1–11.6), estradiol 15 pg/mL (NR 15–160), prolactin 42 ng/mL (NR 3.46–19.4), ACTH 30.5 pg/mL (NR 5–46), cortisol 9.8  $\mu$ g/dL (NR 5–25), TSH 1.95 mUI/mL (NR 0.4–4.0) and FT4 0.8 ng/dL (NR 0.8–1.9). An OGTT failed to suppress the levels of GH. An MRI showed a 28  $\times$  25  $\times$  12 mm pituitary tumour with invasion of the left cavernous sinus, suprasellar extension, and compression of the optic chiasma. She underwent an unsuccessful transsphenoidal surgery followed by a pterional craniotomy, with subtotal excision of the tumour. Histopathology showed a pituitary adenoma with immunoreactivity for GH and Ki-67 <2%. Two months later, GH levels remained unsuppressed and IGF1 levels were 547 ng/mL (NR 117–329). Testing for other pituitary hormones revealed panhypopituitarism and hormone replacement therapy was initiated. An octreotide test trial resulted in a 63% decrease in GH levels. The patient began treatment with lanreotide 120 mg every 4 weeks and cabergoline 2 mg per week, which resulted in a partial response. Six months later, an MRI showed persistence of a large tumour residue. Eighteen months later, the patient underwent stereotactic radiosurgery and maintained treatment with lanreotide and cabergoline. Two years after radiosurgery, the patient showed clinical, biochemical and imaging improvement, and pharmacological treatment was gradually reduced to lanreotide 120 mg every 9 weeks and cabergoline 0.5 mg per week. At the last follow-up, 9 years after surgery, the patient stopped the treatment with lanreotide and maintained cabergoline 0.25 mg per week and remaining pituitary hormone replacement therapy. Subsequent testing showed a nadir postglucose GH level of 2.87 ng/mL, but with normal IGF1 levels. A head MRI showed residual tumour near the left cavernous sinus. There was no known family history of pituitary adenomas. Genetic analysis revealed an *AIP* heterozygous mutation (c.736G>T, p.Glu246\*) in the patient and in her asymptomatic mother, who was referred for clinical, biochemical and MRI assessment.

### Discussion

The prevalence of pathogenic and likely pathogenic *AIP* variants in our cohort of patients with sporadic pituitary macroadenomas diagnosed under the age of 40 years was 1.8% (4/218). This represents a low prevalence when compared to that of other studies carried out in France (16/222,

7.2%) [11], Brazil (11/132, 8.3%) [18] and Australia (6/34, 17.6%) [19]. Other studies have used lower age cut-offs to analyse the prevalence of *AIP* mutations. A pan-European collaboration [12] analysed a cohort of 163 patients diagnosed with sporadic pituitary macroadenomas before the age of 30 years and reported an 11.7% (19/163) prevalence of *AIP* mutations. Likewise, other studies carried out in Turkey [20], Mexico [21], and Spain [22], in patients under 30 years, reported prevalences of *AIP* mutations of 9% (1/11), 7% (5/55), and 6% (9/148), respectively. In contrast, our study showed that only 3.4% (4/118) of Portuguese patients diagnosed under the age of 30 years had *AIP* mutations. Furthermore, only 5.0% (1/20) of our paediatric patients presented *AIP* mutations, which is also a prevalence lower than in other studies [11, 12, 18, 21, 22]. Interestingly, the reported prevalences in the UK (2/100, 2%, under 40 years) [23] and in Germany (2/82, 2.4%, under 30 years) [24] were closer to those observed in our study. More recently, a study in Poland comprising 131 patients with macroadenomas of all ages failed to identify any clearly pathogenic *AIP* mutations [25].

There may be several explanations for the observed differences across studied populations. First, there may be geographical and ethnic differences in the genetic makeup of the populations and founder effects that increase the frequency of certain mutations. Second, the overall clinical characteristics of the patients may differ between cohorts. For example, as *AIP* mutations occur more commonly in GH-secreting tumours [26], cohorts that are enriched for patients with acromegaly may present a higher prevalence of these mutations. Lastly, the criteria for classifying genetic variants as pathogenic often vary between studies. Several genetic variants reported as pathogenic or variants of uncertain significance (VUS) in earlier studies are now considered to be benign variants. For example, the benign missense (p.Arg16His and p.Ala299Val) and non-coding (c.\*14C>A and c.\*64G>A) variants, which we excluded from our study, were included in the prevalence data of other studies [11, 18]. The inclusion of VUS in prevalence studies is particularly problematic because their interpretation is often difficult and, over time, many are reclassified as benign variants [27]. Thus, it is possible that earlier studies have overestimated the prevalence of true pathogenic variants in young-onset pituitary macroadenomas.

We identified four *AIP* mutations, including two novel [c.158\_165delGCCGGGCT (p.Ser53Thrfs\*36) and c.736G>T (p.Glu246\*)] and two that have been reported before in patients from other countries [c.241C>T (p.Arg81\*) and c.343delC (p.Leu115Trpfs\*41)] [7, 28]. All of these are frameshift or nonsense mutations that are expected to lead to a premature stop codon and consequently to the formation of a shorter protein or to nonsense-mediated decay [29]. Therefore, these are loss-of-function mutations

that abolish protein domains that are important for the binding of *AIP* to its interaction partners [30].

The mutations identified in this study were all found in patients with GH-secreting adenomas. This is not unexpected, as *AIP* mutations have been found to be more prevalent in this tumour type [26]. Apart from the young age of the patients, the clinical course of the disease was not particularly unusual and the pituitary surgery was curative in all but one patient. Thus, in this limited group of patients, we were unable to confirm previous reports that suggested a more unfavourable outcome in patients with *AIP* mutations [1, 9].

None of the patients with *AIP* mutations reported a family history of pituitary adenomas. However, in two cases, the mutation was also identified in an asymptomatic parent who will now undergo clinical, biochemical and MRI assessment. It remains to be determined if these mutation carriers have clinically silent adenomas or incomplete penetrance of the *AIP* mutations. It has been estimated that *AIP* mutations are associated with a disease penetrance of only 20–25% [31] and this explains why family members who share the same mutation often do not express the disease. Nevertheless, our identification of patients with *AIP* mutations will allow for cascade genetic screening of family members, the identification of additional mutation carriers, the clinical screening of these mutation carriers, and an earlier diagnosis, treatment and, possibly, better long-term outcome of any existing pituitary tumours [10].

Our study has some limitations. First, we did not look for *AIP* gross deletions that have been reported before [24, 32, 33]. However, studies using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in large cohorts of patients have not identified any gross gene deletions, indicating that these are unlikely to be frequent [11, 12]. Second, we did not look for mutations in other genes that may be associated with syndromic forms of pituitary adenomas, such as the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene [34]. Although we excluded patients with evidence of other coexisting endocrine tumours or other features suggestive of syndromic forms of pituitary adenomas, we cannot rule out the possibility of a pituitary adenoma being the first manifestation of an undiagnosed syndrome.

In conclusion, the prevalence of *AIP* mutations in our cohort is lower than that in previous reports, possibly because we used more stringent criteria to classify variants as pathogenic. No *AIP* mutations were found in patients diagnosed after the age of 30 years and this suggests that this age cutoff may be the most appropriate for *AIP* genetic testing in patients with apparently sporadic large pituitary adenomas. Finally, our identification of novel *AIP* mutations expands the known spectrum of *AIP* mutations and may contribute to the understanding of the pathogenesis of pituitary adenomas.

**Acknowledgements** We are grateful to the following clinicians for collecting patient samples and clinical data: Ana Agapito (Lisboa), Ana Monteiro (Braga), Ana Palha (Lisboa), Bernardo Pereira (Ponta Delgada), Daniela Cavaco (Lisboa), Davide Carvalho (Porto), Fernando Fonseca (Lisboa), Hélder Simões (Lisboa), Inês Barros (Braga), Inês Damásio (Lisboa), Isabel Inácio (Porto), Joana Pereira (Lisboa), João Duarte (Lisboa), Maria Bugalho (Lisboa), Maria Manuel Silva (Porto), Maria Salomé (Lisboa), Mariana Barbosa (Braga), Olinda Marques (Braga), Sara Donato (Lisboa), Sara Pinheiro (Lisboa), Sílvia Paredes (Braga), Teresa Martins (Coimbra), Teresa Rego (Lisboa), Tiago Silva (Lisboa), Valeriano Leite (Lisboa).

**Funding** Open access funding provided by FCT/IFCCN (b-on). This research was funded by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT, project Grants PTDC/MEC-MET/29489/2017 and UIDB/00709/2020). L.M.G. was the recipient of a PhD fellowship from FCT (SFRH/BD/147160/2019).

**Data availability** The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

**Competing interests** The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

**Ethics approval** This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior (Ref. CE-UBI-Pj-2018-027).

**Informed consent** Written informed consent was obtained from all subjects.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Spada A, Mantovani G, Lania AG, Treppiedi D, Mangili F, Catalano R, Carosi G, Sala E, Peverelli E (2022) Pituitary tumors: genetic and molecular factors underlying pathogenesis and clinical behavior. *Neuroendocrinology* 112(1):15–33. <https://doi.org/10.1159/000514862>
- Chang M, Yang C, Bao X, Wang R (2020) Genetic and epigenetic causes of pituitary adenomas. *Front Endocrinol* 11:596554. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.596554>
- Coopmans EC, Korbonits M (2022) Molecular genetic testing in the management of pituitary disease. *Clin Endocrinol* 97(4):424–435. <https://doi.org/10.1111/cen.14706>
- Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gundogdu S, De Menis E, Makinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA (2006) Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science (New York)* 312(5777):1228–1230. <https://doi.org/10.1126/science.1126100>
- Ozfirat Z, Korbonits M (2010) AIP gene and familial isolated pituitary adenomas. *Mol Cell Endocrinol* 326(1–2):71–79. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.05.001>
- Hernandez-Ramirez LC, Trivellin G, Stratakis CA (2017) Role of phosphodiesterases on the function of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) in the pituitary gland and on the evaluation of AIP gene variants. *Hormone Metab Res Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 49(4):286–295. <https://doi.org/10.1055/s-0043-104700>
- Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JA, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A Jr, Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, Peters G, Bolger GB, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M (2008) The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 93(6):2390–2401. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2611>
- Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, Hussain M, Phillips AD, Cooper DN (2017) The human gene mutation database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* 136(6):665–677. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1779-6>
- Denes J, Korbonits M (2021) The clinical aspects of pituitary tumour genetics. *Endocrine* 71(3):663–674. <https://doi.org/10.1007/s12020-021-02633-0>
- Marques P, Caimari F, Hernandez-Ramirez LC, Collier D, Iacovazzo D, Ronaldson A, Magid K, Lim CT, Stals K, Ellard S, Grossman AB, Korbonits M, Consortium F (2020) Significant benefits of AIP testing and clinical screening in familial isolated and young-onset pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 105(6):e2247–2260. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa040>
- Cazabat L, Bouligand J, Salenave S, Bernier M, Gaillard S, Parker F, Young J, Guiochon-Mantel A, Chanson P (2012) Germline AIP mutations in apparently sporadic pituitary adenomas: prevalence in a prospective single-center cohort of 443 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 97(4):E663–670. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2291>
- Tichomirowa MA, Barlier A, Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ronchi C, Yaneva M, Urban JD, Petrossians P, Elenkova A, Tabarin A, Desailly R, Maiter D, Schurmeyer T, Cozzi R, Theodoropoulou M, Sievers C, Bernabeu I, Naves LA, Chabre O, Montanana CF, Hana V, Halaby G, Delemer B, Aizpun JJ, Sonnet E, Longas AF, Hagelstein MT, Caron P, Stalla GK, Bours V, Zacharieva S, Spada A, Brue T, Beckers A (2011) High prevalence of AIP gene mutations following focused screening in young patients with sporadic pituitary macroadenomas. *Eur J Endocrinol* 165(4):509–515. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0304>
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 16(3):1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
- Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alfoldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP, Gauthier LD, Brand H, Solomonson M, Watts NA, Rhodes D, Singer-Berk M, England EM, Seaby EG, Kosmicki JA, Walters RK, Tashman K, Farjoun Y, Banks E, Poterba T, Wang A, Seed C, Whiffin N, Chong JX, Samocha KE, Pierce-Hoffman E, Zappala Z, O'Donnell-Luria AH, Minikel EV, Weisburd B, Lek M, Ware

- JS, Vittal C, Armean IM, Bergelson L, Cibulskis K, Connolly KM, Covarrubias M, Donnelly S, Ferriera S, Gabriel S, Gentry J, Gupta N, Jeandet T, Kaplan D, Llanwarne C, Munshi R, Novod S, Petrillo N, Roazen D, Ruano-Rubio V, Saltzman A, Schleicher M, Soto J, Tibbetts K, Tolonen C, Wade G, Talkowski ME, Genome Aggregation Database C, Neale BM, Daly MJ, MacArthur DG (2020) The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 581(7809):434–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
15. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Reh HL, Committee ALQA (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med J Am Coll Med Genet* 17(5):405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
  16. Kopyanov S, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, Massouras A (2019) VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics (Oxford)* 35(11):1978–1980. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>
  17. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE (2016) HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat* 37(6):564–569. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
  18. Araujo PB, Kasuki L, de Azeredo Lima CH, Ogino L, Camacho AHS, Chimelli L, Korbonits M, Gadelha MR (2017) AIP mutations in Brazilian patients with sporadic pituitary adenomas: a single-center evaluation. *Endocr Connect* 6(8):914–925. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0237>
  19. De Sousa SMC, McCabe MJ, Wu K, Roscioli T, Gayevskiy V, Brook K, Rawlins L, Scott HS, Thompson TJ, Earls P, Gill AJ, Cowley MJ, Dinger ME, McCormack AI (2017) Germline variants in familial pituitary tumour syndrome genes are common in young patients and families with additional endocrine tumours. *Eur J Endocrinol* 176(5):635–644. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0944>
  20. Karaca Z, Taheri S, Tanriverdi F, Unluhizarci K, Kelestimur F (2015) Prevalence of AIP mutations in a series of Turkish acromegalic patients: are synonymous AIP mutations relevant? *Pituitary* 18(6):831–837. <https://doi.org/10.1007/s11102-015-0659-0>
  21. Ramirez-Renteria C, Hernandez-Ramirez LC, Portocarrero-Ortiz L, Vargas G, Melgar V, Espinosa E, Espinosa-de-Los-Monteros AL, Sosa E, Gonzalez B, Zuniga S, Unterlander M, Burger J, Stals K, Bussell AM, Ellard S, Dang M, Iacovazzo D, Kapur S, Gabrovská P, Radian S, Roncaroli F, Korbonits M, Mercado M (2016) AIP mutations in young patients with acromegaly and the Tampico Giant: the Mexican experience. *Endocrine* 53(2):402–411. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0930-9>
  22. Martinez de LaPiscina I, Portillo Najera N, Rica I, Gaztambide S, Webb SM, Santos A, Moure MD, Paja Fano M, Hernandez MI, Chueca-Guindelain MJ, Hernandez-Ramirez LC, Soto A, Valdes N, Castano L (2021) Clinical and genetic characteristics in patients under 30 years with sporadic pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 185(4):485–496. <https://doi.org/10.1530/EJE-21-0075>
  23. Preda V, Korbonits M, Cudlip S, Karavitaki N, Grossman AB (2014) Low rate of germline AIP mutations in patients with apparently sporadic pituitary adenomas before the age of 40: a single-centre adult cohort. *Eur J Endocrinol* 171(5):659–666. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0426>
  24. Schöfl C, Honegger J, Droste M, Grussendorf M, Finke R, Plockinger U, Berg C, Willenberg HS, Lammert A, Klingmüller D, Jausch-Hancke C, Tonjes A, Schneidewind S, Flitsch J, Bullmann C, Dimopoulou C, Stalla G, Mayr B, Hoepfner W, Schöpl H (2014) Frequency of AIP gene mutations in young patients with acromegaly: a registry-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 99(12):E2789–2793. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2094>
  25. Trofimiuk-Muldner M, Domagala B, Sokolowski G, Skalniak A, Hubalewska-Dydejczyk A (2023) AIP gene germline variants in adult Polish patients with apparently sporadic pituitary macroadenomas. *Front Endocrinol* 14:1098367. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1098367>
  26. Caimari F, Hernandez-Ramirez LC, Dang MN, Gabrovská P, Iacovazzo D, Stals K, Ellard S, Korbonits M, International FC (2018) Risk category system to identify pituitary adenoma patients with AIP mutations. *J Med Genet* 55(4):254–260. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104957>
  27. Burke W, Parens E, Chung WK, Berger SM, Appelbaum PS (2022) The challenge of genetic variants of uncertain clinical significance: a narrative review. *Ann Intern Med* 175(7):994–1000. <https://doi.org/10.7326/M21-4109>
  28. Daly AF, Rostomyan L, Betea D, Bonneville JF, Villa C, Pellegata NS, Waser B, Reubi JC, Waerber Stephan C, Christ E, Beckers A (2019) AIP-mutated acromegaly resistant to first-generation somatostatin analogs: long-term control with pasireotide LAR in two patients. *Endocr Connect* 8(4):367–377. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0004>
  29. Karousis ED, Muhlemann O (2022) The broader sense of nonsense. *Trends Biochem Sci* 47(11):921–935. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.06.003>
  30. Trivellin G, Korbonits M (2011) AIP and its interacting partners. *J Endocrinol* 210(2):137–155. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0054>
  31. Hernandez-Ramirez LC, Gabrovská P, Denes J, Stals K, Trivellin G, Tilley D, Ferrau F, Evanson J, Ellard S, Grossman AB, Roncaroli F, Gadelha MR, Korbonits M, International FC (2015) Landscape of familial isolated and young-onset pituitary adenomas: prospective diagnosis in AIP mutation carriers. *J Clin Endocrinol Metab* 100(9):E1242–E1254. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1869>
  32. Georgitsi M, Heliövaara E, Paschke R, Kumar AV, Tischkowitz M, Vierimaa O, Salmela P, Sane T, De Menis E, Cannavo S, Gundogdu S, Lucassen A, Izatt L, Aylwin S, Bano G, Hodgson S, Koch CA, Karhu A, Aaltonen LA (2008) Large genomic deletions in AIP in pituitary adenoma predisposition. *J Clin Endocrinol Metab* 93(10):4146–4151. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1003>
  33. Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, Chapple JP, Trivellin G, Gueorguiev M, Guegan K, Stals K, Khoo B, Kumar AV, Ellard S, Grossman AB, Korbonits M, International FC (2010) Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Hum Mutat* 31(8):950–960. <https://doi.org/10.1002/humu.21292>
  34. Cuny T, Pertuit M, Sahnoun-Fathallah M, Daly A, Occhi G, Odou MF, Tabarin A, Nunes ML, Delemer B, Rohmer V, Desailly R, Kerlan V, Chabre O, Sadoul JL, Cogne M, Caron P, Cortet-Rudelli C, Lienhardt A, Raingard I, Guedj AM, Brue T, Beckers A, Weryha G, Enjalbert A, Barlier A (2013) Genetic analysis in young patients with sporadic pituitary macroadenomas: besides AIP don't forget MEN1 genetic analysis. *Eur J Endocrinol* 168(4):533–541. <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0763>
  35. Daly AF, Vanbellinghen JF, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, Naves LA, Guitelman MA, Murat A, Emy P, Gimenez-Roqueplo AP, Tamburrano G, Raverot G, Barlier A, De Herder W, Penfornis A, Ciccarelli E, Estour B, Lecomte P, Gatta B, Chabre O, Sabate MI, Bertagna X, Garcia Basavilbaso N, Stalldecker G, Colao A, Ferolla P, Wemeau JL, Caron P, Sadoul JL, Oneto A, Archambeaud F, Calender A, Sinilnikova O, Montanana CF, Cavagnini F, Hana V, Solano A, Delettières D, Luccio-Camelo DC, Basso A, Rohmer V, Brue T, Bours V, Teh BT, Beckers A (2007) Aryl hydrocarbon

- receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *J Clin Endocrinol Metab* 92(5):1891–1896. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2513>
36. Barlier A, Vanbellinghen JF, Daly AF, Silvy M, Jaffrain-Rea ML, Trouillas J, Tamagno G, Cazabat L, Bours V, Brue T, Enjalbert A, Beckers A (2007) Mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene are not highly prevalent among subjects with sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 92(5):1952–1955. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2702>
  37. Lecoq AL, Bouligand J, Hage M, Cazabat L, Salenave S, Linglart A, Young J, Guiochon-Mantel A, Chanson P, Kamenicky P (2016) Very low frequency of germline GPR101 genetic variation and no biallelic defects with AIP in a large cohort of patients with sporadic pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 174(4):523–530. <https://doi.org/10.1530/EJE-15-1044>
  38. Cazabat L, Libe R, Perlemoine K, Rene-Corail F, Burnichon N, Gimenez-Roqueplo AP, Dupasquier-Fediaevsky L, Bertagna X, Clauser E, Chanson P, Bertherat J, Raffin-Sanson ML (2007) Germline inactivating mutations of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in a large cohort of sporadic acromegaly: mutations are found in a subset of young patients with macroadenomas. *Eur J Endocrinol* 157(1):1–8. <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0181>
  39. Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, Tuppurainen K, Makinen MJ, Vierimaa O, Paschke R, Saeger W, van der Lijjt RB, Sanc T, Robledo M, De Menis E, Weil RJ, Wasik A, Zielinski G, Lucewicz O, Lubinski J, Launonen V, Vahteristo P, Aaltonen LA (2007) Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(10):4101–4105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700004104>
  40. Cai F, Zhang YD, Zhao X, Yang YK, Ma SH, Dai CX, Liu XH, Yao Y, Feng M, Wei JJ, Xing B, Jiao YH, Wei ZQ, Yin ZM, Zhang B, Gu F, Wang RZ (2013) Screening for AIP gene mutations in a Han Chinese pituitary adenoma cohort followed by LOH analysis. *Eur J Endocrinol* 169(6):867–884. <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0442>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### Anexo 3 – Descrição clínica dos doentes

Doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho de tumor (mm)	Estudo 2	Estudo 3	Estudo 4
6905	M	17	GH/PRL	>10	✓	✓	✓
6906	F	17	PRL	>10	✓	✓	✓
6907	M	13	GH/TSH	>10	✓	✓	✓
6908	M	41	GH	>10	-	-	✓
7006	F	14	PRL	18	✓	-	✓
7007	M	14	PRL	20	✓	-	-
7029	F	18	PRL	<10	-	-	✓
7111	M	65	Não secretor	15	-	-	✓
7329	M	14	GH/PRL	14	✓	✓	✓
7630	M	25	GH	24	✓	✓	✓
7631	M	30	GH	30	✓	✓	✓
7632	F	25	GH	25	✓	✓	✓
7633	F	28	GH	>10	✓	✓	✓
7634	F	24	GH	>10	✓	✓	✓
7635	M	28	PRL	52	✓	✓	✓
7636	M	29	Não secretor	33	✓	✓	✓
7637	F	20	GH	34	✓	✓	✓
7641	F	29	GH	>10	✓	✓	✓
7642	F	20	PRL	>10	✓	✓	✓
7643	M	26	Não secretor	>10	✓	✓	✓
7644	M	29	GH	34	✓	✓	✓
7648	M	25	PRL	>20	✓	✓	✓
7656	M	26	GH	>10	✓	✓	✓
7663	M	20	GH/PRL	18	✓	✓	✓
7667	F	25	PRL	>40	✓	✓	✓
7674	F	31	GH	>10	✓	✓	✓
7675	M	29	Não secretor	40	✓	✓	✓
7676	M	28	PRL	>40	✓	✓	✓
7678	F	25	PRL	12	✓	✓	✓
7680	F	17	PRL	12,4	✓	✓	✓

## 7.3. Anexos

Doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho de tumor (mm)	Estudo 2	Estudo 3	Estudo 4
7681	M	27	GH	15	✓	✓	✓
7682	F	25	Não secretor	>10	✓	✓	✓
7684	F	24	PRL	12	✓	✓	✓
7685	F	32	GH	>10	✓	✓	✓
7686	M	27	Não secretor	>10	✓	✓	✓
7687	F	32	ACTH	23	✓	✓	✓
7688	F	22	PRL	12	✓	✓	✓
7689	F	17	GH	>10	✓	✓	✓
7694	F	23	PRL	>10	✓	✓	✓
7695	M	41	PRL	23	-	-	✓
7696	M	41	GH	17	-	-	✓
7697	F	66	GH	15	-	-	✓
7698	F	25	PRL	4,9	-	-	✓
7699	F	61	GH	13	-	-	✓
7700	M	45	PRL	>10	-	-	✓
7701	F	74	Não secretor	24,7	-	-	✓
7702	F	65	Não secretor	15	-	-	✓
7703	M	37	Não secretor	30	✓	✓	✓
7704	F	63	PRL	42	-	-	✓
7705	M	57	Não secretor	>10	-	-	✓
7706	F	52	Não secretor	20	-	-	✓
7707	F	62	FSH/LH	34	-	-	✓
7708	F	51	Não secretor	13	-	-	✓
7712	M	33	PRL	20	✓	✓	✓
7713	F	44	Não secretor	>10	-	-	✓
7714	M	58	Não secretor	30	-	-	✓
7715	F	17	PRL	<10	-	-	✓
7716	M	41	GH/PRL	32	-	-	✓
7717	F	59	GH	15	-	-	✓
7718	M	67	PRL	20	-	-	✓
7719	M	49	GH	18	-	-	✓
7720	M	72	PRL	15	-	-	✓
7722	F	34	ACTH	10	✓	✓	✓

<b>Doente (ID)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade de diagnóstico (anos)</b>	<b>Tipo de adenoma (hormonas produzidas)</b>	<b>Tamanho de tumor (mm)</b>	<b>Estudo 2</b>	<b>Estudo 3</b>	<b>Estudo 4</b>
7723	M	53	GH	14	-	-	✓
7724	M	58	GH	19	-	-	✓
7725	F	68	Não secretor	22	-	-	✓
7726	M	44	Não secretor	>10	-	-	✓
7727	M	59	GH	16	-	-	✓
7728	F	40	PRL	12	✓	✓	✓
7729	F	28	Não secretor	>18	✓	✓	✓
7730	M	54	PRL	28	-	-	✓
7731	M	84	Não secretor	29,5	-	-	✓
7732	M	56	Não secretor	29	-	-	✓
7733	M	62	FSH/LH	35	-	-	✓
7734	M	66	Não secretor	19	-	-	✓
7735	M	71	Não secretor	13	-	-	✓
7736	F	40	GH	>10	✓	✓	✓
7742	M	37	GH	37	✓	✓	✓
7743	M	38	GH	>10	✓	✓	✓
7744	F	17	ACTH	Indeterminado	-	✓	✓
7745	F	40	Não secretor	22	✓	✓	✓
7753	F	30	PRL	< 10	-	-	✓
7754	M	47	PRL	>16	-	-	✓
7755	M	42	Não secretor	>10	-	-	✓
7756	M	51	FSH/LH	29	-	-	✓
7757	F	66	Não secretor	>10	-	-	✓
7763	F	39	Não secretor	23	✓	✓	✓
7764	F	33	PRL	30	✓	✓	✓
7765	M	42	FSH/LH	25	-	-	✓
7766	F	52	GH	30	-	-	✓
7767	F	56	GH	>10	-	-	✓
7768	F	56	Não secretor	>10	-	-	✓
7769	M	26	Indefenido	>10	✓	✓	✓
7770	M	33	GH	>10	✓	✓	✓
7771	M	53	PRL	23,6	-	-	✓
7772	F	45	GH	>10	-	-	✓

## 7.3. Anexos

Doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho de tumor (mm)	Estudo 2	Estudo 3	Estudo 4
7773	M	52	PRL	17	-	-	✓
7774	F	35	PRL	9	-	-	✓
7775	M	73	FSH/LH	26	-	-	✓
7776	M	53	ACTH	8,4	-	-	✓
7777	F	45	Indefinido	27	-	-	✓
7778	M	36	GH	>10	✓	✓	✓
7787	F	43	Não secretor	28	-	-	✓
7788	F	60	Não secretor	41	-	-	✓
7789	M	27	PRL	18	✓	✓	✓
7790	M	46	Indefinido	35	-	-	✓
7791	M	23	GH	25	✓	✓	✓
7792	M	18	TSH	10	✓	✓	✓
7793	F	22	GH	40	✓	✓	✓
7798	M	57	Não secretor	20	-	-	✓
7799	M	33	GH	8	-	-	✓
7800	F	50	Não secretor	22,5	-	-	✓
7801	F	62	GH	10	-	-	✓
7802	M	59	FSH/LH	27	-	-	✓
7803	F	37	GH	5,3	-	-	✓
7804	M	33	GH	17	✓	✓	✓
7805	F	23	Não secretor	35	✓	✓	✓
7806	M	37	PRL	15	✓	✓	✓
7807	F	49	PRL	27	-	-	✓
7808	M	49	FSH/LH	>10	-	-	✓
7809	F	77	Não secretor	30,3	-	-	✓
7810	F	55	GH	>10	-	-	✓
7811	F	34	ACTH	<10	-	-	✓
7812	M	68	GH	12	-	-	✓
7813	F	37	GH	40	✓	✓	✓
7814	F	14	PRL	12	✓	✓	✓
7815	M	56	Indefinido	33	-	-	✓
7816	M	46	GH	11	-	-	✓
7817	F	45	GH	?	-	-	✓

<b>Doente (ID)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade de diagnóstico (anos)</b>	<b>Tipo de adenoma (hormonas produzidas)</b>	<b>Tamanho de tumor (mm)</b>	<b>Estudo 2</b>	<b>Estudo 3</b>	<b>Estudo 4</b>
7818	F	42	GH	13	-	-	✓
7819	F	46	GH	41,6	-	-	✓
7820	F	37	PRL	20,1	✓	✓	✓
7821	M	33	GH	23	✓	✓	✓
7822	M	38	GH	<10	-	-	✓
7823	F	50	GH	<10	-	-	✓
7824	M	69	Não secretor	25	-	-	✓
7825	F	55	GH	3,5	-	-	✓
7826	M	18	PRL	>10	✓	✓	✓
7827	M	28	GH/PRL	11	✓	✓	✓
7828	M	39	PRL	37	✓	✓	✓
7829	M	57	PRL	>10	-	-	✓
7830	M	53	PRL	23	-	-	✓
7831	F	70	Não secretor	25	-	-	✓
7832	M	66	Não secretor	24	-	-	✓
7833	M	29	PRL	24	✓	✓	✓
7835	F	30	GH	15	✓	✓	✓
7836	F	40	GH	>10	✓	✓	✓
7837	M	33	PRL	40	✓	✓	✓
7838	F	28	ACTH	<10	-	-	✓
7839	M	20	Não secretor	17	✓	✓	✓
7840	M	34	GH	28	✓	✓	✓
7841	M	41	GH	31	-	-	✓
7842	F	58	Não secretor	30	-	-	✓
7843	F	60	GH	>10	-	-	✓
7844	M	39	PRL	30	✓	✓	✓
7845	F	40	GH	>10	✓	✓	✓
7846	F	29	PRL	<10	-	-	✓
7847	M	50	PRL	50,5	-	-	✓
7848	F	41	PRL	6,3	-	-	✓
7849	M	53	Não secretor	>30	-	-	✓
7850	M	32	GH/PRL	60	✓	✓	✓
7851	F	35	ACTH	14	✓	✓	✓

## 7.3. Anexos

Doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho de tumor (mm)	Estudo 2	Estudo 3	Estudo 4
7852	M	22	GH	>10	✓	✓	✓
7853	F	24	PRL	10	✓	✓	✓
7854	M	59	PRL	30	-	-	✓
7855	F	60	GH	>10	-	-	✓
7856	F	63	Não secretor	13	-	-	✓
7858	M	62	Não secretor	37	-	-	✓
7859	F	68	Não secretor	24	-	-	✓
7860	M	12	GH	28,9	✓	✓	✓
7861	M	67	Indefinido	24	-	-	✓
7862	F	16	PRL	10	✓	✓	✓
7863	F	2	PRL	8	-	-	✓
7864	F	71	FSH/LH	17	-	-	✓
7865	F	47	GH	20	-	-	✓
7866	F	47	TSH	-	-	-	✓
7867	F	43	ACTH	<10	-	-	✓
7868	F	39	GH	18	✓	✓	✓
7869	F	62	GH	20	-	-	✓
7870	M	29	PRL	26	✓	✓	✓
7871	F	49	TSH	17	-	-	✓
7872	M	63	Não secretor	29	-	-	✓
7873	F	19	PRL	13	✓	✓	✓
7874	F	30	ACTH	<10	-	-	✓
7875	F	66	PRL	13	-	-	✓
7876	F	56	Não secretor	20	-	-	✓
7877	F	60	GH	13	-	-	✓
7878	M	32	Indefinido	16	✓	✓	✓
7879	M	22	GH	26	✓	✓	✓
7880	F	37	Indefinido	35	✓	✓	✓
7881	M	61	Indefinido	20	-	-	✓
7882	F	51	Indefinido	>10	-	-	✓
7883	F	30	PRL	10	✓	✓	✓
7884	F	24	GH	18	✓	✓	✓
7885	F	30	GH	>10	✓	✓	✓

Doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho de tumor (mm)	Estudo 2	Estudo 3	Estudo 4
7886	M	57	FSH/LH	31	-	-	✓
7887	F	21	PRL	20	✓	✓	✓
7888	F	45	ACTH	>10	-	-	✓
7889	M	32	PRL	>40	✓	✓	✓
7890	M	50	Não secretor	23	-	-	✓
7891	F	74	Não secretor	27	-	-	✓
7892	M	28	Não secretor	50	✓	✓	✓
7893	F	40	Não secretor	22	✓	✓	✓
7894	F	36	ACTH	>10	✓	✓	✓
7895	M	33	FSH/LH	14	✓	✓	✓
7896	F	40	GH	20	✓	✓	✓
7897	M	54	GH	13	-	-	✓
7899	M	44	PRL	11	-	-	✓
7900	M	57	Não secretor	28,5	-	-	✓
7901	F	50	GH	>10	-	-	✓
7902	F	43	GH	15	-	-	✓
7903	F	41	ACTH	<10	-	-	✓
7904	F	27	PRL	>10	✓	✓	✓
7905	F	52	Não secretor	>10	-	-	✓
7906	M	33	ACTH	40	✓	✓	✓
7907	F	51	GH/PRL	25	-	-	✓
7908	M	56	Não secretor	41,2	-	-	✓
7909	F	50	Não secretor	>10	-	-	✓
7911	M	35	Indefinido	>10	✓	✓	✓
7912	F	56	PRL	14	-	-	✓
7914	M	14	PRL	>10	✓	✓	✓
7915	M	70	FSH/LH	-	-	-	✓
7916	M	25	Não secretor	>10	✓	✓	✓
7917	M	50	Não secretor	-	-	-	✓
7918	M	30	Não secretor	-	-	-	✓
7919	M	28	GH/PRL	6	-	-	✓
7920	M	18	ACTH	41	✓	✓	✓
7921	F	59	PRL	16	-	-	✓

## 7.3. Anexos

Doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho de tumor (mm)	Estudo 2	Estudo 3	Estudo 4
7922	F	25	ACTH	8	-	-	✓
7923	F	29	GH	26	✓	✓	✓
7924	F	40	Indefinido	24	✓	✓	✓
7925	M	41	GH/PRL	>10	-	-	✓
7926	F	56	GH	>10	-	-	✓
7927	F	50	ACTH	<10	-	-	✓
7929	M	31	GH	24	✓	✓	✓
7930	F	27	ACTH	-	-	-	✓
7931	F	69	Não secretor	23	-	-	✓
7932	M	65	Não secretor	-	-	-	✓
7933	F	60	Não secretor	19	-	-	✓
7934	F	36	PRL	>10	✓	✓	✓
7935	M	24	GH	31	✓	✓	✓
7936	M	62	Não secretor	23	-	-	✓
7937	F	53	GH	<10	-	-	✓
7938	F	29	PRL	-	-	-	✓
7939	F	44	GH	-	-	-	✓
7940	F	30	GH	-	-	-	✓
7941	F	26	GH	-	-	-	✓
7942	F	42	GH	-	-	-	✓
7943	M	29	PRL	30	✓	✓	✓
7944	M	45	GH	8	-	-	✓
7945	F	31	PRL	>10	✓	✓	✓
7946	F	39	GH	-	-	-	✓
7947	M	28	GH	-	-	-	✓
7948	M	45	GH	4	-	-	✓
7949	M	37	GH	25	✓	✓	✓
7950	M	48	PRL	>10	-	-	✓
7951	F	42	GH	-	-	-	✓
7952	F	24	ACTH	-	-	-	✓
7953	M	62	Não secretor	>10	-	-	✓
7954	F	26	PRL	7,1	-	-	✓
7955	M	70	FSH/LH	40,3	-	-	✓

<b>Doente (ID)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade de diagnóstico (anos)</b>	<b>Tipo de adenoma (hormonas produzidas)</b>	<b>Tamanho de tumor (mm)</b>	<b>Estudo 2</b>	<b>Estudo 3</b>	<b>Estudo 4</b>
7956	F	17	PRL	12	-	-	✓
7957	F	67	GH	20	-	-	✓
7958	M	38	GH	>40	✓	✓	✓
7959	M	36	FSH/LH	22,8	✓	✓	✓
7960	M	22	PRL	20	-	-	✓
7961	F	43	Não secretor	>40	-	-	✓
7962	M	56	Indefinido	26	-	-	✓
7963	F	48	GH/TSH	18	-	-	✓
7964	M	17	PRL	25	✓	✓	✓
7965	M	51	PRL	12	-	-	✓
7966	M	31	PRL	<10	-	-	✓
7967	M	47	ACTH	>10	-	-	✓
7968	M	37	PRL	18	✓	✓	✓
7969	F	27	PRL	5,5	-	-	✓
7970	F	35	GH	25	✓	✓	✓
7971	F	22	GH/PRL/FSH	40	✓	✓	✓
7972	M	44	FSH/LH	30	-	-	✓
7973	F	44	GH	40	-	-	✓
7974	F	49	GH/FSH/PRL	40	-	-	✓
7975	M	69	Não secretor	50	-	-	✓
7976	M	81	Não secretor	34	-	-	✓
7977	M	64	Não secretor	45	-	-	✓
7978	M	76	Não secretor	17	-	-	✓
7980	M	60	PRL	>10	-	-	✓
7981	M	45	GH	-	-	-	✓
7982	F	36	GH	-	-	-	✓
7983	M	66	Não secretor	>10	-	-	✓
7984	M	52	GH	7	-	-	✓
7985	M	19	PRL	65	✓	✓	✓
7986	M	26	PRL	40	✓	✓	✓
7987	F	41	GH	14	-	-	✓
7988	F	62	PRL	23	-	-	✓
7989	M	45	PRL	18	-	-	✓

## 7.3. Anexos

Doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho de tumor (mm)	Estudo 2	Estudo 3	Estudo 4
7990	F	61	GH	12	-	-	✓
7991	M	51	GH/FSH/PRL	14	-	-	✓
7992	M	22	PRL	28	✓	✓	✓
7993	F	35	PRL	12	✓	✓	✓
7994	M	44	FSH/LH	<40	-	-	✓
7995	F	26	PRL	12	✓	✓	✓
7996	M	53	Misto	20	-	-	✓
7997	F	46	GH	12	-	-	✓
7998	F	42	PRL	18	-	-	✓
7999	M	51	ACTH	13	-	-	✓
8000	F	59	Não secretor	16	-	-	✓
8001	F	41	GH	20	-	-	✓
8002	M	25	PRL	20	✓	✓	✓
8003	M	31	GH/FSH/PRL	37	✓	✓	✓
8004	M	47	Não secretor	15	-	-	✓
8005	F	29	PRL	18	✓	✓	✓
8006	F	56	Não secretor	-	-	-	✓
8007	F	64	FSH/LH	24	-	-	✓
8008	M	69	GH	7	-	-	✓
8009	M	43	GH	8	-	-	✓
8010	F	71	Não secretor	18	-	-	✓
8011	M	47	Não secretor	33	-	-	✓
8012	F	60	GH	8	-	-	✓
8013	M	42	FSH/LH	18	-	-	✓
8014	F	21	PRL	14	✓	✓	✓
8015	F	75	Não secretor	>40	-	-	✓
8016	F	57	GH/TSH/FSH	>10	-	-	✓
8017	F	19	GH	<10	-	-	✓
8018	F	29	FSH/LH	38	✓	✓	✓
8019	M	41	PRL	13,6	-	-	✓
8020	F	48	ACTH	13	-	-	✓
8021	M	17	PRL	>10	✓	✓	✓
8022	M	30	GH	33	✓	✓	✓

Doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho de tumor (mm)	Estudo 2	Estudo 3	Estudo 4
8023	M	37	FSH/LH	31	✓	✓	✓
8024	F	22	PRL	10	✓	✓	✓
8025	F	27	GH	>10	✓	✓	✓
8026	M	15	GH	>10	✓	✓	✓
8027	M	63	PRL	>10	-	-	✓
8028	M	69	PRL	6	-	-	✓
8029	M	44	GH	<10	-	-	✓
8030	F	36	GH/PRL	26	✓	✓	✓
8031	M	58	PRL	>10	-	-	✓
8032	F	45	GH	>10	-	-	✓
8033	F	70	GH	>10	-	-	✓
8036	F	52	FSH/LH	>10	-	-	✓
8037	F	55	GH	39	-	-	✓
8038	M	70	Não secretor	15	-	-	✓
8039	F	48	Não secretor	13	-	-	✓
8040	F	44	FSH/LH	17	-	-	✓
8041	F	28	FSH/LH	22	✓	✓	✓
8042	F	19	PRL	9	-	-	✓
8043	M	49	GH	21	-	-	✓
8044	F	35	PRL	11	✓	✓	✓
8045	F	20	PRL	18	✓	✓	✓
8046	M	61	Não secretor	>10	-	-	✓
8047	F	5	Não secretor	26	✓	✓	✓
8048	M	46	ACTH	39	-	-	✓
8049	F	50	Não secretor	29	-	-	✓
8050	F	40	GH	8	-	-	✓
8051	M	18	PRL	47	✓	✓	✓
8052	M	64	ACTH	23	-	-	✓
8054	F	36	PRL	29	✓	✓	✓
8057	F	32	Não secretor	20	✓	✓	✓
8058	M	48	Não secretor	32	-	-	✓
8059	F	65	Não secretor	26	-	-	✓
8060	M	43	PRL	>10	-	-	✓

## 7.3. Anexos

Doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho de tumor (mm)	Estudo 2	Estudo 3	Estudo 4
8061	M	42	PRL	<10	-	-	✓
8062	F	76	Não secretor	21	-	-	✓
8066	F	19	ACTH	6	-	-	✓
8067	M	58	FSH/LH	35	-	-	✓
8068	M	50	Não secretor	23	-	-	✓
8069	M	46	PRL	40	-	-	✓
8070	M	68	Não secretor	21	-	-	✓
8071	F	41	FSH/LH	33	-	-	✓
8072	M	37	GH	>10	✓	✓	✓
8073	F	55	GH	11	-	-	✓
8074	F	50	GH	>10	-	-	✓
8075	F	17	PRL	>10	✓	✓	✓
8076	F	44	PRL	31	-	-	✓
8077	F	51	GH/PRL	16	-	-	✓
8078	M	33	PRL	20	✓	✓	✓
8079	F	36	ACTH	14	✓	✓	✓
8080	M	46	PRL	32	-	-	✓
8081	M	67	Não secretor	17	-	-	✓
8084	M	52	GH	7	-	-	✓
8085	F	58	GH	>10	-	-	✓
8086	M	46	GH	>10	-	-	✓
8087	M	51	ACTH	<10	-	-	✓
8088	M	56	GH	9	-	-	✓
8089	M	41	Não secretor	31	-	-	✓
8090	F	79	Não secretor	10,5	-	-	✓
8091	M	46	PRL	>10	-	-	✓
8092	F	40	GH	27	✓	✓	✓
8093	F	34	GH	22	✓	✓	✓
8094	F	40	PRL	31	✓	✓	✓
8095	F	33	Não secretor	40	✓	✓	✓
8096	F	58	GH	21	-	-	✓
8097	F	35	GH	20	✓	✓	✓
8098	M	60	PRL	>10	-	-	✓

<b>Doente (ID)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade de diagnóstico (anos)</b>	<b>Tipo de adenoma (hormonas produzidas)</b>	<b>Tamanho de tumor (mm)</b>	<b>Estudo 2</b>	<b>Estudo 3</b>	<b>Estudo 4</b>
8099	M	61	PRL	>40	-	-	✓
8100	F	75	GH	15	-	-	✓
8101	M	64	Não secretor	40	-	-	✓
8102	M	51	FSH/LH	41	-	-	✓
8103	M	63	Não secretor	29	-	-	✓
8104	F	46	Não secretor	39	-	-	✓
8105	M	47	GH	<10	-	-	✓
8106	F	59	GH	17	-	-	✓
8107	F	54	GH	7	-	-	✓
8108	M	52	Não secretor	56	-	-	✓
8111	F	30	PRL	6,5	-	-	✓
8112	F	18	PRL	<10	-	-	✓
8113	M	83	PRL	>10	-	-	✓
8114	M	72	PRL	>10	-	-	✓
8115	F	25	Não secretor	13	✓	✓	✓
8116	M	42	ACTH, FSH, PRL	2	-	-	✓
8117	M	55	FSH/LH	54	-	-	✓
8118	F	24	PRL	14	✓	✓	✓
8119	F	48	PRL	19	-	-	✓
8120	M	44	GH	25	-	-	✓
8121	M	32	PRL	12	✓	✓	✓
8122	F	43	GH	28	-	-	✓
8123	F	52	PRL	50	-	-	✓
8124	M	78	Não secretor	58	-	-	✓
8125	M	70	FSH/LH	38	-	-	✓
8126	F	32	GH	22	✓	✓	✓
8127	F	77	GH	26	-	-	✓
8128	M	38	ACTH	10	✓	✓	✓
8129	F	66	PRL	16,5	-	-	✓
8130	F	39	ACTH	14	✓	✓	✓
8131	F	24	Não secretor	22	✓	✓	✓
8132	F	43	ACTH	10	-	-	✓
8133	F	42	GH	24	-	-	✓

## 7.3. Anexos

Doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho de tumor (mm)	Estudo 2	Estudo 3	Estudo 4
8134	F	55	GH	<10	-	-	✓
8135	F	63	FSH/LH	36	-	-	✓
8136	M	50	PRL	34	-	-	✓
8137	M	46	FSH/LH	>10	-	-	✓
8138	F	47	PRL	<10	-	-	✓
8140	M	45	TSH	26	-	-	✓
8141	F	33	Não secretor	>10	✓	✓	✓
8142	F	52	GH	<10	-	-	✓
8143	F	51	GH	24	-	-	✓
8144	M	60	PRL	>10	-	-	✓
8145	F	59	Não secretor	>10	-	-	✓
8146	M	43	Não secretor	>10	-	-	✓
8147	F	30	GH	<10	-	-	✓
8148	M	51	Não secretor	>10	-	-	✓
8149	F	26	ACTH	>10	✓	✓	✓
8150	F	73	GH	14	-	-	✓
8151	F	50	PRL	9	-	-	✓
8152	F	27	GH	>10	✓	✓	✓
8153	F	57	Não secretor	>10	-	-	✓
8154	F	48	GH	>10	-	-	✓
8156	M	62	FSH/LH	23	-	-	✓
8157	F	64	ACTH	>40	-	-	✓
8158	M	37	GH	>10	✓	✓	✓
8159	M	56	GH	15	-	-	✓
8160	F	33	PRL	<10	-	-	✓
8161	F	49	GH	>10	-	-	✓
8162	F	48	Não secretor	21	-	-	✓
8163	M	24	GH	29	✓	✓	✓
8164	F	37	PRL	>10	✓	✓	✓
8165	F	74	Não secretor	30	-	-	✓
8166	M	64	Não secretor	14	-	-	✓
8167	F	29	Não secretor	28	✓	✓	✓
8168	F	39	Não secretor	21	✓	✓	✓

<b>Doente (ID)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade de diagnóstico (anos)</b>	<b>Tipo de adenoma (hormonas produzidas)</b>	<b>Tamanho de tumor (mm)</b>	<b>Estudo 2</b>	<b>Estudo 3</b>	<b>Estudo 4</b>
8170	F	38	ACTH	>10	✓	-	-
8174	F	14	Não secretor	8	-	-	✓
8175	M	70	PRL	30	-	-	✓
8176	F	87	Não secretor	>20	-	-	✓
8177	M	31	PRL	14	✓	✓	✓
8178	F	27	PRL	18	✓	✓	✓
8179	M	28	PRL	>40	✓	✓	✓
8180	F	40	PRL	11	✓	✓	✓
8181	F	15	Não secretor	16	✓	✓	✓
8182	F	30	PRL	15	✓	✓	✓
8183	F	40	GH	8	-	-	✓
8184	F	54	Não secretor	>10	-	-	✓
8185	F	58	Não secretor	16	-	-	✓
8186	F	28	PRL	<10	-	-	✓
8187	M	60	ACTH	>10	-	-	✓
8189	M	33	GH/FSH/LH	>10	✓	✓	✓
8190	M	31	GH	<10	-	-	✓
8191	M	52	Não secretor	50	-	-	✓
8193	F	30	GH	>10	✓	✓	✓
8194	F	70	Não secretor	>10	-	-	✓
8195	F	36	GH	>10	✓	✓	✓
8196	F	50	Não secretor	25	-	-	✓
8197	M	77	Não secretor	26	-	-	✓
8198	M	36	PRL	39	✓	✓	✓
8199	F	37	PRL	>10	✓	✓	✓
8200	M	68	Não secretor	21	-	-	✓
8201	F	48	Não secretor	>10	-	-	✓
8202	F	48	GH	>10	-	-	✓
8203	F	31	GH/PRL	30	✓	✓	✓
8204	M	38	GH	>10	✓	✓	✓
8205	M	76	Não secretor	30	-	-	✓
8206	M	35	GH/PRL	18	✓	✓	✓
8207	F	76	Não secretor	30	-	-	✓

## 7.3. Anexos

Doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho de tumor (mm)	Estudo 2	Estudo 3	Estudo 4
8208	M	17	GH	>10	✓	✓	✓
8209	M	30	PRL	7	-	-	✓
8210	M	76	PRL	16	-	-	✓
8211	F	72	FSH/LH	40	-	-	✓
8212	F	29	PRL	20	✓	✓	✓
8213	M	20	Misto	>10	✓	✓	✓
8215	F	20	GH	20	✓	✓	✓
8216	F	33	Não secretor	20	✓	✓	✓
8217	M	67	PRL	8	-	-	✓
8218	M	37	Não secretor	25	✓	✓	✓
8219	M	65	GH	12	-	-	✓
8220	F	61	GH	19	-	-	✓
8221	M	39	Não secretor	28	✓	✓	✓
8222	M	53	GH	17	-	-	✓
8223	M	44	PRL	20	-	-	✓
8224	F	45	GH	>10	-	-	✓
8225	M	69	ACTH	39	-	-	✓
8226	M	28	PRL	14	✓	✓	✓
8227	M	32	Não secretor	>10	✓	✓	✓
8232	F	40	GH	-	-	-	✓
8233	M	37	Não secretor	29	✓	✓	✓
8234	F	36	Misto	38	✓	✓	✓
8235	F	36	Não secretor	22	✓	✓	✓
8236	F	44	GH	>10	-	-	✓
8237	M	25	PRL	>30	✓	✓	✓
8238	F	22	PRL	30	✓	✓	✓
8239	M	29	GH	26	✓	✓	✓
8240	F	45	Indefinido	10	-	-	✓
8241	M	37	Não secretor	12	✓	✓	✓
8242	M	48	PRL	>10	-	-	✓
8243	F	34	ACTH	10	✓	✓	✓
8244	F	51	Não secretor	8	-	-	✓
8245	F	18	PRL	15	✓	✓	✓

<b>Doente (ID)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade de diagnóstico (anos)</b>	<b>Tipo de adenoma (hormonas produzidas)</b>	<b>Tamanho de tumor (mm)</b>	<b>Estudo 2</b>	<b>Estudo 3</b>	<b>Estudo 4</b>
8246	F	49	Não secretor	27	-	-	✓
8248	F	44	Não secretor	4	-	-	✓
8249	F	41	GH	21	-	-	✓
8250	M	39	Não secretor	>10	✓	✓	✓
8251	F	62	Não secretor	>10	-	-	✓
8253	M	16	PRL	26	✓	✓	✓
8258	F	58	FSH/LH	>10	-	-	✓
8259	F	19	GH	>10	✓	✓	✓
8260	M	61	PRL	19	-	-	✓
8261	M	33	Não secretor	>10	✓	✓	✓
8262	F	33	PRL	>10	✓	✓	✓
8264	M	68	FSH/LH	56	-	-	✓
8265	M	34	Indefinido	>10	✓	✓	✓
8266	M	33	PRL	>10	✓	✓	✓
8267	M	55	Não secretor	32	-	-	✓
8268	M	63	FSH/LH	24	-	-	✓
8269	M	64	PRL	22	-	-	✓
8270	M	52	PRL	31	-	-	✓
8271	M	62	FSH/LH	18	-	-	✓
8272	M	63	FSH/LH	>10	-	-	✓
8273	M	54	FSH/LH	44	-	-	✓
8274	F	67	FSH/LH	27	-	-	✓
8275	F	47	Não secretor	>10	-	-	✓
8278	M	36	FSH/LH	41	✓	✓	✓
8282	M	39	GH	>10	✓	✓	✓
8294	F	26	Não secretor	20	✓	✓	✓
8295	M	43	PRL	28	-	-	✓
8296	M	27	GH	18	✓	✓	✓
8298	M	36	Não secretor	20	✓	✓	✓
8304	M	28	FSH/LH	30	✓	✓	✓
8306	F	28	GH/PRL	20	✓	✓	✓
8307	F	42	GH/PRL	12	-	-	✓
8308	M	54	GH	12	-	-	✓

## 7.3. Anexos

Doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho de tumor (mm)	Estudo 2	Estudo 3	Estudo 4
8309	F	19	PRL	>10	✓	✓	-
8310	F	25	PRL	33	✓	✓	✓
8313	M	18	PRL	>10	✓	✓	✓
8315	M	34	PRL	59	✓	✓	-
8317	M	73	Não secretor	26	-	-	✓
8319	F	24	GH	>10	✓	✓	✓
8320	F	22	PRL	12	✓	✓	✓
8321	M	31	GH/PRL	9	-	-	✓
8323	M	43	GH	25	-	-	✓
8324	F	56	GH	13	-	-	✓
8327	F	46	ACTH	11	-	-	✓
8329	M	80	PRL	15	-	-	✓
8330	F	28	ACTH	11	✓	✓	-
8331	M	34	PRL	69	✓	✓	-
8332	F	29	PRL	7	-	-	✓
8333	M	76	Não secretor	12	-	-	✓
8338	M	50	PRL	20	-	-	✓
8339	F	38	PRL	4	-	-	✓
8340	F	38	ACTH	>10	-	✓	-
8342	F	36	ACTH	15	✓	✓	-
8343	F	27	GH	>10	-	✓	-
8360	F	29	PRL	15	-	✓	-
8430	M	35	PRL	45	-	✓	-
8458	M	27	Misto	22	-	✓	-
8461	F	37	Não secretor	27	-	✓	-
8462	M	27	Não secretor	>10	-	✓	-
8467	M	25	Não secretor	18	-	✓	-
8471	M	38	PRL	39	-	✓	-

id, identificação; F, mulher; M, homem; ACTH, hormona adrenocorticotrópica; FSH, hormona foliculo-estimulante; GH, hormona do crescimento; LH, hormona luteinizante; NFPA, adenomas hipofisários não funcionais; PRL, prolactina; TSH, hormona estimulante da tiroide; mm, milímetros

## Anexo 4– Primers usados para PCR e Sequenciação de Sanger

Os primers usados na amplificação do gene *AIP* foram publicados por Cazabat *et al*, (236).

Nome do Primer <i>AIP</i>	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de annealing	Exão	Tamanho do produto (pb)
1F 1R	AACCAATCACCATCCGTTTC GTCGAGTTCTGCATGTGAGC	1,5mM Mg + 56°C	1	397
2F 2R	GGAGGATGAAGCCAGGTGTA CCCTGGGGATAGGGAATAGG	1,5mM Mg + 56°C	2	392
3F 3R	AACGGAGTAGGGTCCCAGTT GGTCCTGCACAGTTTTCTT	1,5mM Mg + 56°C	3	472
4F 4R	CTCTGCTGCTGGTGTGTGAT AGCGGGGAGAAGCTGTAGAC	1,5mM Mg + 56°C	4	397
5F 5R	GCTGCTGCCAAGTACTACGA GGGGTTGTGAAAGGCTAGGT	1,5mM Mg + 56°C	5	282
6F 6R	ATGGTGCCAGGAGACATGA AACAGCCACCCAAGTACCAG	1,5mM Mg + 56°C	6	477

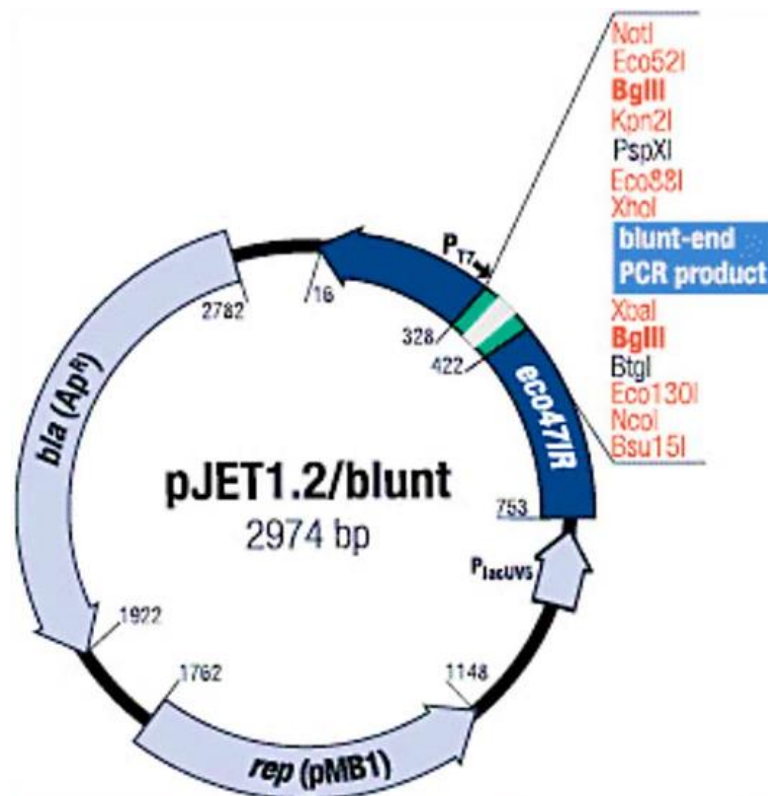
Primers usados para confirmação de variantes patogênicas e provavelmente patogênicas, por Sequenciação de Sanger.

Variante	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de annealing	Tamanho do produto (pb)
CDH23: p.Glu252oLys	F: CACTGTGCCAAGGATCTAGGA R: GCAGTGGGAGCAGGAGAG	1,5mM Mg + 56°C	526
MEN1: p.Trp183Ter	F: AAAGGGAGTGGGAGGGAGT R: GTGGCCCAAGAAAATGGAGT	1,5mM Mg + 55°C	388
MEN1: p.Arg314_Asp315del	F: CTTCTGTGGCCCCTTCT R: ACTGCTGGATGATGGTGGTT	1,5mM Mg + 61°C	499
MSH2: p.Arg524His	F: TATCAAGGCTTGGACCCTGG R: ACAAAGAATGGTGAGACGAGGT	1,5mM Mg + 56°C	402
PMS2: p.Asn335Ser	F: CTAGGCGACAGAGTGAGACG R: CTTCAACATCCAGCAGTGCC	1,5mM Mg + 56°C	253
PMS2: p.Asp486GlufsTer109	F: TGCAGCGGATTTGAAAAAGC R: GAGTCCACATGTTCTGCGA	1,5mM Mg + 56°C	441
SDHB: p.Ile127Leu	F: TGATTCCGGATATGGGTGAG R: AACAAATCCTGCCCTGAAAA	1,5mM Mg + 55°C	277

#### 7.4. Anexos

TP53: p.Arg282Gln	F:TGGGAGTAGATGGAGCCTGG R:TGTCCTGCTTGCTTACCTCG	1,5mM Mg + 56°C	243
VHL: p.Glu52Ter	F: GAGTACGGCCCTGAAGAAGA R: CCGTCGAAGTTGAGCCATAC	1,5mM Mg + 55°C	215
VHL: p.Lys196Glu	F: GTTGTCGGGAGCCTAGTCAA R: AAGGAAGGAACCAGTCCTGT	1,5mM Mg + 55°C	238

## Anexo 5 – Vetor de clonagem pJET1.2/blunt





## **Anexo 6 – “A Common Variant in the *CDK8* Gene Is Associated with Sporadic Pituitary Adenomas in the Portuguese Population: A Case-Control Study”**

*International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 11749

(DOI: 10.3390/ijms231911749)

Leonor M. Gaspar<sup>1</sup>, Catarina I. Gonçalves<sup>1</sup>, Fernando Fonseca<sup>2</sup>, Davide Carvalho<sup>3</sup>, Luísa Cortez<sup>2</sup>, Ana Palha<sup>2</sup>, Inês F. Barros<sup>4</sup>, Ema Nobre<sup>5</sup>, João S. Duarte<sup>6</sup>, Cláudia Amaral<sup>7</sup>, Maria J. Bugalho<sup>5</sup>, Olinda Marques<sup>4</sup>, Bernardo D. Pereira<sup>8</sup>, Manuel C. Lemos<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> CICS-UBI, Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6200-506 Covilhã, Portugal

<sup>2</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Curry Cabral, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, 1050-099 Lisboa, Portugal

<sup>3</sup> Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Centro Hospitalar de São João, Faculdade de Medicina e Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto, 4200-319 Porto, Portugal

<sup>4</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Braga, 4710-243 Braga, Portugal

<sup>5</sup> Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, 1649-028 Lisboa, Portugal

<sup>6</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Egas Moniz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, 1349-019 Lisboa, Portugal

<sup>7</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Santo António, Centro Hospitalar Universitário do Porto, 4099-001 Porto, Portugal

<sup>8</sup> Serviço de Endocrinologia e Nutrição, Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada, 9500-782 Ponta Delgada, Portugal

\* Correspondence: [mclemos@fcsaude.ubi.pt](mailto:mclemos@fcsaude.ubi.pt)

Manuel C. Lemos

CICS-UBI, Health Sciences Research Centre

University of Beira Interior

6200-506 Covilhã, Portugal

Email: [mclemos@fcsaude.ubi.pt](mailto:mclemos@fcsaude.ubi.pt)

ORCID ID 0000-0001-9326-8900



## Article

# A Common Variant in the *CDK8* Gene Is Associated with Sporadic Pituitary Adenomas in the Portuguese Population: A Case-Control Study

Leonor M. Gaspar<sup>1</sup>, Catarina I. Gonçalves<sup>1</sup> , Fernando Fonseca<sup>2</sup>, Davide Carvalho<sup>3</sup> , Luísa Cortez<sup>2</sup>, Ana Palha<sup>2</sup>, Inês F. Barros<sup>4</sup> , Ema Nobre<sup>5</sup>, João S. Duarte<sup>6</sup>, Cláudia Amaral<sup>7</sup> , Maria J. Bugalho<sup>5</sup> , Olinda Marques<sup>4</sup>, Bernardo D. Pereira<sup>8</sup> and Manuel C. Lemos<sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> CICS-UBI, Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6200-506 Covilhã, Portugal
  - <sup>2</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Curry Cabral, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, 1050-099 Lisboa, Portugal
  - <sup>3</sup> Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Centro Hospitalar de São João, Faculdade de Medicina e Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto, 4200-319 Porto, Portugal
  - <sup>4</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Braga, 4710-243 Braga, Portugal
  - <sup>5</sup> Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, 1649-028 Lisboa, Portugal
  - <sup>6</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Egas Moniz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, 1349-019 Lisboa, Portugal
  - <sup>7</sup> Serviço de Endocrinologia, Hospital de Santo António, Centro Hospitalar Universitário do Porto, 4099-001 Porto, Portugal
  - <sup>8</sup> Serviço de Endocrinologia e Nutrição, Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada, 9500-782 Ponta Delgada, Portugal
- \* Correspondence: mclemos@fcsaude.ubi.pt



**Citation:** Gaspar, L.M.; Gonçalves, C.I.; Fonseca, F.; Carvalho, D.; Cortez, L.; Palha, A.; Barros, I.F.; Nobre, E.; Duarte, J.S.; Amaral, C.; et al. A Common Variant in the *CDK8* Gene Is Associated with Sporadic Pituitary Adenomas in the Portuguese Population: A Case-Control Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11749. <https://doi.org/10.3390/ijms231911749>

Academic Editors: Tatiana Fiordeliso and María Inés Pérez-Millán

Received: 2 September 2022

Accepted: 1 October 2022

Published: 4 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The majority of pituitary adenomas occur in a sporadic context, and in the absence of known genetic predisposition. Three common variants at the *NEBL* (rs2359536), *PCDH15* (rs10763170) and *CDK8* (rs17083838) loci were previously associated with sporadic pituitary adenomas in the Han Chinese population, but these findings have not yet been replicated in any other population. The aim of this case-control study was to assess if these variants are associated with susceptibility to sporadic pituitary adenomas in the Portuguese population. Genotype and allele frequencies were determined in 570 cases and in 546 controls. The *CDK8* rs17083838 minor allele (A allele) was significantly associated with sporadic pituitary adenomas, under an additive (odds ratio (OR) 1.73, 95% confidence interval (CI) 1.19–2.50,  $p = 0.004$ ) and dominant (OR 1.82, 95% CI 1.24–2.68,  $p = 0.002$ ) inheritance model. The *NEBL* rs2359536 and *PCDH15* rs10763170 variants were not associated with the overall risk for the disease, although a borderline significant association was observed between the *PCDH15* rs10763170 minor allele (T allele) and somatotrophinomas (dominant model, OR 1.55, 95% CI 1.02–2.35,  $p = 0.035$ ). These findings suggest that the *CDK8* rs17083838 variant, and possibly the *PCDH15* rs10763170 variant, may increase susceptibility to sporadic pituitary adenomas in the Portuguese population.

**Keywords:** pituitary adenoma; *NEBL*; nebulette; *PCDH15*; protocadherin-related 15; *CDK8*; cyclin dependent kinase 8; SNP; single nucleotide polymorphism; genetic susceptibility

## 1. Introduction

Pituitary adenomas, also referred to as pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs), are the most common intracranial neoplasias [1]. Although usually benign, pituitary adenomas are associated with increased morbidity and mortality via hormone overproduction and mass effects resulting from compression of structures adjacent to the tumor [2]. Depending on the hormone expressed by the tumor cells, pituitary adenomas can be

divided into non-functioning adenomas, prolactinomas, somatotrophinomas, corticotrophinomas, gonadotrophinomas and thyrotrophinomas [2].

The mechanisms underlying pituitary tumorigenesis are still largely unknown. A small proportion of tumors (~5%) are due to germline mutations, as part of syndromic diseases or as familial isolated pituitary adenomas [3,4]. These tumors are usually more aggressive, may present at a younger age, have a larger tumor size, show increased invasiveness, and are often resistant to standard treatments [5]. However, the vast majority of pituitary adenomas (~95%) occur in a sporadic context, in the absence of known genetic predisposition, and are likely to occur due to acquired somatic and epigenetic mutations [6].

A genome-wide association study (GWAS) in the Han Chinese population [7] identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) at three independent loci (rs2359536 at 10p12.31, rs10763170 at 10q21.1 and rs17083838 at 13q12.13) that were significantly associated with sporadic pituitary adenomas. The genes around these susceptibility loci, namely the nebulin (*NEBL*), protocadherin-related 15 (*PCDH15*) and cyclin dependent kinase 8 (*CDK8*), are involved in cell–cell adhesion and regulation of cell cycle progression [7]. However, it is still uncertain if and how these loci are involved in pituitary tumorigenesis. Although the association with these variants was highly significant in the Han Chinese population, these results have not yet been confirmed in any other population.

The aim of this study was to investigate whether the *NEBL* rs2359536, *PCDH15* rs10763170 and *CDK8* rs17083838 SNPs are associated with the susceptibility to sporadic pituitary adenomas in the Portuguese population.

## 2. Results

The *NEBL* rs2359536, *PCDH15* rs10763170 and *CDK8* rs17083838 genotype and allele frequencies observed in the cases and controls are presented in Table 1. The observed genotype frequencies did not deviate from the Hardy–Weinberg equilibrium (data not shown), which would otherwise suggest selection bias, population stratification or genotyping errors. The *CDK8* rs17083838 minor allele (A allele) was significantly associated with overall sporadic pituitary adenomas under an additive (odds ratio (OR) 1.73, 95% confidence interval (CI) 1.19–2.50,  $p = 0.004$ ) and dominant (OR 1.82, 95% CI 1.24–2.68,  $p = 0.002$ ) inheritance model (Table 1). These associations remained statistically significant, even after applying the conservative Bonferroni correction ( $p < 0.0167$ ). For the *NEBL* rs2359536 and *PCDH15* rs10763170 SNPs, no significant differences between cases and controls were observed.

In the analysis based on tumor subtype, the *PCDH15* rs10763170 minor allele (T allele) was associated with somatotrophinomas under a dominant inheritance model (OR 1.55, 95% CI 1.02–2.35,  $p = 0.035$ ) (Table 2); however, this association was no longer significant after applying the Bonferroni correction. For the remaining tumor subtypes and sizes, no associations were observed (data not shown).

**Table 1.** Distribution of *NEBL*, *PCDH15* and *CDK8* genotypes and alleles in sporadic pituitary adenomas and controls.

<i>NEBL</i> rs2359536		Cases, n (%)	Controls, n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i> Value	Adjusted OR (95% CI) †	Adjusted <i>p</i> Value †
Genotypes	TT	225 (39.5)	213 (39.0)	0.94 (0.66–1.32) ¶	0.71	0.89 (0.63–1.27) ¶	0.53
	TC	271 (47.5)	258 (47.3)				
	CC	74 (13.0)	75 (13.7)				
Alleles	T	721 (63.2)	684 (62.6)	0.97 (0.82–1.16) §	0.76	0.95 (0.80–1.13) §	0.57
	C	419 (36.8)	408 (37.4)				
<i>PCDH15</i> rs10763170		Cases, n (%)	Controls, n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i> Value	Adjusted OR (95% CI) †	Adjusted <i>p</i> Value †
Genotypes	CC	184 (32.3)	180 (33.0)	0.86 (0.64–1.15) ¶	0.30	0.86 (0.64–1.15) ¶	0.31
	CT	276 (48.4)	247 (45.2)				
	TT	110 (19.3)	119 (21.8)				
Alleles	C	644 (56.5)	607 (55.6)	0.97 (0.82–1.14) §	0.67	0.96 (0.81–1.13) §	0.62
	T	496 (43.5)	485 (44.4)				

Table 1. Cont.

<i>CDK8</i> rs17083838		Cases, n (%)	Controls, n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i> Value	Adjusted OR (95% CI) †	Adjusted <i>p</i> Value †
Genotypes	GG	487 (85.4)	498 (91.2)				
	GA	82 (14.4)	46 (8.4)	1.77 (1.21–2.58) ‡	0.003	1.82 (1.24–2.68) ‡	0.002
	AA	1 (0.2)	2 (0.4)				
Alleles	G	1056 (92.6)	1042 (95.4)				
	A	84 (7.3)	50 (4.6)	1.67 (1.16–2.41) §	0.005	1.73 (1.19–2.50) §	0.004

n, number; OR, odds ratio; CI, confidence interval. † adjusted for sex and age; ‡ recessive model; † dominant model; § log-additive model.

Table 2. Distribution of *PCDH15* genotypes and alleles in somatotrophinomas and all other tumors.

<i>PCDH15</i> rs10763170		Somatotrophinomas, n (%)	All Other Tumors, n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i> Value	Adjusted OR (95% CI) †	Adjusted <i>p</i> Value †
Genotypes	CC	41 (25.5)	138 (34.6)				
	CT	85 (52.8)	193 (48.4)	1.55 (1.03–2.33) ‡	0.036	1.55 (1.02–2.35) ‡	0.035
	TT	35 (21.7)	68 (17.0)				
Alleles	C	167 (51.9)	469 (58.8)				
	T	155 (48.1)	329 (41.2)	1.32 (1.02–1.72) §	0.035	1.31 (1.00–1.71) §	0.046

n, number; OR, odds ratio; CI, confidence interval. † adjusted for sex and age; ‡ dominant model; § log-additive model.

The combined number of *NEBL*, *PCDH15* and *CDK8* minor (risk) alleles that each individual harbored was not significantly associated with the risk of pituitary adenomas (Table 3).

Table 3. Distribution of combinations of minor (risk) alleles.

Number of Minor Alleles	Cases, n (%)	Controls, n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i> Value
0	56 (9.8)	60 (11.0)		
1	180 (31.6)	176 (32.2)		
2	208 (36.5)	187 (34.2)		
3	102 (17.9)	102 (18.7)		
4	23 (4.0)	18 (3.3)		
5	1 (0.2)	3 (0.6)		
6	0 (0.0)	0 (0.0)		
2 or less	444 (77.9)	423 (77.5)		
3 or more	126 (22.1)	123 (22.5)	0.98 (0.74–1.29)	0.866

n, number; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

### 3. Discussion

This case-control study revealed an increased frequency of the *CDK8* rs17083838 minor allele (A allele) in patients diagnosed with sporadic pituitary adenomas. Individuals with genotypes containing at least one minor (A) allele were associated with 1.82 times greater risk for sporadic pituitary adenomas, compared to individuals with the homozygous GG genotype (dominant inheritance model, OR 1.82, 95% CI 1.24–2.68,  $p = 0.002$ ). These results suggest that this genetic variant, which was identified as a risk locus in a previous GWAS [7], is also a susceptibility variant for sporadic pituitary adenomas in the Portuguese population.

To date, there are no functional studies of the rs17083838 polymorphism, so it remains unclear by which mechanism this polymorphism influences the pathogenesis of pituitary adenomas. The rs17083838 polymorphism is located in the first intron of the *CDK8* gene, which is overexpressed in several cancers [8]. This gene encodes cyclin-dependent kinase 8 (CDK8), which belongs to the cyclin-dependent protein family that includes important regulators involved in cell cycle progression [8]. The CDK8 protein interacts with E2F1,

protecting  $\beta$ -catenin from the inhibitory effect of E2F1, enabling its interaction with Wnt proteins [9]. The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is important during development, regulates several aspects of cell proliferation, differentiation, and cell survival [10], and has been shown to be up-regulated in pituitary adenomas [11,12]. Furthermore, studies of animal models of pituitary tumors have shown that several target genes of CDK8 are differentially expressed in these tumors, suggesting a role of this kinase in pituitary tumorigenesis [13].

The *NEBL* rs2359536 (T > C) and *PCDH15* rs10763170 (C > T) variants were not found to be associated with overall sporadic pituitary adenomas in our study, despite their reported association in the Han Chinese population [7]. However, the *PCDH15* rs10763170 minor allele (T allele) presented a near-significant association with somatotrophinomas (dominant inheritance model, OR 1.55, 95% CI 1.02–2.35,  $p = 0.035$ ). The rs10763170 polymorphism is located upstream of the *PCDH15* gene that encodes protocadherin-related 15. This protein is a member of the cadherin superfamily that is involved in cell–cell adhesion, morphogenesis, cell recognition and signaling [14], and in the development and progression of many cancers [15]. *PCDH15* is best known for its role in hereditary hearing loss (Usher syndrome type 1F) [16]. However, reduced expression of *PCDH15* has been shown to enhance oligodendrocyte progenitor cell proliferation and progression of gliomas [17]. Most importantly, *PCDH15* has been shown to interact with cadherin-related 23 (CDH23) [18], which has been implicated in sporadic and familial forms of pituitary tumors [19]. Further studies are needed to determine whether *PCDH15* is also involved in pituitary tumorigenesis.

The exact mechanisms through which these SNPs contribute to the tumorigenesis of pituitary adenomas are still unknown. These genetic variants are located in non-coding regions, and it is presently unknown if they have a direct effect on gene expression or if they are in linkage disequilibrium with other nearby functional variants. Additional studies will be needed, to determine the functional consequences of these SNPs.

Our results partially validate those obtained by the GWAS in the Han Chinese population [7]. It remains to be determined if the observed associations can also be replicated in other European and non-European populations, with different environmental exposures and genetic profiles. In addition, studies with larger sample sizes may help to clarify if the associations are stronger with specific tumor subtypes.

In conclusion, our data suggest that the *CDK8* rs17083838 variant, and possibly the *PCDH15* rs10763170 variant, may increase susceptibility to sporadic pituitary adenomas in the Portuguese population. These findings may contribute to a better understanding of the genetic etiology of sporadic pituitary adenomas.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Subjects

The study was designed as a retrospective case-control association study. Cases comprised 570 patients with sporadic pituitary adenomas (275 males and 295 females; mean age at diagnosis  $\pm$  standard deviation (SD) =  $43.5 \pm 16.3$  years), recruited consecutively at endocrinology outpatient clinics in Portugal. Tumor classification was based on histological examination or, in the case of prolactinomas, by clinical, hormonal and radiological examination. Tumor subtypes were somatotrophinoma ( $n = 161$ ), prolactinoma ( $n = 154$ ), non-functioning ( $n = 138$ ), gonadotrophinoma ( $n = 40$ ), corticotrophinoma ( $n = 35$ ), thyrotrophinoma ( $n = 4$ ), mixed ( $n = 28$ ) and undetermined ( $n = 10$ ). Tumor size was based on the largest diameter, and was classified as macroadenoma ( $\geq 1$  cm,  $n = 483$ ), microadenoma ( $< 1$  cm,  $n = 65$ ) and undetermined ( $n = 22$ ). The control group comprised 546 unrelated healthy blood donors (264 males and 282 females; mean age  $\pm$  SD =  $38.1 \pm 12.1$  years), recruited at blood donation centers, with no known clinical history of pituitary disease, and originating from the same geographical regions as the patients. All the subjects were Caucasian Portuguese. Written informed consent was obtained from all the subjects, and the study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior (Ref: CE-UBI-Pj-2018-027).

#### 4.2. Genetic Studies

The NEBL rs2359536, PCDH15 rs10763170 and CDK8 rs17083838 were selected for this study, as they had been demonstrated to be among those variants most strongly associated with sporadic pituitary adenomas in a previous GWAS [7]. Minor allele frequencies (MAFs) reported in the Genome Aggregation Database (gnomAD) [20] for Non-Finnish Europeans were 0.337 (rs2359536 allele C), 0.409 (rs10763170 allele T) and 0.059 (rs17083838 allele A), respectively. Venous blood samples were collected from each subject, and genomic deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted from peripheral blood leukocytes, using the previously described methods [21]. Genotyping of the rs2359536, rs10763170 and rs17083838 SNPs was performed by a SNP genotyping assay with commercially available TaqMan probes (Assay ID: C-1974242-10 for rs2359536; Assay ID: C-411660-10 for rs10763170 and Assay ID: C-34697393-10 for rs17083838; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. The genotyping methods were validated by DNA sequencing of representative samples for each genotype (STAB VIDA, Caparica, Portugal; and ABI 3730XL, Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

#### 4.3. Statistical Analysis

The genotype and allele frequencies in the cases and controls were compared by chi-square tests and logistic regression analysis, to obtain odds ratios (ORs), 95% confidence intervals (CIs) and two-tailed *p*-values, using the SNP association tool SNPStats [22]. The analysis was adjusted for sex and age, to account for any effect of these variables on genotype and allele frequencies. The Hardy–Weinberg equilibrium of cases and controls was assessed by comparing the observed and allele-based expected genotype frequencies using SNPStats [22]. The best model of inheritance for each SNP (dominant, recessive, codominant or additive) was selected using Akaike's Information Criterion (AIC) [22]. Subgroup analysis was carried out to assess the effect of the three polymorphisms on tumor subtype (each subtype vs. all others) and size (<1 vs. ≥1 cm of diameter). To determine the cumulative effect of minor (risk) alleles, each individual was classified as having zero, one or two minor alleles for each of the three SNPs. The total number of minor alleles per individual (ranging from a minimum of zero to a maximum of six) was then compared between cases and controls using a two-tailed chi-square test. A Bonferroni correction for multiple comparisons was used to correct statistical significance, which was set at  $p < 0.0167$  ( $p < 0.05$ , divided by the number of analyzed SNPs). Power calculation was carried out using the software Power and Sample Size Calculations (version 3.1.6, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA) [23]. Assuming minor allele frequencies of 34%, 41% and 6% it was estimated that the study sample was sufficient to detect ORs of 1.279 (rs2359536), 1.270 (rs10763170) and 1.576 (rs17083838), respectively, under an additive model of inheritance, with an estimated power of 0.8 and a type 1 error probability of 0.05.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.C.L.; methodology, L.M.G. and C.I.G.; formal analysis, L.M.G.; investigation, L.M.G.; resources, F.F., D.C., L.C., A.P., I.F.B., E.N., J.S.D., C.A., M.J.B., O.M. and B.D.P.; writing—original draft preparation, L.M.G.; writing—review and editing, C.I.G., F.F., D.C., L.C., A.P., I.F.B., E.N., J.S.D., C.A., M.J.B., O.M., B.D.P. and M.C.L.; supervision, C.I.G. and M.C.L.; project administration, M.C.L.; funding acquisition, M.C.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT), project grants PTDC/MEC-MET/29489/2017 and UIDB/00709/2020. L.M.G. was the recipient of a PhD fellowship from FCT (SFRH/BD/147160/2019).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, Portugal (reference CE-UBI-Pj-2018-027, approved 12 June 2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Acknowledgments:** We are grateful to the following clinicians for collecting patient samples and clinical data: Ana Agapito (Lisboa), Ana Monteiro (Braga), Catarina Saraiva (Lisboa), Daniela Cavaco (Lisboa), Hélder Simões (Lisboa), Inês Damásio (Lisboa), Isabel Inácio (Porto), Joana Pereira (Lisboa), Maria Manuel Silva (Porto), Maria Salomé (Lisboa), Mariana Barbosa (Braga), Sara Donato (Lisboa), Sara Pinheiro (Lisboa), Sílvia Paredes (Braga), Teresa Martins (Coimbra), Teresa Rego (Lisboa), Tiago Silva (Lisboa), Valeriano Leite (Lisboa).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

- Daly, A.F.; Beckers, A. The Epidemiology of Pituitary Adenomas. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **2020**, *49*, 347–355. [CrossRef] [PubMed]
- Araujo-Castro, M.; Berrocal, V.R.; Pascual-Corrales, E. Pituitary tumors: Epidemiology and clinical presentation spectrum. *Hormones* **2020**, *19*, 145–155. [CrossRef] [PubMed]
- Spada, A.; Mantovani, G.; Lania, A.G.; Treppiedi, D.; Mangili, F.; Catalano, R.; Carosi, G.; Sala, E.; Peverelli, E. Pituitary Tumors: Genetic and Molecular Factors Underlying Pathogenesis and Clinical Behavior. *Neuroendocrinology* **2022**, *112*, 15–33. [CrossRef] [PubMed]
- Coopmans, E.C.; Korbonits, M. Molecular genetic testing in the management of pituitary disease. *Clin. Endocrinol.* **2022**. [CrossRef]
- Denes, J.; Korbonits, M. The clinical aspects of pituitary tumour genetics. *Endocrine* **2021**, *71*, 663–674. [CrossRef]
- Chang, M.; Yang, C.; Bao, X.; Wang, R. Genetic and Epigenetic Causes of Pituitary Adenomas. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 596554. [CrossRef]
- Ye, Z.; Li, Z.; Wang, Y.; Mao, Y.; Shen, M.; Zhang, Q.; Li, S.; Zhou, L.; Shou, X.; Chen, J.; et al. Common variants at 10p12.31, 10q21.1 and 13q12.13 are associated with sporadic pituitary adenoma. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 793–797. [CrossRef]
- Wu, D.; Zhang, Z.; Chen, X.; Yan, Y.; Liu, X. Angel or Devil?—CDK8 as the new drug target. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *213*, 113043. [CrossRef]
- Morris, E.J.; Ji, J.Y.; Yang, F.; Di Stefano, L.; Herr, A.; Moon, N.S.; Kwon, E.J.; Haigis, K.M.; Naar, A.M.; Dyson, N.J. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature* **2008**, *455*, 552–556. [CrossRef]
- Clevers, H.; Nusse, R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* **2012**, *149*, 1192–1205. [CrossRef]
- Chambers, T.J.; Giles, A.; Brabant, G.; Davis, J.R. Wnt signalling in pituitary development and tumorigenesis. *Endocr. Relat. Cancer* **2013**, *20*, R101–R111. [CrossRef]
- Elston, M.S.; Gill, A.J.; Conaglen, J.V.; Clarkson, A.; Shaw, J.M.; Law, A.J.; Cook, R.J.; Little, N.S.; Clifton-Bligh, R.J.; Robinson, B.G.; et al. Wnt pathway inhibitors are strongly down-regulated in pituitary tumors. *Endocrinology* **2008**, *149*, 1235–1242. [CrossRef] [PubMed]
- Bernard, V.; Villa, C.; Auguste, A.; Lamothe, S.; Guillou, A.; Martin, A.; Caburet, S.; Young, J.; Veitia, R.A.; Binart, N. Natural and molecular history of prolactinoma: Insights from a Prlr(-/-) mouse model. *Oncotarget* **2018**, *9*, 6144–6155. [CrossRef] [PubMed]
- Gul, I.S.; Hulpiau, P.; Saeyns, Y.; van Roy, F. Evolution and diversity of cadherins and catenins. *Exp. Cell Res.* **2017**, *358*, 3–9. [CrossRef] [PubMed]
- Kaszak, I.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Niewiadomska, Z.; Dworecka-Kaszak, B.; Ngosa Toka, F.; Jurka, P. Role of Cadherins in Cancer—A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7624. [CrossRef]
- Ahmed, Z.M.; Riazuddin, S.; Bernstein, S.L.; Ahmed, Z.; Khan, S.; Griffith, A.J.; Morell, R.J.; Friedman, T.B.; Riazuddin, S.; Wilcox, E.R. Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, *69*, 25–34. [CrossRef]
- Zhen, Y.; Cullen, C.L.; Ricci, R.; Summers, B.S.; Rehman, S.; Ahmed, Z.M.; Foster, A.Y.; Emery, B.; Gasperini, R.; Young, K.M. Protocadherin 15 suppresses oligodendrocyte progenitor cell proliferation and promotes motility through distinct signalling pathways. *Commun. Biol.* **2022**, *5*, 511. [CrossRef]
- Kazmierczak, P.; Sakaguchi, H.; Tokita, J.; Wilson-Kubalek, E.M.; Milligan, R.A.; Muller, U.; Kachar, B. Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature* **2007**, *449*, 87–91. [CrossRef]
- Zhang, Q.; Peng, C.; Song, J.; Zhang, Y.; Chen, J.; Song, Z.; Shou, X.; Ma, Z.; Peng, H.; Jian, X.; et al. Germline Mutations in CDH23, Encoding Cadherin-Related 23, Are Associated with Both Familial and Sporadic Pituitary Adenomas. *Am. J. Hum. Genet.* **2017**, *100*, 817–823. [CrossRef]
- Karczewski, K.J.; Francioli, L.C.; Tiao, G.; Cummings, B.B.; Alfoldi, J.; Wang, Q.; Collins, R.L.; Laricchia, K.M.; Ganna, A.; Birnbaum, D.P.; et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* **2020**, *581*, 434–443. [CrossRef]
- Lemos, M.C.; Regateiro, F.J. N-acetyltransferase genotypes in the Portuguese population. *Pharmacogenetics* **1998**, *8*, 561–564. [CrossRef] [PubMed]

## 7.6. Anexos

22. Sole, X.; Guino, E.; Valls, J.; Iniesta, R.; Moreno, V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1928–1929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dupont, W.D.; Plummer, W.D., Jr. Power and sample size calculations. A review and computer program. *Control Clin. Trials* **1990**, *11*, 116–128. [[CrossRef](#)]

## Anexo 7 – Sequência das sondas TaqMan

Nome da sonda TaqMan	Polimorfismo	Sequência [VIC/FAM]
C-1974242-10	rs2359536	CACCGTAGAACTCAACAGTAAAATA[C/T]TGGGGTAGAGGTAAT GCTATTAGTA
C-411660-10	rs10763170	ACC[C/T]AAATTAATTATGCCTCCTTCTACTT
C-34697393-10	rs17083838	GCC[A/G]GTAGACACAGAAAACTCTCTAAAAG



## Anexo 8– Base de dados de variantes identificadas no gene *AIP* em doentes com adenomas hipofisários, principais características clínicas/demográficas associadas e classificação ACMG

Mutação (a)	Codão	Efeito previsto na proteína	Fenótipo (idade de diagnóstico, anos) (c)	Frequência alélica (gnomAD)	Origem	Designação original	Publicação	Classificação ACMG (Franklin) (d)
<b>Região promotora</b>								
c.-270_-269delCGinsAA e c.-200G>A	-	Intrónica	Gigantismo (14)	-	Japão	c.-270_-269CG>AA and c.-200G>A	Leontiou (2008) J Clin Endocrinol Metab 93, 2390	LP (PP1, PS3, PM2, BP7)
c.1-?_993+?del	-	Deleção completa do gene	Acromegalia (35) and Gigantismo (10)	-	Reino Unido e Sérvia	c.1-?_993+?del-	Leontiou (2008) J Clin Endocrinol Metab 93, 2390	P
			n/a		n/a	c.1-?_993+?del-	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
			n/a		n/a	c.1-?_993+?del-	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	c.1-?_993+?del-	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	

c.(?-50)_(99+1_100-1)del	-	Deleção de exão 1	Acromegalia (19)	-	n/a	c.(?-50)_(99+1_100-1)del	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	LP
			Adenoma secretor de GH (46)		Alemanha	c.1104_- 109_279+578	Georgitsi (2008) J Clin Endocrinol Metab 93, 10	
c.1104_-109_279+578	-	Deleção exão 1 e 2	NFPA (17)	-	Reino Unido	c.1104_- 109_279+578	Igreja (2010) Hum Mutat 31, 950	LP
			Acromegalia (19)		Alemanha	del exon 1-2	Schöfl (2014) J Clin Endocrinol Metab 99, E2789	
<b>Exão 1</b>								
c.2T>C	1	ms, p.Met1Thr	Adenoma secretor de GH (n/a)	-	França	p.Met1?	Personnier (2011) Horm Res Paediatr 75, 392	VUS (PVS1, PS1, PM2)
			Adenoma secretor de GH/PRL (42)		França	p.?	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	
			n/a		n/a	p.?	Hernández- Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
c.3G>A	1	ms, p.Met1Ile	n/a	-	n/a	p.?	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	VUS (PVS1, PM2, PP5)
			n/a		n/a	p.?	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.4delG	2	fs, p.Ala2ArgfsTer16	Gigantismo (12)	-	Grécia	p.Ala2ArgfsTer16	Xekouki (2013) Endocr Relat Cancer 20, L11	LP (PVS1, PM2)

c.26G>A	9	ms, p.Arg9Gln	Adenoma secretor de PRL (14) e ACTH (39)	0,000244	França	p.Arg9Gln	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	VUS (BP6)
			Acromegalia (21)		Espanha	p.Arg9Gln	Oriola (2012) Eur J Endocrinol 168, 9	
			Adenoma secretor de PRL (23)		Espanha/Chile	p.Arg9Gln	LaPiscina (2021) Eur J Endocrinol 185, 4	
			Adenoma secretor de ACTH (40)		França	p.Arg9Gln	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	
c.36G>A	12	sp, p.Gly12Gly	Acromegalia (n/a)	0,000486	França	p.Gly12Gly	Cazabat (2007) Eur J Endocrinol 157, 1	LB (BP6, BP7)
c.38T>A	13	ms, p.Ile13Asn	Adenoma secretor de GH (19)	0,000004	n/a	p.Ile13Asn	Salvatori (2014) Endocrinol Diabetes Metab Case Rep 2014, 140048	P (PS3, PP3, PM2)
c.40C>T	14	ns, p.Gln14Ter	Acromegalia/ Gigantismo (11-62)	0,000028	Finlanda	p.Gln14Ter	Vierimaa (2006) Science 312, 1228	P (PVS1, PM2, PP1, PP5)
			Acromegalia (36 + 41)		Finlanda	p.Gln14Ter	Georgitsi (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104, 4101	
			n/a		n/a	p.Gln14Ter	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
			n/a		n/a	p.Gln14Ter	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Gln14Ter	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	

			Acromegalia (46)	n/a	p.Arg16His	Daly (2007) J Clin Endocrinol Metab 92, 1891		
			Acromegalia e Doença de Cushing (n/a)	Itália, EUA e Polónia	p.Arg16His	Georgitsi (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104, 4101		
			Acromegalia (n/a)	França	p.Arg16His	Cazabat (2007) Eur J Endocrinol 157, 1		
			NFPA (48 + 55)	Alemanha	p.Arg16His	Buchbinder (2008) Exp Clin Endocrinol Diabetes 116, 10		
			Acromegalia (37)	EUA	p.Arg16His	Guaraldi (2011) Clin Transl 4, 1		
c.47G>A	16	ms, p.Arg16His	Acromegalia (29) + Prolactinoma (20)	0,001885	n/a	p.Arg16His	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	B (PP3, BS1, BP6)
			Adenoma secretor de ACTH (14)	França	p.Arg16His	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663		
			NFPA (38)	n/a	p.Arg16His	Baciu (2013) Act Endo 9, 1		
			NFPA (22)	Itália	p.Arg16His	Zatelli (2013) Pituitary 16, 2		
			Acromegalia (29)	Reino Unido	p.Arg16His	Preda (2014) Eur J Endocrinol 171, 5		
			Acromegalia (26 + 50)	Itália	p.Arg16His	Ferraú (2016) Endocrine 54, 3		
			n/a	n/a	p.Arg16His	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol		

							Metab 100, E1242	
			Acromegalia (33)		Brasil	p.Arg16His	Araujo (2017) Endocr Connect Nov 6(8)	
			Acromegalia (41) + Doença de Cushing (74)		Polónia	p.Arg16His	Trofimiuk- Muldner (2023) Fron Endocrinol (Lausanne) 14, 1098367	
c.55C>T	19	ns, p.Gln19Ter	Adenoma secretor de PRL (22)	-	França	p.Gln19Ter	Mougel (2020) Eur J Endocrinol 184, 369	P (PVS1, PP1, PM2)
c.58G>T	20	ns, p.Glu20Ter	Acromegalia (14)	-	França	p.Glu20Ter	Cuny (2013) Eur J Endocrinol 168, 533	LP (PVS1, PM2)
			Acromegalia (24)		n/a	p.Arg22Ter	Barlier (2007) J Clin Endocrinol Metab 92, 1952	
			Acromegalia (10)		n/a	p.Arg22Ter	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	P (PVS1, PM2, PP5)
c.64C>T	22	ns, p.Arg22Ter	Acromegalia (23)	-	França	p.Arg22Ter	Cuny (2013) Eur J Endocrinol 168, 533	
			Adenoma secretor de GH (17)		Espanha/ Chile	p.Arg22Ter	LaPiscina (2021) Eur J Endocrinol 185, 4	
c.66_71delAGGAGA	23	if, p.Gly23_Glu24del	Acromegalia (20)	-	Alemanha	p.Glu24Ter	Georgitsi (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104, 4101	VUS (PS3, PM2, PM4, PP5)
c.70G>T	24	ns, p.Glu24Ter	Gigantismo (17)	-	Brasil	p.Glu24Ter	Leontiou (2008) J Clin Endocrinol Metab 93, 2390	P (PVS1, PM2, PP1, PP5)

			n/a		n/a	p.Glu24Ter	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
			n/a		n/a	p.Glu24Ter	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Glu24Ter	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
			Gigantismo (13)		Austrália	p.Leu25ProfsTer130	Igreja (2010) Hum Mutat 31, 950	
c.74_81delTCCCGGACinsCCCCGAT	25	fs, p.Leu25ProfsTer131	n/a	-	n/a	p.Leu25ProfsTer130	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	LP (PVS1, PM2)
			n/a		n/a	p.Leu25ProfsTer130	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Leu25ProfsTer130	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.88_89delGA	30	fs, p.Asp30TrpfsTer14	NFPA (19)	-	n/a	p.Asp30TrpfsTer14	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	LP (PVS1, PM2)
			NFPA (19)		França	p.Asp30TrpfsTer14	Cuny (2013) Eur J Endocrinol 168, 533	
c.90T>G	30	ms, p.Asp30Glu	Adenoma secretor de GH (23)	-	China	p.Asp30Glu	Cai (2013) Eur J Endocrinol 169, 867	VUS (PM2, PP3)

**Intrão 1**

			NFPA (18)		Reino Unido	p.Ala34_Lys93del	Georgitsi (2008) J Clin Endocrinol Metab 93, 10	
			n/a		n/a	p.Ala34_Lys93del	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	VUS
c.100-1025_279+357del	-	Deleção exão 2	n/a	-	n/a	p.Ala34_Lys93del	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Ala34_Lys93del	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.100-6C>A	-	Intrónica	Adenoma secretor de PRL (46)	0,000287	França	c.100-6C>A	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	B (BS1, BP4, BP6)
			Acromegalia (35)		Espanha	c.100-18C>T	Oriola (2012) Eur J Endocrinol 168, 9	
			Acromegalia (26)		Reino Unido	c.100-18C>T	Preda (2014) Eur J Endocrinol 171, 5	
c.100-18C>T	-	Intrónica	n/a	0,003147	n/a	c.100-18C>T	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	B (BA1, BS2, BP7, BP6)
			Adenoma secretor de PRL (29)		França	c.100-18C>T	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	
<b>Exão 2</b>								
c.140_163del24	47	if, p.Gly47_Arg54del	Acromegalia (28)	0,000004	Argentina	p.Gly47_Arg54del	Daly (2007) J Clin Endocrinol Metab 92, 1891	VUS (PM2, PM4)

			n/a		n/a	p.Gly47_Arg54del	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			Adenoma secretor de GH (10)		Austrália	p.Gly47_Arg54del8	Joshi (2018) Horm Res Paediatr 90, 196	
			Gigantismo (11)		EUA	p.Gly47_Arg54del	Gummadavelli (2020) J Clin Neurosci 78	
			n/a		n/a	p.Gly47_Arg54del8	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.144C>T	48	sy, p.Thr48Thr	Acromegalia (74)	0,000064	Itália	p.Thr48Thr	Occhi (2010) Eur J Endocrinol 163, 396	LB (BP7, BP6)
			NFPA (58)		China	p.(=)	Cai (2013) Eur J Endocrinol 169, 867	
c.145G>A	49	ms, p.Val49Met	Adenoma secretor de GH (28)	0,000275	Japão	p.Val49Met	Iwata (2007) Clin Endocrinol (Oxf) 66, 499	B (PP3, BS1, BP6)
c.158_165delGCCGGGCT	53	fs, p.Ser53ThrfsTer36	Adenoma secretor de GH (20)	-	Portugal	p.Ser53ThrfsTer36	Gaspar (2023) J Endocrinol Invest May, 7	LP (PVS1, PM2)
c.166C>T	56	ms, p.Arg56Cys	Prolactinoma (26)	0,000020	Bulgária	p.Arg56Cys	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	VUS (PM2)
			Prolactinoma (20)		n/a	p.Lys58Asn	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	
c.174G>C	58	ms, p.Lys58Asn	Adenoma secretor de LH/FSH (32)	0,000008	França	p.Lys58Asn	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	VUS (PM2)
			Adenoma secretor de PRL (20)		França	p.Lys58Asn	Cuny (2013) Eur J Endocrinol 168, 533	

c.197delA	66	fs, p.Lys66ArgfsTer88	Adenoma secretor de PRL (23)	-	Espanha/ Chile	p.Lys58Asn	LaPiscina (2021) Eur J Endocrinol 185, 4	LP (PVS1, PM2)
c.208C>A	70	ms, p.Leu70Met	Adenoma secretor de GH (22)	-	Itália	p.Leu70Met	Beckers (2013) Endocr Rev 34, 239	VUS (PM2, PP3)
c.217T>C	73	ms, p.Trp73Arg	Gigantismo (n/a)	-	România	p.Trp73Arg	Aflorei (2018) J Med Genet 55, 522	LP (PP3, PM2)
c.240_241delGCinsTG	80	if, p.Met80_Arg81delins IleGly	Gigantismo (8)	-	n/a	p.Met80_Arg81delins IleGly	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	VUS (PM2)
			n/a	-	n/a	p.Met80_Arg81delins IleGly	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.241C>T	81	ns, p.Arg81Ter	Acromegalia (32)	-	EUA	p.Arg81Ter	Leontiou (2008) J Clin Endocrinol Metab 93, 2390	P (PVS1,PS3, PM2, PP5)
			n/a	-	n/a	p.Arg81Ter	Hernández- Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
			Gigantismo (7)	-	Japão	p.Arg81Ter	Matsumoto (2016) Endocr J 63, 11	
			n/a	-	n/a	p.Arg81Ter	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a	-	n/a	p.Arg81Ter	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
			Adenoma secretor de GH (22)	-	Portugal	p.Arg81Ter	Gaspar (2023) J Endocrinol Invest May, 7	

c.245_249delAAGGG	82	fs, p.Glu82GlyfsTer8	Gigantismo (15)	-	Bulgária	p.Glu82GlyfsTer7	Jaffrain-Rea (2009) Endocr Relat Cancer 16, 1029	LP (PVS1, PM2)	
			Acromegalia (15)				n/a		Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509
c.249G>T	83	sp, p.Gly83AlafsTer15	Adenoma secretor de PRL (14)	-	Reino Unido	p.Gly83Gly	Igreja (2010) Hum Mutat 31, 950	VUS (PS3, PM2)	
			n/a				n/a		Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242
			n/a				n/a		Caimari (2018) J Med Genet 55, 254
			n/a				n/a		Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247
c.250G>A	84	ms, p.Glu84Lys	Acromegalia (20)	-	n/a	p.Glu84Lys	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	LP (PP3, PM2)	
<b>Intrão 2</b>									
c.279+23C>T	-	intronic	n/a	0,000057	Itália	c.279+3C>T	Jaffrain-Rea (2009) Endocr Relat Cancer 16, 1029	VUS (PM2, BP7)	
c.280-1G>C	-	intronic	Acromegalia (20)	-	EUA	IVS2-1G>C	Georgitsi (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104, 4101	LP (PVS1, PM2)	

**Exão 3**

c.286_287delGT	96	fs, p.Val96ProfsTer33	Acromegalia/Gigantismo (n/a)	-	Japão	p.Val96ProfsTer32	Iwata (2007) Clin Endocrinol (Oxf) 66, 499	LP (PVS1, PM2)
c.308A>G	103	ms, p.Lys103Arg	Adenoma secretor de ACTH (6)	0,000004	EUA	p.Lys103Arg	Stratakis (2010) Clin Genet 78, 457	LP (PP3, PM2)
c.316C>T	106	ms, p.Arg106Cys	Adenoma secretor de PRL (31)	0,000040	Austrália	p.Arg106Cys	De Sousa (2017) Eur J Endocrinol 176, 635	VUS (PM2, PP3)
c.333delC	112	fs, p.Lys112ArgfsTer44	Gigantismo (9)	-	n/a	p.Lys112ArgfsTer44	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	P (PVS1, PM2, PP5)
			n/a	-	n/a	p.Lys112ArgfsTer44	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.338_341dupACCC	115	fs, p.Leu115ProTer16	Adenoma secretor de GH (14)	-	n/a	p.Pro114fsTer	Stratakis (2010) Clin Genet 78, 457	LP (PVS1, PM2)
			n/a	-	n/a	p.Leu115ProfsTer16	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
			n/a	-	n/a	p.Leu115ProfsTer16	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a	-	n/a	p.Leu115ProfsTer16	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.343delC	115	fs, p.Leu115TrpfsTer41	Adenoma secretor de GH/PRL (16)	-	n/a	p.Leu115fsTer41	Daly (2019) Endocr Connect 8, 4	LP (PVS1, PM2)

			Adenoma secretor de GH (14)		Portugal	p.Leu115fsTer41	Gaspar (2023) J Endocrinol Invest May, 7	
c.344delT	115	fs, p.Leu115ArgfsTer41	Prolactinoma (16)	-	n/a	p.Leu115fsTer41	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	LP (PVS1, PM2)
			Acromegalia (18) and Prolactinoma (16)		n/a	p.Gly117AlafsTer39	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	
			Adenoma secretor de PRL (30)		França	p.Gly117AlafsTer39	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	LP (PVS1, PM2)
c.350delG	117	fs, p.Gly117AlafsTer39	Acromegalia (18-20) e Adenoma secretor de PRL (13 + 15)	-	França	p.Gly117AlafsTer39	Cuny (2013) Eur J Endocrinol 168, 533	
			NFPA (19)		França	p.Gly117AlafsTer39	Mougel (2020) Eur J Endocrinol 184, 369	
c.355C>T	119	ms, p.Arg119Trp	Adenoma secretor de GH (32)	0,000016	China	p.Arg119Trp	Cai (2013) Eur J Endocrinol 169, 867	VUS (PM2, PP3)
			Gigantismo (13)		n/a	p.Gln126AspfsTer3	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	LP (PVS1, PM2)
c.376_377delCA	126	fs, p.Gln126AspfsTer3	n/a	-	n/a	p.Gln126AspfsTer3	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
			Adenoma secretor de PRL (23 + 37) e NFPA (26)		França	p.Arg128Cys	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	VUS (BS1)
c.382C>T	128	ms, p.Arg128Cys	n/a (34)	0,000171	Brasil	p.Arg128Cys	Araujo (2017) Endocr Connect Nov 6(8)	
c.383G>A	128	ms, p.Arg128His	Acromegalia (27)	0,000016	Alemanha	p.Arg128His	Jaffrain-Rea (2009) Endocr	VUS (PM2, BP6)

c.404delA	135	fs, p.His135LeufsTer21	Gigantismo (15)	-	França	p.His135LeufsTer21	Cazabat (2007) Eur J Endocrinol 157, 1	LP (PVS1, PM2)
c.424C>T	142	ns, p.Gln142Ter	Gigantismo (17)	-	n/a	p.Gln142Ter	Daly (2007) J Clin Endocrinol Metab 92, 1891	LP (PVS1, PM2)
c.427C>T	143	ns, p.Gln143Ter	n/a	-	n/a	p.Gln143Ter	Hernández- Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	LP (PVS1, PM2)
			n/a			p.Gln143Ter	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a			p.Gln143Ter	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.429G>A	143	sy, p.Gln143Gln	Acromegalia (n/a)	-	França	p.Gln143Gln	Cazabat (2007) Eur J Endocrinol 157, 1	VUS (PM2, BP7)
c.433C>T	145	ms, p.Pro145Ser	Adenoma secretor de ACTH (68)	-	Holanda	p.Pro145Ser	Coopmans (2020) Endocr J 68, 3	VUS (PM2, PP3)
c.455T>G	152	ms, p.Met152Arg	Gigantismo (13)	-	Venezuela	p.Met152Arg	Mangupli (2016) Pituitary 19, 5	VUS (PM2, PP3)
c.468G>A	156	sp, p.Lys156Lys	NFPA (26)	0,00001	Austrália	p.Lys156Lys	De Sousa (2017) Eur J Endocrinol 176, 635	VUS (PM2, PP3)
<b>Intron 3</b>								
c.468+1G>A	-	Intrónica	Acromegalia (62)	-	Itália	IVS3+1G>A	Occhi (2010) Eur J Endocrinol 163, 396	LP (PVS1, PM2)

			Acromegalia (28)		Itália	IVS3+1G>A	Cannavo (2016) J Clin endocrinol Metab 101, 4	
c.468+15C>T	-	Intrónica	Acromegalia (17)	0,000055	Espanha	c.468+15C>T	Jaffrain-Rea (2009) Endocr Relat Cancer 16, 1029	LB (PM2, BP7, BP6)
c.468+16G>T	-	Intrónica	Oligomenorreia (15)	-	Itália	c.468+16G>T	Jaffrain-Rea (2009) Endocr Relat Cancer 16, 1029	LB (PM2, BP7, BP6)
			Acromegalia (40)		França	c.469-2A>G	Cazabat (2007) Eur J Endocrinol 157, 1	
			Adenoma secretor de PRL (16) e GH/PRL (40)		França	c.469-2A>G	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	
c.469-2A>G	-	Intrónica	n/a	-	n/a	p.Glu158_Gln184del	Hernández- Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	LP (PVS1, PM2)
			n/a		n/a	p.Glu158_Gln184del	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Glu158_Gln184del	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.469-1G>A	-	Intrónica	Acromegalia (26)	-	Finlanda	IVS3-1G>A	Vierimaa (2006) Science 312, 1228	LP (PVS1, PM2, PP5)
<b>Exão 4</b>								
c.490C>T	164	ns, p.Gln164Ter	Gigantismo (23)	-	Alemanha	p.Gln164Ter	Igreja (2010) Hum Mutat 31, 950	P (PVS1, PS3, PM2, PP5)

			Acromegalia (18)		Alemanha	p.Gln164Ter	Schöfl (2014) J Clin Endocrinol Metab 99, E2789	
			n/a		n/a	p.Gln164Ter	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
			n/a		n/a	p.Gln164Ter	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Gln164Ter	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.491A>G	164	ms, p.Gln164Arg	Acromegalia (34)	-	România	p.Gln164Arg	Aflorei (2018) J Med Genet 55, 522	VUS (PM2, BS3)
c.500delC	167	fs, p.Pro167HisfsTer4	Acromegalia (n/a)	-	Malásia	p.Pro167HisfsTer3	Khoo (2009) Endocr Relat Cancer 16, 1057	LP (PVS1, PP1, PM2)
			Gigantismo (12)		Colômbia	p.Trp168Ter	García (2019) Arch Endocrinol Metab 63, 385	
c.504G>A	168	ns, p.Trp168Ter	n/a	-	n/a	p.Trp168Ter	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	P (PVS1, PM2, PP1, PP5)
c.509T>C	170	ms, p.Met170Thr	Acromegalia (32)	-	França	p.Met170Thr	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	VUS (PM2, PP3)
c.512C>T	171	ms, p.Thr171Ile	Adenoma secretor de GH/PRL (6)	-	China	p.Thr171Ile	Cai (2018) World Neurosurg 123, e45	LP (PS3, PP1, PM2)
c.521_525delAGAAG	174	fs, p.Glu174GlyfsTer47	Gigantismo (17)	-	Brasil	p.Glu174fs	Naves (2007) Eur J Endocrinol 157, 4	LP (PVS1, PM2)

			Acromegalia (17)			n/a	p.Glu174fs; c.517_521delGAAGA	Daly (2007) J Clin Endocrinol Metab 92, 1891	
c.543delT	182	fs, p.Ile182SerfsTer14	Acromegalia (18)	-		Espanha	c.542delT	Georgitsi (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104, 4101	P (PVS1, PM2, PP1, PP5)
			Adenoma secretor de GH (16)			n/a	c.542delT	Garay (2020) J Clin Med 9, 6	
c.550C>T	184	ns, p.Gln184Ter	Acromegalia (21)	-		n/a	p.Gln184Ter	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	LP (PVS1, PM2)
			n/a (12)			n/a	p.Arg188Trp	Hernández- Ramírez (2016) J Clin Endocrinol Metab 101, 3144	
c.562C>T	188	ms, p.Arg188Trp	n/a	0,00003		n/a	p.Arg188Trp	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	LP (PS3, PM2, BP6)
			n/a			n/a	p.Arg188Trp	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.562delC	188	fs, p.Arg188GlyfsTer8	Adenoma secretor de GH (13)	-		Austrália	p.Arg188GlyfsTer8	Joshi (2018) Horm Res Paediatr 90, 196	LP (PVS1, PM2)
c.563G>A	188	ms, p.Arg188Gln	Adenoma secretor de PRL (24)	-		França	p.Arg188Gln	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	VUS (PM2)
			n/a			n/a	p.Tyr190Ter	Hernández- Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	LP (PVS1, PM2)
c.570C>G	190	ns, p.Tyr190Ter	n/a	-		n/a	p.Tyr190Ter	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	

			n/a		n/a	p.Tyr190Ter	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.571C>T	191	ms, p.Arg191Cys	Hiperparatiroidismo primário (n/a)	0,000040	Coreia do Sul	p.Arg191Cys	Park (2022) Front Endocrinol (Lausanne) Apr 28; 13	VUS (PM2, BP6)
			n/a		Brasil	p.Val195Ala	Jaffrain-Rea (2009) Endocr Relat Cancer 16, 1029	
c.584T>C	195	ms, p.Val195Ala	Adenoma secretor de PRL (12)	0,000018	n/a	p.Val195Ala	Naves (2010) Arq Bras Endocrinol Metabol 54, 8	VUS (PM2, BP6)
			Prolactinoma (12)		n/a	p.Val195Ala	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	
c.591G>A	197	sy, p.Glu197Glu	Acromegalia (23)	0,000071	n/a	p.Glu197Glu	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	LB (PM2, BP7, BP6)
			Adenoma secretor de PRL (26)		França	p.Glu197Glu	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	
c.601A>T	201	ns, p.Lys201Ter	Acromegalia (27 + 24)	-	França	p.Lys201Ter	Cazabat (2007) Eur J Endocrinol 157, 1	LP (PVS1, PM2)
			Adenoma secretor de GH (23)		França	p.Lys201Ter	Mougel (2020) Eur J Endocrinol 184, 369	
c.605A>G			Gigantismo (10)		n/a	p.Tyr202Cys	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
	202	ms, p.Tyr202Cys	n/a	-	n/a	p.Tyr202Cys	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	VUS (PM2, PP3)

c.630delG	211	fs, p.Asn211ThrfsTer4	NFPA (15)	-	França	p.Asn211ThrfsTer4	Cuny (2013) Eur J Endocrinol 168, 533	LP (PVS1, PM2)
<b>Intrão 4</b>								
c.645+1G>C	-	Intrónica	Acromegalia (33)	-	n/a	c.645+1G>C	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	LP (PVS1, PM2)
			n/a		n/a	c.645+1G>C	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
<b>Exão 5</b>								
c.646G>T	216	ns, p.Glu216Ter	NFPA (17)	-	Morrococos	p.Glu216Ter	Villa (2011) Endocr Relat Cancer 18, 347	LP (PVS1, PM2)
			Adenoma secretor de GH/PRL (16)		França	p.Glu216Ter	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	
c.649C>T	217	ns, p.Gln217Ter	Acromegalia (29)	-	n/a	p.Gln217Ter	Daly (2007) J Clin Endocrinol Metab 92, 1891	P (PVS1, PP1, PM2)
			Adenoma secretor de GH (43)		China	p.Gln217Ter	Cai (2013) Eur J Endocrinol 169, 867	
			Adenoma secretor de GH/PRL (29)		n/a	p.Gln217Ter	Daly (2019) Endocr Connect 8, 4	
c.662dupC	222	ns, p.Glu222Ter	Acromegalia (24)	-	Reino Unido	p.Glu222Ter	Igreja (2010) Hum Mutat 31, 950	LP (PVS1, PM2)
			n/a		n/a	p.Glu222Ter	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	

			n/a			n/a	p.Glu222Ter	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a			n/a	p.Glu222Ter	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.685C>T	229	ns, p.Gln229Ter	Gigantismo (18)	-	Itália		p.Gln229Ter	Urbani (2014) J Endocrinol Invest 37, 949	P (PVS1, PM2, PP5)
c.687G>A	229	sy, p.Gln229Gln	Adenoma secretor de GH (28)	-	China		p.Gln229Gln	Cai (2013) Eur J Endocrinol 169, 867	VUS (PM2, BP7)
c.707_716delinsGGC	236	fs, p.Asn236ArgfsTer65	Gigantismo (14)	-	Venezuela		p.Asn236ArgfsTer65	Mangupli (2016) Pituitary 19, 5	LP (PVS1, PM2)
			Acromegalia (23)			México	p.Cys238Tyr	Leontiou (2008) J Clin Endocrinol Metab 93, 2390	
			n/a			n/a	p.Cys238Tyr	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	P (PS3, PM2, PP3, PP5)
c.713G>A	238	ms, p.Cys238Tyr		0,000004			p.Cys238Tyr	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a			n/a	p.Cys238Tyr	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.715C>T	239	ns, p.Gln239Ter	Gigantismo (14)	-	n/a		p.Gln239Ter	Daly (2007) J Clin Endocrinol Metab 92, 1891	P (PVS1, PP1, PM2)
c.715_721delinsTCAACTAC	239	fs, p.Gln239SerfsTer49	Gigantismo (15)	-	Venezuela		p.Gln239SerfsTer49	Mangupli (2016) Pituitary 19, 5	LP (PVS1, PM2)

c.718T>C	240	ms, p.Cys240Arg	Adenoma secretor de GH(13)	-	França	p.Cys240Arg	Beckers (2013) Endocr Rev 34, 239	VUS (PM2, PP3)
c.721A>G	241	ms, p.Lys241Glu	Adenoma secretor de PRL (40)	0,000036	Alemanha	p.Lys241Glu	Daly (2007) J Clin Endocrinol Metab 92, 1891	LP (PS3, PM2, PP1, PP3)
c.721A>T	241	ns, p.Lys241Ter	Adenoma secretor de PRL (n/a)	-	n/a	p.Lys241Ter	Beckers 2008 Proc of the 90th Annual Meet of the Endocrine Soc	LP (PVS1, PM2)
			Prolactinoma (18)	-	n/a	p.Lys241Ter	Stratakis (2010) Clin Genet 78, 457	
c.733G>A	245	ms, p.Glu245Lys	Adenoma secretor de PRL (24)	0,000047	China	p.Glu245Lys	Cai (2013) Eur J Endocrinol 169, 867	LB (BS3, PM2, BP6)
c.736G>T	246	ns, p.Glu246Ter	Adenoma secretor de GH (25)	-	Portugal	p.Glu246Ter	Gaspar (2023) J Endocrinol Invest May, 7	LP (PVS1, PM2)
c.736_738delGAG	246	if, p.Glu246del	NFPA (20)	-	França	p.Glu246del	Cuny (2013) Eur J Endocrinol 168, 533	VUS (PM2, PM4)
c.742_744delTAC	248	if, .Tyr248del	Gigantismo (19)	-	Itália	p.Tyr248del	Georgitsi (2008) Clin Endocrinol (Oxf) 69, 621	LP (PS3, PM2, PM4)
c.752delT	251	fs, p.Leu251ArgfsTer52	Adenoma secretor de ACTH (25)	-	França	p.Leu251ArgfsTer52	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	LP (PVS1, PM2)
c.753G>A	251	sy, p.Leu251Leu	Adenoma secretor de PRL (32)	0,000176	França	p.Leu251Leu	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	LB (BP7, BP6)
			Adenoma secretor de GH (40)		Portugal	p.Leu251Leu	Gaspar (2023) J Endocrinol Invest May, 7	
c.760T>C	254	ms, p.Cys254Arg	n/a (17)	-	n/a	p.Cys254Arg	Hernández-Ramírez (2016) J Clin Endocrinol Metab 101, 3144	LP (PS3, PM2, PP3)

			n/a		n/a	p.Cys254Arg	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Cys254Arg	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
			-		n/a	p.Cys254Trp	Hernández-Ramírez (2016) J Clin Endocrinol Metab 101, 3144	
c.762C>G	254	ms, p.Cys254Trp	n/a	-	n/a	p.Cys254Trp	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	LP (PS3, PM2, PP3)
			n/a		n/a	p.Cys254Trp	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
			Adenoma secretor de TSH (39)		Espanha	p.Ile257Val	Daly (2010) J Clin Endocrinol Metab 95, 11	LP (PS3, PM2)
c.769A>G	257	ms, p.Ile257Val	n/a (23 + 33)	-	n/a	p.Ile257Val	Hernández-Ramírez (2016) J Clin Endocrinol Metab 101, 3144	
			Adenoma secretor de PRL (17)	0,000004	França	p.Leu258Phe	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	VUS (PM2, PP3)
c.772C>T	258	ms, p.Leu258Phe						
c.773T>G	258	ms, p.Leu258Arg	Prolactinoma (29)	-		p.Leu258Arg	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	VUS (PM2, PP3)
			Gigantismo (12)	-		p.Lys260fsTer43	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	LP (PVS1, PM2)
c.779delA	260	fs, p.Lys260SerfsTer43						
c.783C>A	261	ns, p.Tyr261Ter	Acromegalia (28)	-	n/a	p.Tyr261Ter	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	LP (PVS1, PM2)

				Acromegalia (46)		Japão	p.Tyr261Ter	Nishizawa (2013) Exp Clin Endocrinol Diabetes 121, 295	
				Acromegalia (18 + 46)		Japão	p.Tyr261Ter	Matsumoto (2016) Endocr J 63, 11	
				Acromegalia (12)		França	p.Tyr261Ter	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	
				Acromegalia (29)		França	p.Tyr261Ter	Cuny (2013) Eur J Endocrinol 168, 533	
c.783C>G	261	ns, p.Tyr261Ter		n/a	-	n/a	p.Tyr261Ter	Hernández- Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	P (PVS1, PM2, PP5)
				n/a		n/a	p.Tyr261Ter	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
				n/a		n/a	p.Tyr261Ter	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.784G>A	262	ms, p.Asp262Asn		Adenoma secretor de GH (35)	0,000020	China	p.Asp262Asn	Cai (2013) Eur J Endocrinol 169, 867	VUS (PM2, PP3)
<b>Intrão 5</b>									
c.787+9C>T	-	Intrónica		n/a	0,00005	n/a	c.787+9C>T	Hernández- Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	VUS (PM2, BP6)
				n/a		n/a	c.787+9C>T	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	

c.787+24C>T	-	Intr ónica	Acromegal (44)	0,000077 09	Espanha	c.787+24C>T	Oriola (2012) Eur J Endocrinol 168, 9	VUS (PM2, BP7)
<b>Exão 6</b>								
c.803A>G	268	ms, p.Tyr268Cys	Prolactinoma (28)	0,000004	Alemanha	p.Tyr268Cys	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	VUS (PM2, PP3)
			Acromegalia (48)		Brasil	p.Tyr268Ter	Toledo (2007) J Clin Endocrinol Metab 92, 1934	
			n/a		n/a	p.Tyr268Ter	Hernández- Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
c.804C>A	268	ns, p.Tyr268Ter	n/a (27)	-	Brasil	p.Tyr268Ter	Araujo (2017) Endocr Connect Nov 6(8)	LP (PVS1, PM2, PP5)
			n/a		n/a	p.Tyr268Ter	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Tyr268Ter	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
			Gigantism (15)		Reino Unido	p.Phe269_His275dup	Leontiou (2008) J Clin Endocrinol Metab 93, 2390	
c.805_825dupTTCAAGCGGGGCAA GGCCCAC	269	if, p.Phe269_His275dup	GH/PRL-secreting tumor (14)	-	França	p.Phe269_His275dup	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	P (PS3, PM2, PM4, PP5)
			n/a		n/a	p.Phe269_His275dup	Hernández- Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	

			n/a		n/a	p.Phe269_His275dup	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Phe269_His275dup	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
			Adenoma secretor de PRL (21)		França	p.Phe269_His275dup	Mougel (2020) Eur J Endocrinol 184, 369	
			Acromegalia (47)		Reino Unido	p.Phe269Phe	Leontiou (2008) J Clin Endocrinol Metab 93, 2390	
			Prolactinoma (10)		n/a	p.Phe269Phe	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	
			Acromegalia (50)		Espanha	p.Phe269Phe	Oriola (2012) Eur J Endocrinol 168, 9	
			Gigantismo (21)		Reino Unido	p.Phe269Phe	Preda (2014) Eur J Endocrinol 171, 5	
c.807C>T	269	sp, p.Phe269Phe		0,000550			Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	LB (PM2, BP7, BP6)
			n/a		n/a	p.Phe269Phe		
			Adenoma secretor de GH (15)		Austrália	p.Phe269Phe	De Sousa (2017) Eur J Endocrinol 176, 635	
			n/a		n/a	p.Phe269Phe	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			Adenoma secretor de PRL (28)		Espanha/Chile	p.Phe269Phe	LaPiscina (2021) Eur J Endocrinol 185, 4	

c.811C>T	271	ms, p.Arg271Trp	Acromegalia (42 + 22)	0,000004	n/a	p.Arg271Trp	Daly (2007) J Clin Endocrinol Metab 92, 1891	P (PS3, PM2, PP3, PP5)
			Gigantismo (15)		Austrália/ Nova Zelândia	p.Arg271Trp	Jennings (2009) Eur J Endocrinol 161, 5	
			Acromegalia (18)		n/a	p.Arg271Trp	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	
			n/a		n/a	p.Arg271Trp	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
			Adenoma secretor de GH (21)		Austrália	p.Arg271Trp	De Sousa (2017) Eur J Endocrinol 176, 635	
			n/a		n/a	p.Arg271Trp	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Arg271Trp	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
Adenoma secretor de GH (10 + 14 + 12) e PRL (17)	Espanha/ Chile	p.Arg271Trp	LaPiscina (2021) Eur J Endocrinol 185, 4					
c.811_812del	271	fs, p.Arg271GlyfsTer16	Acromegalia (19)	-	Alemanha	p.Arg271GlyfsTer16	Detomas (2023) J Endocrinol Invest Feb, 9	LP (PVS1, PM2)
c.815G>A	272	ms, p.Gly272Asp	Acromegalia (21)	0,000004	Turquia	p.Gly272Asp	Karaca (2015) Pituitary 18, 831	LP (PS3, PM2, PP3)
			n/a		n/a	p.Gly272Asp	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	

			n/a		n/a	p.Gly272Asp	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
			n/a		n/a	p.Lys273ArgfsTer30	Hernández- Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
c.816delC	273	fs, p.Lys273ArgfsTer30	n/a (22)	-	Brasil	p.Lys273ArgfsTer30	Araujo (2017) Endocr Connect Nov 6(8)	LP (PVS1, PM2)
			n/a		n/a	p.Lys273ArgfsTer30	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Lys273ArgfsTer30	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.824dupA	275	fs, p.His275GlnfsTer13	Adenoma secretor de GH (8)	-	USA	-	Georgitsi (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104, 4101	LP (PVS1, PM2, PP5)
c.825_845delCGCGGCCGTGTGGAA TGCCA	275	fs, p.His275_Ala281del	Acromegalia (29)	-	Espanha/ Chile	p.His275GlnfsTer49	Belar (2012) Clin Endocrinol (Oxf) 76, 5	VUS (PM2, PM4)
			Gigantismo (12)		Itália	p.Ala277Pro	Jaffrain-Rea (2009) Endocr Relat Cancer 16, 1029	VUS (PM2)
c.829G>C	277	ms, p.Ala277Pro	Acromegalia (12)	-	n/a	p.Ala277Pro	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	
c.836G>A	279	ns, p.Trp279Ter	Acromegalia (39)	-	Turquia	p.Trp279Ter	Cansu (2016) Hormones 15, 441	LP (PVS1, PM2)
c.844C>T	282	ns, p.Gln282Ter	Acromegalia (24)	-	Alemanha	p.Gln282Ter	Schöfl (2014) J Clin Endocrinol Metab 99, E2789	LP (PVS1, PM2)

c.853C>T	285	ns, p.Gln285Ter	Adenoma secretor de GH (60)	-	Holanda	p.Gln285Ter	Beckers (2013) Endocr Rev 34, 239	LP (PVS1, PM2)
			Adenoma secretor de GH (22)		França	p.Gln285Ter	Mougel (2020) Eur J Endocrinol 184, 369	
c.854_857delAGGC	285	fs, p.Gln285LeufsTer17	Gigantismo (21)	-	n/a	p.Gln285LeufsTer17	Daly (2007) J Clin Endocrinol Metab 92, 1891	LP (PVS1, PM2, PP1)
c.863_864delTT	288	fs, p.Phe288Cysfs	Acromegalia (31)	-	n/a	p.Phe288CysfsTer?	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	LP (PVS1, PM2)
c.865G>A	289	ms, p.Ala289Thr	Adenoma secretor de GH/ACTH (47)	-	France	p.Ala289Thr	Mougel (2020) Eur J Endocrinol 184, 369	VUS (PM2, BP4)
c.868A>T	290	ns, p.Lys290Ter	n/a	-	n/a	p.Lys290Ter	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	LP (PVS1, PM2)
			Acromegalia (26)		México	p.Lys290Ter	Ramírez-Rentería (2016) Endocrine 53, 2	
			n/a		n/a	p.Lys290Ter	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Lys290Ter	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.871G>A	291	ms, p.Val291Met	Acromegalia (30)	-	Itália	p.Val291Met	Occhi (2010) Eur J Endocrinol 163, 396	LP (PS3, PM2, PP3)
c.872T>A	291	ms, p.Val291Glu	Adenoma secretor de GH/PRL (21)	0,000004	França	p.Val291Glu	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	VUS (PM2, PP3)

			n/a		n/a	p.Val291_Leu292del	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
c.872_877delTGCTGG	291	if, p.Val291_Leu292del	Acromegalia (21)	-	México	p.Val291_Leu292del	Ramírez-Rentería (2016) Endocrine 53, 2	VUS (PM2, PM4)
			n/a		n/a	p.Val291_Leu292del	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Val291_Leu292del	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.878A>T and c.940C>T	293	ms, p.Glu293Val and ms, p.Arg314Trp	Acromegalia (51)	-	România	p.Glu293Val and p.Arg314Trp	Aflorei (2018) J Med Genet 55, 522	VUS (PM2)
c.878_879AG>GT and c.880_891delCTGGACCCAGCC	293	ms, Glu293Gly and if, p.Leu294_Ala297del	Acromegalia (29)	-	Alemanha	Glu293Gly and p.Leu294_Ala297del	Georgitsi (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104, 4101	VUS (PM2, PM4)
c.881T>C	294	ms, p.Leu294Pro	Acromegalia (10)	-	França	p.Leu294Pro	Cuny (2013) Eur J Endocrinol 168, 533	LP (PP3, PM2)
			Acromegalia (16)		Holanda	p.Ala299Val	Georgitsi (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104, 4101	
c.896C>T	299	ms, p.Ala299Val	Adenoma secretor de PRL (30)	0,000544	Irlanda do Norte	p.Ala299Val	Igreja (2010) Hum Mutat 31, 950	LB (BS3, BP6)
			Gigante de Tampico		México	p.Ala299Val	Ramírez-Rentería (2016) Endocrine 53, 2	
			NFPA (48)		França	p.Ala299Val	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	

			NFPA (21)		Austrália	p.Ala299Val	De Sousa (2017) Eur J Endocrinol 176, 635	
			n/a (40 + 15)		Brasil	p.Ala299Val	Araujo (2017) Endocr Connect Nov 6(8)	
			Adenoma secretor de PRL e ACTH (17 + 26 + 30 + 36 + 37)		Portugal	p.Ala299Val	Gaspar (2023) J Endocrinol Invest May, 7	
			Acromegalia/ Gigantismo (18)		Finlândia	p.Arg304Ter	Vierimaa (2006) Science 312, 1228	
			Acromegalia (17)		França	p.Arg304Ter	Cazabat (2007) Eur J Endocrinol 157, 1	
			Acromegalia (19)		n/a	p.Arg304Ter	Daly (2007) J Clin Endocrinol Metab 92, 1891	
			Acromegalia (17 + 42)		Reino Unido e România	p.Arg304Ter	Leontiou (2008) J Clin Endocrinol Metab 93, 2390	
c.910C>T	304	ns, p.Arg304Ter	Adenoma secretor de GH (19 + 17)	0,000014	Itália	p.Arg304Ter	Jaffrain-Rea (2009) Endocr Relat Cancer 16, 1029	P (PVS1, PS3, PM2, PP1, PP5)
			Gigantismo (6 + 19) e Acromegalia (20)		Irlanda do Norte e Reino Unido	p.Arg304Ter	Igreja (2010) Hum Mutat 31, 950	
			Acromegalia (17 + 25)		n/a	p.Arg304Ter	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	
			Acromegalia (17)		França	p.Arg304Ter	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	
			Acromegalia (18)		França	p.Arg304Ter	Cuny (2013) Eur J Endocrinol 168, 533	

			n/a		n/a	p.Arg304Ter	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
			Gigantismo (9 + 18)		México	p.Arg304Ter	Ramírez-Rentería (2016) Endocrine 53, 2	
			Acromegalia (32)		Itália	p.Arg304Ter	Cannavo (2016) J Clin endocrinol Metab 101, 4	
			Adenoma secretor de GH (13 + 25)		Austrália	p.Arg304Ter	De Sousa (2017) Eur J Endocrinol 176, 635	
			n/a		n/a	p.Arg304Ter	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Arg304Ter	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
			Doença de Cushing		Polónia	p.Arg304Gln	Georgitsi (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104, 4101	
			Acromegalia (30)		România	p.Arg304Gln	Leontiou (2008) J Clin Endocrinol Metab 93, 2390	
c.911G>A	304	ms, p.Arg304Gln	NFPA (52)	0,001568	EUA	p.Arg304Gln	Igreja (2010) Hum Mutat 31, 950	B (BA1, BS1, BS2, BP6)
			Acromegalia (38 + 67)		Itália	p.Arg304Gln	Occhi (2010) Eur J Endocrinol 163, 396	
			Adenoma secretor de PRL (15)		EUA	p.Arg304Gln	Tichomirowa (2011) Eur J Endocrinol 165, 509	

			Adenoma secretor de PRL (25)			França	p.Arg304Gln	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	
			Adenoma secretor de PRL (27)			França	p.Arg304Gln	Cuny (2013) Eur J Endocrinol 168, 533	
			Acromegalia (41)			Reino Unido	p.Arg304Gln	Preda (2014) Eur J Endocrinol 171, 5	
			Acromegalia (29)			Alemanha	p.Arg304Gln	Schöfl (2014) J Clin Endocrinol Metab 99, E2789	
			n/a			n/a	p.Arg304Gln	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
			Acromegalia (53 + 62 + 67)			Itália	p.Arg304Gln	Cannavo (2016) J Clin endocrinol Metab 101, 4	
			Adenoma secretor de PRL (36)			França	p.Arg304Gln	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	
			n/a (18)			Brasil	p.Arg304Gln	Araujo (2017) Endocr Connect Nov 6(8)	
			Adenoma secretor de GH/PRL (30)			França	p.Arg304Gln	Mougel (2020) Eur J Endocrinol 184, 369	
			Adenoma secretor de ACTH (13)			Espanha/Chile	p.Arg304Gln	LaPiscina (2021) Eur J Endocrinol 185, 4	
c.919dupC	307	fs, p.Gln307Profs	Adenoma secretor de GH/PRL (11)	-		EUA	p.Gln307ProfsTer104	Stratakis (2010) Clin Genet 78, 457	VUS (PM2, PVS1, PP5)
c.920G>A	307	ms, p.Arg307Gln	Gigantismo (21+28+23+24+15+13+14)	0,000171		Venezuela	p.Gln307Arg	Mangupli (2016) Pituitary 19, 5	VUS (PM2)

c.940C>T	314	ms, p.Arg314Trp	Gigantismo (30)	0,000020	România	p.Arg314Trp	Baciu (2013) Endocrine Abstracts 32, P910	VUS (PM2)
c.943C>T	315	ns, p.Gln315Ter	Adenoma secretor de GH (16)	-	Japão	p.Gln315Ter	Iwata (2014) Endocr Pathol 25, 273	VUS (PM2, PVS1)
c.955G>A	319	ms, p.Glu319Lys	Adenoma secretor de GH (11)	-	China	p.Glu319Lys	Cai (2013) Eur J Endocrinol 169, 867	VUS (PM2, PP3)
c.967C>T	323	ms, p.Arg323Trp	NFPA (31)	0,000049	China	p.Arg323Trp	Cai (2013) Eur J Endocrinol 169, 867	VUS (PP3)
c.967delC	323	fs, p.Arg323GlyfsTer39	n/a	-	n/a	p.Arg323GlyfsTer39	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	VUS (PM2, PVS1)
			n/a		n/a	p.Arg323GlyfsTer39	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Arg323GlyfsTer39	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.973C>A	325	sy, p.Arg325Arg	NFPA (70)	0,00007	França	p.Arg325Arg	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	LB (PM2, BP7, BP6)
c.974G>A	325	ms, p.Arg325Gln	Adenoma secretor de PRL (18)	0,000061	França	p.Arg325Gln	Cazabat (2012) J Clin Endocrinol Metab 97, E663	LB (PM2, PS3, BP6)
			PRL-secreting tumor (16)		Espanha	p.Arg325Gln	García-Arnés (2013) Endocr Pathol 24, 4	
c.976G>A	326	ms, p.Gly326Arg	GH-secreting tumor (30)	-	China	p.Gly326Arg	Cai (2013) Eur J Endocrinol 169, 867	VUS (PM2, PP3)

			n/a		n/a	p.Gly326AlafsTer?	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
c.976_977insC	326	fs, p.Gly326Alafs	Acromegalia (17)	-	México	p.Gly326AfsTer	Ramírez-Rentería (2016) Endocrine 53, 2	VUS (PM2, PVS1)
			n/a		n/a	p.Gly326AlafsTer?	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
			n/a		n/a	p.Gly326AlafsTer?	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
			n/a		n/a	p.Ile327AspfsTer?	Hernández-Ramírez (2015) J Clin Endocrinol Metab 100, E1242	
c.978dupG	327	fs, p.Ile327Aspfs		-	n/a	p.Ile327AspfsTer?	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	VUS (PM2, PVS1)
			n/a		n/a	p.Ile327AspfsTer?	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	
c.991T>C			Gigantismo (16)		n/a	p.331Argext91	Caimari (2018) J Med Genet 55, 254	
	331	ms, p.Ter331Argext*?	Acromegalia (15)	-	n/a	p.Ter331Arg	Imran (2018) Endocrinol Diabetes Metab Case Rep 2018, 17	VUS (PM2, PM4)
			n/a		n/a	p.331Argext91	Marques (2020) J Clin Endocrinol Metab 105, e2247	

c.*14C>A	3' UTR	UTR	Adenoma secretor de GH (17)	0,000405	França	c.*14C>A	Lecoq (2016) Eur J Endocrinol 174, 523	LB (BS1, BP7)
			Adenoma secretor de GH (31 + 40)		Brasil	c.*14C>A	Araujo (2017) Endocr Connect Nov 6(8)	
			Adenoma secretor de GH (40)		Portugal	c.*14C>A	Gaspar (2023) J Endocrinol Invest May, 7	
c.*60G>C	3' UTR	UTR	Adenoma secretor de GH (28 + 51)	0,007870	Japão	c.1053G>C	Iwata (2007) Clin Endocrinol (Oxf) 66, 499	B (BA1, BS2, BP7, BP6)
			Adenoma secretor de PRL (40 + 42)		China	c.993+60G>C	Cai (2013) Eur J Endocrinol 169, 867	
			Adenoma secretor de PRL (28 + 29)		Portugal	c.*60G>C	Gaspar (2023) J Endocrinol Invest May, 7	
c.*64G>A	3' UTR	UTR	n/a (38)	0,005447	Brasil	c.*64G>A	Araujo (2017) Endocr Connect Nov 6(8)	B (BA1, BS2, BP7, BP6)
			Adenoma secretor de ACTH (28)		Portugal	c.*64G>A	Gaspar (2023) J Endocrinol Invest May, 7	

(a) As mutações são numeradas em relação à sequência de referência do cDNA do gene *AIP* (NM\_003977.4), sendo que o nucleótido +1 corresponde ao A do códon de iniciação da tradução ATG. A numeração e a nomenclatura de cada mutação foram alteradas sempre que necessário, a fim de seguir as recomendações padrão (den Dunnen, J.T. 2016. Sequence variant descriptions: HGVS nomenclature and mutalyzer Curr. Protoc. Hum. Genet).

(b) Tipo de mutação: fs, mutação frameshift; ns, mutação nonsense; ms, mutação missense; if, deleção ou inserção in-frame; sp, mutação no local de splice; sy, mutação sinónima

(c) Fenótipo: NFPA, adenoma hipofisário não funcional.

(d) Critérios de evidência para a classificação ACMG: PVS1, (Patogénico Muito Forte) Variante nula (nonsense, frameshift, canónica ±1 ou 2 locais de splice, códon de iniciação, deleção de um ou vários exões) num gene em que a LOF é um mecanismo conhecido de doença; PS3, (Patogénico Forte) Estudos funcionais *in vitro* ou *in vivo* bem estabelecidos que apoiam um efeito prejudicial no gene ou no produto do gene; PM2, (Patogénico Moderado) Ausência nos controlos (ou frequência extremamente baixa se for recessivo) na Base de Dados de Agregação Genómica; PM4, (Patogénico Moderado) Alterações do comprimento da proteína em resultado de deleções/inserções in-frame numa região não repetitiva ou de variantes stop-loss; PM5, (Patogénica Moderada) Nova alteração missense num resíduo de aminoácido onde já foi observada anteriormente uma alteração missense diferente determinada como patogénica; PP1, (Patogénica de Suporte) Cosegregação com doença em múltiplos membros da família afectados num gene cuja causa da doença é definitivamente conhecida; PP2, (Patogénico Apoiantes) Variante missense num gene que tem uma baixa taxa de variação missense benigna e no qual as variantes missense são um mecanismo comum de doença; PP3, (Patogénico Apoiantes) Múltiplas linhas de evidência computacional apoiam um efeito deletério no gene ou no produto do gene (conservação, evolução, impacto do splicing, etc.); PP5, (Patogénico Apoiantes) PP5, (Patogénica de Apoio) Uma fonte respeitável comunicou recentemente uma variante como patogénica, mas o laboratório não dispõe de provas para efetuar uma avaliação independente; BA1, (Benigno Autónomo) A frequência alélica é >5% no Exome Sequencing

Project, 1000 Genomes Project ou Exome Aggregation Consortium; BS1, (Benigno Forte) A frequência alélica é superior à esperada para a doença; BS2, (Benigno Forte) Observada num indivíduo adulto saudável para uma doença recessiva (homozigótica), dominante (heterozigótica) ou ligada ao X (hemizigótica), com penetrância total esperada numa idade precoce; BS3, (Benigno Forte) Estudos funcionais bem estabelecidos não mostram qualquer efeito prejudicial na função ou no splicing da proteína; BP3, (Benigno Apoiente) Deleções/inserções in-frame numa região repetitiva sem função conhecida; BP4, (Benigno com suporte) Múltiplas linhas de evidência computacional sugerem não haver impacto no gene ou no produto do gene (conservação, evolução, impacto no splicing, etc.); BP6, (Benigna com suporte) Uma fonte respeitável comunicou recentemente que a variante é benigna, mas o laboratório não dispõe de provas para efetuar uma avaliação independente; BP7, (Benigna com suporte) Uma variante sinónima (silenciosa) para a qual os algoritmos de previsão de splicing não prevêem qualquer impacto na sequência de consenso de splicing e o nucleótido não está altamente conservado.



## Anexo 9 – Variantes raras identificadas em doentes com macroadenomas hipofisários esporádicos de início jovem

Gene (transcrito)	Número do doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (alteração ao nível do nucleótido, alteração ao nível da proteína) <sup>(a)</sup>	Efeito	Frequência alélica (GnomAD)	Frequência alélica em controlos Portugueses	Classificação ACMG (critérios) <sup>(b)</sup>	Estudo anterior (PMID)
<i>AIP</i> (NM_003977.3)	8215	F	20	GH	20	c.158_165delGCCGGGCT, p.Ser53ThrfsTer36	Deleção <i>frameshift</i>	0.000000	0.0000	LP (PVS1, PM2)	37149543* 18381572, 37149543* 30851160, 37149543*
	7879	M	22	GH	26	c.241C>T, p.Arg81Ter	<i>Nonsense</i>	0.000000	0.0000	P (PVS1, PM2, PP5)	37149543* 30851160, 37149543*
	7329	M	14	GH/PRL	14	c.343delC, p.Leu115TrpfsTer41	Deleção <i>frameshift</i>	0.000000	0.0000	LP (PVS1, PM2)	37149543*
	8458	M	27	GH/PRL	22	c.695C>T, Pro232Leu	<i>Missense</i>	0.000025	0.0000	VUS (PM2)	-
	7632	F	25	GH	25	c.736G>T, p.Glu246Ter	<i>Nonsense</i>	0.000000	0.0000	LP (PVS1, PM2)	37149543*
	8092	F	27	GH	>10	c.753G>A, p.Leu251Leu	Sinónima	0.000171	0.0034	LB (PM2, BP6, BP7)	26792934
	8343	F	27	GH	>10	c.753G>A, p.Leu251Leu	Sinónima	0.000171	0.0034	LB (PM2, BP6, BP7)	26792934
	7995	F	26	PRL	12	c.896C>T, p.Ala299Val	<i>Missense</i>	0.000651	0.0000	VUS (BP6)	17360484
	8079	F	36	ACTH	14	c.896C>T, p.Ala299Val	<i>Missense</i>	0.000651	0.0000	VUS (BP6)	17360484
	8158	F	36	ACTH	14	c.896C>T, p.Ala299Val	<i>Missense</i>	0.000651	0.0000	VUS (BP6)	17360484
8182	F	30	PRL	15	c.896C>T, p.Ala299Val	<i>Missense</i>	0.000651	0.0000	VUS (BP6)	17360484	
<i>CABLES1</i> (NM_001100619.2)	8462	M	27	NFPA	>10	c.17C>G, p.Ala6Gly	<i>Missense</i>	0.000000	0.0000	VUS (PM2, BP4)	-

Gene (transcrito)	Número do doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (alteração ao nível do nucleótido, alteração ao nível da proteína) <sup>(a)</sup>	Efeito	Frequência alélica (GnomAD)	Frequência alélica em controlos Portugueses	Classificação ACMG (critérios) <sup>(b)</sup>	Estudo anterior (PMID)
<i>CDH23</i> (NM_022124.5)	7637	F	20	GH	34	c.19G>C, p.Ala7Pro	<i>Missense</i>	0.000000	0.0000	VUS (PM2, BP4)	-
	8163	M	24	GH	29	c.19G>C, p.Ala7Pro	<i>Missense</i>	0.000000	0.0000	VUS (PM2, BP4)	-
	7813	F	37	GH	40	c.440C>T, p.Pro147Leu	<i>Missense</i>	0.000165	0.0017	VUS (PM2, BP4)	-
	7703	M	37	NFPA	30	c.1050A>G, p.Ile350Met	<i>Missense</i>	0.000007	0.0000	VUS (PM2, BP4)	-
	8215	F	20	GH	20	c.1260C>T, p.Ser420Ser	Sinónima	0.000407	0.0034	VUS (PM2)	-
	8054	F	36	PRL	29	c.1262C>G, p.Ser421Cys	<i>Missense</i>	0.000000	0.0000	VUS (PM2)	-
	7820	F	37	PRL	20	c.415G>A, p.Val139Ile	<i>Missense</i>	0.000082	0.0034	VUS (PM2)	24416283
	7804	M	33	GH	17	c.535G>A, p.Ala179Thr	<i>Missense</i>	0.000033	0.0000	LB (PM2, BP4, BP6)	30033219
	6905	M	17	GH/PRL	>10	c.1122G>T, p.Val374Val	Sinónima	0.000118	0.0000	LB (BS1, BP6, BP7)	-
	7686	M	27	NFPA	>10	c.1122G>T, p.Val374Val	Sinónima	0.000118	0.0000	LB (BS1, BP6, BP7)	-
	7826	M	18	PRL	>10	c.1450-10G>A	Intrónica	0.000039	0.0000	LB (PM2, BP4, BP6)	-
	7631	M	30	GH	30	c.1672G>A, p.Val558Met	<i>Missense</i>	0.000145	0.0000	VUS (BP4)	-
	7833	M	29	PRL	24	c.1963G>A, p.Val655Ile	<i>Missense</i>	0.000085	0.0017	VUS (PM2)	-
	7959	M	36	FsH/LH	23	c.2836G>A, p.Val946Met	<i>Missense</i>	0.000016	0.0000	VUS (PM2)	-
	8215	F	20	GH	20	c.2836G>A, p.Val946Met	<i>Missense</i>	0.000016	0.0000	VUS (PM2)	-
	7827	M	28	GH/PRL	11	c.3231T>G, p.Pro1077Pro	Sinónima	0.000145	0.0000	LB (BP6, BP7)	12075507
	7853	F	24	PRL	10	c.3739C>T, p.Arg1247Cys	<i>Missense</i>	0.000125	0.0000	VUS (PM2)	-
	8259	F	19	GH	>10	c.3852G>A, p.Ser1284Ser	Sinónima	0.000143	0.0000	LB (BS1, BP6, BP7)	-
	7878	M	32	Undefined	16	c.3986G>A, p.Gly1329Asp	<i>Missense</i>	0.000269	0.0000	VUS (PM2, PP3)	-

Gene (transcrito)	Número do doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (alteração ao nível do nucleótido, alteração ao nível da proteína) <sup>(a)</sup>	Efeito	Frequência alélica (GnomAD)	Frequência alélica em controlos Portugueses	Classificação ACMG (critérios) <sup>(b)</sup>	Estudo anterior (PMID)
	8130	F	39	ACTH	14	c.4359+9C>A	Intrónica	0.000026	0.0000	VUS (PM2, BP6)	-
	7986	M	26	PRL	40	c.4582G>A, p.Glu1528Lys	Missense	0.000072	0.0000	VUS (PM2, BP4)	-
	8130	F	39	ACTH	14	c.4621G>A, p.Val1541Met	Missense	0.000243	0.0000	VUS	25257991
	8204	M	38	GH	>10	c.4780C>T, p.Arg1594Cys	Missense	0.000092	0.0000	VUS (PM2, PP3)	-
	7889	M	32	PRL	>40	c.5050C>T, p.Arg1684Cys	Missense	0.000434	0.0000	VUS (BP4)	-
	7745	F	40	NFPA	22	c.5277G>A, p.Pro1759Pro	Sinónima	0.000026	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7868	F	39	GH	18	c.5626A>G, p.Ser1876Gly	Missense	0.000000	0.0000	VUS (PM2, BP4)	-
	7986	M	26	PRL	40	c.5685C>T, p.Arg1895Arg	Sinónima	0.000026	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	19375528
	8204	M	38	GH	>10	c.6168C>T, p.Leu2056Leu	Sinónima	0.000059	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7893	F	40	NFPA	22	c.6264C>A, p.Val2088Val	Sinónima	0.000013	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	8152	F	27	GH	>10	c.6678C>T, p.Asn2226Asn	Sinónima	0.000112	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7837	M	40	PRL	33	c.6713-8G>A	Intrónica	0.000517	0.0000	LB (BS1, BP4, BP6)	28912962
	7791	M	23	GH	25	c.7558G>A, p.Glu2520Lys	Missense	0.000000	0.0000	LP (PM2, PP3, PP5)	32467589
	7792	M	18	TSH	10	c.8167G>C, p.Val2723Leu	Missense	0.000987	0.0000	LB (BS1, BS2, BP4, BP6)	22607986
	7632	F	25	GH	25	c.8328C>T, p.Asn2776Asn	Sinónima	0.000000	0.0000	VUS (PM2)	-
	7884	F	24	GH	18	c.8407G>A, p.Val2803Ile	Missense	0.000217	0.0000	VUS (PM2, BP4)	-

Gene (transcrito)	Número do doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (alteração ao nível do nucleótido, alteração ao nível da proteína) <sup>(a)</sup>	Efeito	Frequência alélica (GnomAD)	Frequência alélica em controlos Portugueses	Classificação ACMG (critérios) <sup>(b)</sup>	Estudo anterior (PMID)
<i>CDKN1B</i> (NM_004064.4)	7904	F	27	PRL	>10	c.8577C>T, p.Ala2859Ala	<i>Synonymous</i>	0.000019	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	8023	M	37	FSH/LH	31	c.8914G>A, p.Glu2972Lys	<i>Missense</i>	0.000039	0.0000	VUS (PM2, BP4)	-
	8471	M	27	PRL	47	c.9012T>G, p.Phe3004Leu	<i>Missense</i>	0.000000	0.0000	VUS (PM2)	-
	8014	F	21	PRL	14	c.9076C>T, p.Arg3026Trp	<i>Missense</i>	0.000013	0.0000	VUS (PM2)	-
	7688	F	22	PRL	12	c.9078G>C, p.Arg3026Arg	Sinónima	0.000026	0.0000	VUS (PM2)	29048421
	7791	M	23	GH	25	c.9750T>C, p.Thr3250Thr	Sinónima	0.000007	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7634	F	24	GH	>10	c.9775C>T, p.His3259Tyr	<i>Missense</i>	0.000013	0.0000	VUS (PM2, BP4)	-
	8331	M	34	PRL	69	c.9983G>A, p.Arg3328His	<i>Missense</i>	0.000105	0.0000	LB (PM2, BS2, PP3, BP6)	-
	7837	M	40	PRL	33	c.10026C>T, p.Asp3342Asp	Sinónima	0.000549	0.0000	LB (BS1, BP6, BP7)	28912962
	7636	M	29	NFPA	33	c.471C>A, p.Thr157Thr	Sinónima	0.000033	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	8044	F	35	PRL	11	c.492C>T, p.Asn164Asn	Sinónima	0.000007	0.0017	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7689	F	17	GH	>10	c.589C>A, p.Gln197Lys	<i>Missense</i>	0.000007	0.0000	VUS (PM2, BP1)	-
	7641	F	29	GH	>10	c.*9-64A>G	Intrónica	0.000892	0.0000	LB (BS1, BP7)	-
	8168	F	39	NFPA	21	c.*9-64A>G	Intrónica	0.000892	0.0000	LB (BS1, BP7)	-
	8227	F	39	NFPA	21	c.*9-64A>G	Intrónica	0.000892	0.0000	LB (BS1, BP7)	-
<i>CDKN2B</i> (NM_004936.4)	7689	F	17	GH	>10	c.115G>A, p.Asp39Asn	<i>Missense</i>	0.000085	0.0000	LB (PM2, BS2, BP4)	-
<i>DICER1</i> (NM_177438.3)	7911	M	35	Undefined	>10	c.21A>G, p.Gln7Gln	Sinónima	0.000008	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-

Gene (transcrito)	Número do doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (alteração ao nível do nucleótido, alteração ao nível da proteína) <sup>(a)</sup>	Efeito	Frequência alélica (GnomAD)	Frequência alélica em controlos Portugueses	Classificação ACMG (critérios) <sup>(b)</sup>	Estudo anterior (PMID)
	8243	F	34	ACTH	10	c.179C>T, p.Thr60Ile	Missense	0.000050	0.0000	VUS (PM2, BP6)	29399970
	7889	M	32	PRL	>40	c.1124C>G, p.Pro375Arg	Missense	0.000013	0.0017	VUS (PP2, BP6)	29474644
	8177	M	31	PRL	14	c.1124C>G, p.Pro375Arg	Missense	0.000013	0.0017	VUS (PP2, BP6)	29474644
	7680	F	17	PRL	12	c.1293G>A, p.Glu431Glu	Sinónima	0.000007	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7992	M	22	PRL	28	c.2337A>G, p.Thr779Thr	Sinónima	0.000046	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	29399970
	7971	F	22	GH/PRL/FSH	40	c.5184C>A, p.Ser1728Ser	Sinónima	0.000000	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7678	F	25	PRL	12	c.5504A>G, p.Tyr1835Cys	Missense	0.000066	0.0017	VUS (PM2, PP2, PP3, BP6)	-
	8342	F	36	ACTH	15	c.5550C>G, p.Pro1850Pro	Sinónima	0.000004	0.0000	LB (PM2, BP4, BP6)	-
<i>GNAS</i> (NM_000516.7)	7675	M	29	NFPA	40	c.18C>T, p.Asn6Asn	Sinónima	0.000103	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7685	F	32	GH	>10	c.136C>T, p.Leu46Leu	Sinónima	0.000014	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
<i>GPR101</i> (NM_054021.1)	8195	F	36	GH	>10	c.892G>A, p.Val298Ile	Missense	0.000638	0.0000	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	-
	8195	F	36	GH	>10	c.1170C>G, p.Pro390Pro	Sinónima	0.000000	0.0000	VUS (PM2, BP7)	-
<i>MAX</i> (NM_002382.5)	8115	F	25	NFPA	13	c.*7C>T	5' UTR	0.000375	0.0000	LB (BP6, BP7)	-
<i>MEN1</i> (NM_130799.2)	7850	M	32	GH/PRL	60	c.548G>A, p.Trp183Ter	Nonsense	0.000000	0.0000	P (PVS1, PP5, PM2)	9215690
	7971	F	22	GH/PRL/FSH	40	c.940_945delCGGGAT, p.Arg314_Asp315del	Deleção in-frame	0.000000	0.0000	LP (PM1, PM2, PM4)	-

Gene (transcrito)	Número do doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (alteração ao nível do nucleótido, alteração ao nível da proteína) <sup>(a)</sup>	Efeito	Frequência alélica (GnomAD)	Frequência alélica em controlos Portugueses	Classificação ACMG (critérios) <sup>(b)</sup>	Estudo anterior (PMID)
<i>MLH1</i> (NM_000249.4)	8330	F	28	ACTH	11	c.1080C>T, p.Ile360Ile	Sinónima	0.000145	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	8126	F	32	GH	22	c.1608G>A, p.Gln536Gln	Sinónima	0.000013	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7968	M	37	PRL	18	c.198C>T, p.Thr66Thr	Sinónima	0.000368	0.0000	LB (BP6, BP7)	9833759
	7920	M	18	ACTH	41	c.977T>C, p.Val326Ala	<i>Missense</i>	0.000440	0.0000	B (PM5, PP3, BS1, BS2, BP6)	8592341
	8095	F	33	NFPA	40	c.1217G>A, p.Ser406Asn	<i>Missense</i>	0.000843	0.0017	B (BS1, BP6)	9087566
<i>MSH2</i> (NM_000251.3)	7873	F	19	PRL	13	c.1808C>G, p.Pro603Arg	<i>Missense</i>	0.000092	0.0000	VUS (PM2, PP3, BP6)	11726306
	7764	F	33	PRL	30	c.725A>C, p.Asn242Thr	<i>Missense</i>	0.000000	0.0000	VUS (PM2, PP3)	-
	8218	M	37	NFPA	25	c.843A>T, p.Ser281Ser	Sinónima	0.000040	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7949	M	37	GH	25	c.972G>A, p.Gln324Gln	Sinónima	0.000053	0.0017	LB (BP6, BP7)	10777691
<i>MSH6</i> (NM_000179.3)	7642	F	20	PRL	>10	c.1571G>A, p.Arg524His	<i>Missense</i>	0.000013	0.0000	LP (PM2, PM5, PP3)	29659569
	7728	F	40	PRL	12	c.818G>T, p.Gly273Val	<i>Missense</i>	0.000007	0.0017	VUS (PM2, BP6)	33827469
	7814	F	14	PRL	12	c.840T>C, p.Ser280Ser	Sinónima	0.000000	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7934	F	36	PRL	>10	c.3015A>G, p.Arg1005Arg	Sinónima	0.000013	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	8128	M	38	ACTH	10	c.3024C>T, p.Thr1008Thr	Sinónima	0.000085	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7805	F	23	NFPA	35	c.3260C>A, p.Pro1087His	<i>Missense</i>	0.000099	0.0000	VUS (PM2, PP3, BP6)	27398995
	7684	F	24	PRL	12	c.3283C>T, p.Arg1095Cys	<i>Missense</i>	0.000059	0.0000	VUS (PM2, PP3, BP6)	28531214

Gene (transcrito)	Número do doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (alteração ao nível do nucleótido, alteração ao nível da proteína) <sup>(a)</sup>	Efeito	Frequência alélica (GnomAD)	Frequência alélica em controlos Portugueses	Classificação ACMG (critérios) <sup>(b)</sup>	Estudo anterior (PMID)
NF1 (NM_000267.3)	7845	F	40	GH	>10	c.3852G>A, p.Thr1284Thr	Synonymous	0.000046	0.0034	LB (PM2, BP6, BP7)	14574004
	8340	F	38	ACTH	>10	c.3961A>G, p.Arg1321Gly	Missense	0.000171	0.0000	VUS (PM2, PP3, BP6)	16940983
	7703	M	37	NFPA	30	c.3994T>C, p.Leu1332Leu	Sinónima	0.000000	0.0000	VUS (PM2, BP7)	-
	8278	M	36	FSH/LH	41	c.4002-10T>A	Intrónica	0.000296	0.0000	LB (BS1, BP4, BP6)	21056691
	8342	F	36	ACTH	15	c.4062G>T, p.Leu1354Leu	Sinónima	0.000000	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7827	M	28	GH/PRL	11	c.1176A>G, p.Gln392Gln	Sinónima	0.000019	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7637	F	20	GH	34	c.1186-4A>G	Intrónica	0.000014	0.0000	LB (PM2, BP4, BP6)	-
	8093	F	34	GH	22	c.1599C>G, p.Val533Val	Sinónima	0.000118	0.0017	LB (BP6, BP7)	-
	8195	F	36	GH	>10	c.1599C>G, p.Val533Val	Sinónima	0.000118	0.0017	LB (BP6, BP7)	-
	7770	M	33	GH	>10	c.3468C>T, p.Asn1156Asn	Sinónima	0.000700	0.0050	B (BS1, BP6)	23460398
	8199	F	37	PRL	>10	c.3468C>T, p.Asn1156Asn	Sinónima	0.000700	0.0050	B (BS1, BP6)	23460398
	7632	F	25	GH	25	c.4686A>G, p.Glu1562Glu	Sinónima	0.000184	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	21354044
	8115	F	25	NFPA	13	c.5694G>A, p.Glu1898Glu	Sinónima	0.000085	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	33673681
	8319	F	24	GH	>10	c.7347T>C, p.Asn2449Asn	Sinónima	0.000519	0.0000	B (BS1, BP6, BP7)	-
	7958	M	38	GH	>40	c.7978A>G, p.Ile2660Val	Missense	0.000283	0.0000	LB (PP2, BS2, BP4, BP6)	16944272
7675	M	29	NFPA	40	c.8044C>T, p.Leu2682Leu	Sinónima	0.000000	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-	

Gene (transcrito)	Número do doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (alteração ao nível do nucleótido, alteração ao nível da proteína) <sup>(a)</sup>	Efeito	Frequência alélica (GnomAD)	Frequência alélica em controlos Portugueses	Classificação ACMG (critérios) <sup>(b)</sup>	Estudo anterior (PMID)
<i>PMS2</i> (NM_000535.7)	8131	F	24	NFPA	22	c.255G>A, p.Leu85Leu	Sinónima	0.000112	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7850	M	32	GH/PRL	60	c.383C>T, p.Ser128Leu	<i>Missense</i>	0.000673	0.0000	B (BA1, BS2, BP6)	20205264
	7850	M	32	GH/PRL	60	c.830C>A, p.Thr277Lys	<i>Missense</i>	0.000417	0.0000	B (BS1, BP6)	17417778
	7835	F	30	GH	15	c.831G>A, p.Thr277Thr	Sinónima	0.000066	0.0000	LB (BP6, BP7)	-
	8072	M	37	GH	>10	c.1004A>G, p.Asn335Ser	<i>Missense</i>	0.000256	0.0000	LP (PP3, PM2, BP6)	24549055
	8094	F	40	PRL	31	c.1004A>G, p.Asn335Ser	<i>Missense</i>	0.000256	0.0000	LP (PP3, PM2, BP6)	24549055
	8095	F	33	NFPA	40	c.1004A>G, p.Asn335Ser	<i>Missense</i>	0.000256	0.0000	LP (PP3, PM2, BP6)	24549055
	7648	M	25	PRL	>20	c.1458delC, p.Asp486GlufsTer109	Deleção <i>frameshift</i>	0.000000	0.0000	LP (PVS1, PM2)	-
	7833	M	29	PRL	24	c.1533G>A, p.Thr511Thr	Sinónima	0.000112	0.0000	LB (BP6, BP7)	31159747
	7633	F	28	GH	>10	c.1560G>C, p.Ala520Ala	Sinónima	0.000000	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
<i>PRKAR1A</i> (NM_002734.5)	7820	F	37	PRL	20	c.-6-29A>G	Intrónica	0.000000	0.0000	VUS (PM2, BP7)	-
	8198	M	36	PRL	39	c.101C>G, p.Ser34Cys	<i>Missense</i>	0.000007	0.0000	VUS (PM2, PP2)	-
	7868	F	39	GH	18	c.156A>G, p.Glu52Glu	Sinónima	0.000118	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7827	M	28	GH/PRL	11	c.221G>A, p.Arg74His	<i>Missense</i>	0.000414	0.0084	B (PM5, PP2, BS1, BS2, BP6)	29264456
	7839	M	20	NFPA	17	c.662T>A, p.Val221Glu	<i>Missense</i>	0.000000	0.0000	VUS (PM2, PP2, PP3)	-
<i>RET</i> (NM_020975.4)	8014	F	21	PRL	14	c.96G>A, p.Ser32Ser	Sinónima	0.000033	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	22174939

Gene (transcrito)	Número do doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (alteração ao nível do nucleótido, alteração ao nível da proteína) <sup>(a)</sup>	Efeito	Frequência alélica (GnomAD)	Frequência alélica em controlos Portugueses	Classificação ACMG (critérios) <sup>(b)</sup>	Estudo anterior (PMID)
SDHA (NM_004168.3)	8078	M	33	PRL	20	c.785T>C, p.Val262Ala	Missense	0.000263	0.0000	VUS (PM2, PP3, BP6)	11955539
	8253	M	16	PRL	26	c.1063+9G>A	Intrónica	0.000132	0.0000	VUS (PM2, BP6)	7704557
	8051	M	18	PRL	47	c.1462A>T, p.Thr488Ser	Missense	0.000007	0.0017	VUS (PM2)	25425582
	8298	M	36	NFPA	20	c.1529C>T, p.Ala510Val	Missense	0.000184	0.0017	B (BS1, BP6)	20103606
	7850	M	32	GH/PRL	60	c.1942G>A, p.Val648Ile	Missense	0.000072	0.0050	VUS (PM2, BP6)	12466368
	7643	M	26	NFPA	>10	c.2052G>A, p.Pro684Pro	Sinónima	0.000241	0.0017	LB (BP6, BP7)	28946813
	8057	F	32	NFPA	20	c.3139C>T, p.Pro1047Ser	Missense	0.000007	0.0000	VUS (PM2)	-
	8215	F	20	GH	20	c.1242C>T, p.Pro414Pro	Sinónima	0.000013	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	7862	F	16	PRL	10	c.1409G>A, p.Ser470Asn	Missense	0.000000	0.0000	VUS (PM2, BP4)	-
	7934	F	36	PRL	>10	c.1569T>C, p.Ala523Ala	Sinónima	0.000171	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	17376234
SDHAF2 (NM_017841.2)	7685	F	32	GH	>10	c.1929C>T, p.Pro643Pro	Sinónima	0.000033	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
	8130	F	39	ACTH	14	c.424G>C, p.Asp142His	Missense	0.000000	0.0000	VUS (PM2)	-
SDHB (NM_003000.3)	8092	F	40	GH	27	c.496C>T, p.Arg166Cys	Missense	0.000039	0.0000	VUS (PM2)	-
	7839	M	20	NFPA	17	c.138A>G, p.Arg46Arg	Sinónima	0.000000	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	-
SDHC (NM_003001.5)	7887	F	21	PRL	20	c.379A>C, p.Ile127Leu	Missense	0.000000	0.0000	LP (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	23083876
	8430	M	35	PRL	45	c.179+10G>A	Intrónica	0.000346	0.0000	B (BS1, BS2, BP6)	-
SDHD (NM_003002.3)	8259	F	19	GH	>10	c.282C>G, p.Ser94Ser	Sinónima	0.000036	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	32688340

Gene (transcrito)	Número do doente (ID)	Sexo	Idade de diagnóstico (anos)	Tipo de adenoma (hormonas produzidas)	Tamanho do adenoma (mm)	Variante (alteração ao nível do nucleótido, alteração ao nível da proteína) <sup>(a)</sup>	Efeito	Frequência alélica (GnomAD)	Frequência alélica em controlos Portugueses	Classificação ACMG (critérios) <sup>(b)</sup>	Estudo anterior (PMID)
<i>TP53</i> (NM_000546.6)	8164	F	37	PRL	>10	c.31G>A, p.Glu11Lys	<i>Missense</i>	0.000007	0.0000	LB (BS3, PM2, BP6)	30352134
	7674	F	31	GH	>10	c.319T>C, p.Tyr107His	<i>Missense</i>	0.000269	0.0000	B (BS1, BS3, BP6)	25896519
	6907	M	13	GH/TSH	>10	c.467G>A, p.Arg156His	<i>Missense</i>	0.000026	0.0000	VUS (PS4, BS3, PM2, BS2, PM5, PM1)	9667734
	6907	M	13	GH/TSH	>10	c.582T>C, p.Leu194Leu	Sinónima	0.000020	0.0000	LB (PM2, BP6, BP7)	11454518
	8245	F	18	PRL	15	c.642T>G, p.His214Gln	<i>Missense</i>	0.000033	0.0000	VUS (PM2, PM5, BP6)	23259501
	8079	F	36	ACTH	14	c.845G>A, p.Arg282Gln	<i>Missense</i>	0.000013	0.0000	LP (PM1, PM2, PM5, PP3, PP5)	17606709
	8360	F	29	PRL	15	c.869G>A, p.Arg290His	<i>Missense</i>	0.000152	0.0000	B (BS3, PM2, PM5, BP6)	8829653
<i>USP8</i> (NM_005154.5)	7868	F	39	GH	18	c.498+9A>G	Intrónica	0.000033	0.0000	VUS (PM2)	-
	7889	M	32	PRL	>40	c.498+9A>G	Intrónica	0.000033	0.0000	VUS (PM2)	-
	7656	M	26	GH	>10	c.1972-7A>G	Intrónica	0.000014	0.0000	VUS (PM2, BP4)	-
<i>VHL</i> (NM_000551.3)	7943	M	29	PRL	30	c.114C>T, p.Ser38Ser	Sinónima	0.000039	0.0017	LB (PM2, BP6, BP7)	11536052
	6906	F	17	PRL	>10	c.154G>T, p.Glu52Ter	<i>Nonsense</i>	0.000026	0.0000	LP (PVS1, PM2)	21463266
	8226	M	28	PRL	14	c.183C>G, p.Pro61Pro	Sinónima	0.000762	0.0000	B (BS1, BS2, BP6, BP7)	10408776
	7792	M	18	TSH	10	c.586A>G, p.Lys196Glu	<i>Missense</i>	0.0000	0.0000	P (PM1, PM2, PP2, PP3, PP5)	23859443

id, identificação; F, mulher; M, homem; ACTH, hormona adrenocorticotrópica; FSH, hormona foliculo-estimulante; GH, hormona do crescimento; LH, hormona luteinizante; NFPA, adenomas hipofisários não funcionais; PRL, prolactina; TSH, hormona estimulante da tiroide; mm, milímetros; GnomAD, Base de dados de agregação de genomas (v3.1.2).

(a) Todas as variantes eram heterozigóticas. (b) A classificação de variantes do American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (P, patogénica; LP, provavelmente patogénica; B, benigna) baseou-se na evidência de patogenicidade [muito forte (PVS1), moderada (PM1-6) ou de apoio (PP1-5)] ou de impacto benigno [independente (BA), forte (BS1-4) ou de apoio (BP1-7)]. As classificações ACMG foram baseadas na ferramenta de interpretação de variantes baseada na Web Franklin (Genoox Ltd, <https://franklin.genoox.com/>), acedida em 21 de dezembro de 2023. PMID, identificador PubMed. \* Publicação dos autores que incluiu o mesmo doente.



## **Anexo 10 – Breve *Curriculum vitae***

Leonor Isabel Mesquita Gaspar, 32 anos, licenciada em Biotecnologia pela Universidade da Beira Interior (Julho 2013 – 13 valores). Mestre em Biotecnologia pela mesma Universidade com a dissertação “Proteomic analysis of the human vitreous humor in Retinal Detachment” sob orientação da Professor Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz (Universidade da Beira Interior). Aprovada com Muito Bom (17 valores) em Novembro de 2015. Da dissertação de mestrado foi publicado o artigo:

### **Proteome analysis of vitreous humor in retinal detachment using two different flow-charts for protein fractionation.**

Leonor M. Gaspar\*, Fátima M. Santos\*, Tânia Albuquerque, João P. Castro-de Sousa, Luís A. Passarinha, Cândida T. Tomaz

Journal Chromatography B 1061-1062, 334-341 (2017). DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.07.049

Investigadora (Janeiro a Dezembro de 2016) no Centro de Investigação em Ciência da Saúde da Universidade da Beira Interior, no projeto “Study in the area of vitreous proteomics of patients with different eye pathologies”. Neste projeto foram produzidas as seguintes publicações:

### **iTRAQ Quantitative Proteomic Analysis of Vitreous from Patients with Retinal Detachment.**

Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Sergio Ciordia, Ana S. Rocha, João Paulo Castro e Sousa, Alberto Paradela, Luís A. Passarinha, Cândida Teixeira Tomaz

International Journal of Molecular Sciences 19, 1–22 (2018). DOI: 10.3390/ijms19041157

### **Refinement of two-dimensional electrophoresis for vitreous proteome profiling using an artificial neural network.**

Fátima M. Santos, Tânia Albuquerque, Leonor M. Gaspar, João M. L. Dias, João P. Castro e Sousa, Alberto Paradela, Cândida T. Tomaz, Luís A. Passarinha

Analytical and Bioanalytical Chemistry 411, 5115-5126 (2015). DOI: 10.1007/s00216-019-01887-y

Investigadora bolsreira (Janeiro de 2017 – Novembro de 2018) no Biocant – Centro de Inovação em Biotecnologia, em Cantanhede, no projeto “BioClarVino II: Desenvolvimento de extratos proteicos de levedura desidratados para estabilização e clarificação de vinhos” sob orientação do Dr. João Simões. Deste projeto foi publicado o artigo:

**Development of Potential Yeast Protein Extracts for Red Wine Clarification and Stabilization**

Leonor M. Gaspar, Amadeu Machado, Rute Coutinho, Susana Saraiva, Raquel Santos, Adriana Xavier, Manuel Figueiredo, Victor Freitas, Maria de Fátima Teixeira, Filipe Centeno, João Simões

Frontiers in Microbiology 10, 2310 (2019). DOI: 10.3389/fmicb.2019.02310

Comunicações orais científicas efetuadas no decorrer do percurso académico e profissional:

**Proteomic analysis of the human vitreous humor in Retinal Detachment**

Leonor M. Gaspar, Fátima M. Santos, Luís A. Passarinha, Cândida T. Tomaz; X Annual CICS-UBI Symposium, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, Julho 2015.

**iTRAQ quantitative proteomics in analysis of vitreous humor from patients with Retinal Detachment.**

Leonor M. Gaspar, Fátima M. Santos, Sergio Ciordia, Ana S. Rocha, João P. Castro-de-Sousa, Alberto Paradela, Luís A. Passarinha, Cândida T. Tomaz; XI Annual CICS-UBI Symposium, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, Julho 2016.

**Improvement of bidimensional electrophoretic experimental conditions for vitreous humor protein analysis using an artificial neural network.**

Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Tânia Albuquerque, João P. Castro-de Sousa, Alberto Paradela, Cândida T. Tomaz, Luís A. Passarinha; II Congress in Health Sciences Research: Towards Innovation and Entrepreneurship (UBI-HSR): Trends in Biotechnology for Biomedical Applications, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, Maio 2017.

**Enhancement of bidimensional electrophoretic operation conditions by an artificial neural network for vitreous humor protein analysis.**

Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Tânia Albuquerque, João M. L. Dias, João P. Castro-de-Sousa, Alberto Paradela, Cândida T. Tomaz, Luís A. Passarinha; V International Conference on Analytical Proteomics (ICAP), Costa da Caparica, Portugal, Julho 2017.

**Quantitative analysis of vitreous from patients with retinal detachment using iTRAQ-based proteomics.**

Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Sergio Ciordia, Ana S. Rocha, João Paulo Castro e Sousa, Alberto Paradela, Luís A. Passarinha, Cândida Teixeira Tomaz; XIII Annual CICS-UBI Symposium, Covilhã, Portugal, Julho 2018.

**Development of potential yeast protein extracts for wine clarification and stabilization**

Leonor M. Gaspar, Amadeu Machado, Rute Coutinho, Adriana Xavier, Manuel Figueiredo, Victor Freitas, Maria de Fátima Teixeira, Filipe Centeno, João Simões; XXI Jornadas de Biologia de Leveduras - Professor Nicolau van Uden, Universidade do Minho, Braga, Julho 2018.

**Development of an artificial neural network for vitreous protein profiling by bidimensional electrophoresis.**

Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Tânia Albuquerque, João M.L. Dias, João P. Castro-de-Sousa, Alberto Paradela, Cândida T. Tomaz, Luís A. Passarinha; 38th International Symposium on the Purification of Proteins, Peptides and Polynucleotides (ISPPP), Berlim, Alemanha, Novembro 2018.

Comunicações científicas, em poster, efetuadas no decorrer do percurso académico e profissional:

**iTRAQ quantitative proteomics in analysis of vitreous humor from patients with retinal detachment.**

Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Ana S. Rocha, Sergio Ciordia, João P. Castro-de-Sousa, Alberto Paradela, Luís A. Passarinha, Cândida T. Tomaz; IV International Conference on Analytical Proteomics (ICAP), Costa da Caparica, Portugal, Setembro 2015.

**Proteomic analysis of the human vitreous humor in retinal detachment.**

Leonor M. Gaspar, Fátima M. Santos, João P. Castro e Sousa, Luís A. Passarinha, Cândida T. Tomaz; International Conference on Analytical Proteomics (ICAP) 2015, Costa da Caparica, Portugal, Setembro 2015.

**Improvement of two-dimensional gel electrophoresis data for proteomic profiling of Escherichia coli cells.**

Andreia G. Amaral, Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Mafalda Espírito Santo, João A. Queiroz, Luís A. Passarinha; XI Annual CICS-UBI Symposium, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, Julho 2016.

**Análise proteómica de amostras de humor vítreo no descolamento de retina.**

Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Tânia Albuquerque, João P. Castro-de Sousa, Luís A. Passarinha, Cândida T. Tomaz; V Ciclo de Conferências da Faculdade de Ciências, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, Janeiro 2017.

**Proteomic and metabolomic characterization of pcDNA-FLAG-p53 biosynthesis in Escherichia coli using agro-food nutritive extracts.**

Andreia G. Amaral, Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, José A. Teixeira, João A. Queiroz, Luís A. Passarinha; II Congress in Health Sciences Research: Towards Innovation and Entrepreneurship (UBI-HSR): Trends in Biotechnology for Biomedical Applications, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, Maio 2017.

**ITRAQ quantitative analysis of vitreous in Proliferative Diabetic Retinopathy.**

Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Sergio Ciordia, João P. Castro-de-Sousa, Alberto Paradela, Luís A. Passarinha, Cândida T. Tomaz; Dia da Ciência, Centro de congressos de Lisboa, Lisboa, Portugal, Julho 2017.

**Proteomic and metabolomic classification of pcDNA-FLAG-p53 biosynthesis in Escherichia coli using agro-food nutritive extracts.**

Andreia G. Amaral, Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, José A. Teixeira, João A. Queiroz, Luís A. Passarinha; V International Conference on Analytical Proteomics (ICAP), Costa da Caparica, Portugal, Julho 2017.

**Proteome of vitreous humor in retinal detachment.**

Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Sergio Ciordia, João P. Castro-de-Sousa, Alberto Paradela, Luís A. Passarinha, Cândida T. Tomaz; XII Annual CICS-UBI Symposium, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, Julho 2017.

**Enhancement of bidimensional electrophoretic operation conditions by an artificial neural network for vitreous humor protein analysis.**

Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Tânia Albuquerque, João M.L. Dias, João P. Castro-de-Sousa, Alberto Paradela, Cândida T. Tomaz, Luís A. Passarinha; V International Conference on Analytical Proteomics (ICAP), Costa da Caparica, Portugal, Julho 2017.

**Characterization of proteome of vitreous humor in retinal detachment using different experimental setups.**

Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Sergio Ciordia, João P. Castro-de-Sousa, Alberto Paradela, Luís A. Passarinha, Cândida T. Tomaz; 16th Human Proteome Organisation World Congress (HUPO), Dublin, Irlanda, Setembro 2017.

**Development and evaluation of potential yeast protein extracts for red wines clarification and stabilization**

Leonor M. Gaspar, Rute Coutinho, Adriana Xavier, Manuel Figueiredo, Victor Freitas, Maria de Fátima Teixeira, Filipe Centeno, João Simões; MICROBIOTEC'17: Congress of Microbiology and Biotechnology, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal, Dezembro 2017.

**Improvement of bidimensional electrophoretic conditions for vitreous protein analysis using an artificial neural network.**

Fátima M. Santos, Leonor M. Gaspar, Tânia Albuquerque, João M.L. Dias, João P. Castro-de-Sousa, Alberto Paradela, Cândida T. Tomaz, Luís A. Passarinha; 12th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences (ESBES), Lisboa, Portugal, Setembro 2018.

Como aluna de doutoramento do terceiro ciclo de Biomedicina na Universidade da Beira Interior (iniciado no ano letivo de 2019/2020 e a finalizar no ano letivo de 2023/2024), com bolsa da FCT: SFRH/BD/147160/2019, foram publicados os seguintes artigos:

**Low frequency of *AIP* mutations in patients with young-onset sporadic pituitary macroadenomas**

Leonor M. Gaspar, Catarina I. Gonçalves, Catarina Saraiva, Luísa Cortez, Cláudia Amaral, Ema Nobre, Manuel C. Lemos

Journal of Endocrinological Investigation 46, 2299-2307 (2023). DOI: 10.1007/s40618-023-02083-7

**A Common Variant in the *CDK8* Gene Is Associated with Sporadic Pituitary Adenomas in the Portuguese Population: A Case-Control Study**

Leonor M. Gaspar, Catarina I. Gonçalves, Fernando Fonseca, Davide Carvalho, Ana Palha, Inês F. Barros, Ema Nobre, João S. Duarte, Cláudia Amaral, Olinda Marques, Bernardo D. Pereira, Manuel C. Lemos

No decorrer do projeto de doutoramento foram apresentadas as seguintes comunicações:

**Mutações no gene *AIP* em doentes portugueses jovens com macroadenomas hipofisários esporádicos**

Leonor M. Gaspar, Catarina I. Gonçalves, Catarina Saraiva, Luísa Cortez, Cláudia Amaral, Ema Nobre, Manuel C. Lemos; Congresso Português de Endocrinologia, Vilamoura, Portugal, Fevereiro 2023. **Vencedor de Prémio de Casuística**

***AIP* mutations in Portuguese patients with young-onset isolated pituitary adenomas (poster)**

Leonor M. Gaspar, Catarina I. Gonçalves, Catarina Saraiva, Luísa Cortez, Cláudia Amaral, Ema Nobre, Manuel C. Lemos; European Human Genetics Conference Hybrid Conference Glasgow, Escócia, Reino Unido, Junho 2023.

***AIP* mutations in young portuguese patients with sporadic pituitary macroadenomas**

Leonor M. Gaspar, Catarina I. Gonçalves, Catarina Saraiva, Luísa Cortez, Cláudia Amaral, Ema Nobre, Manuel C. Lemos; XVIII International CICS-UBI Symposion, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, Julho 2023.