

## DIAGNOSTICO MOLECULAR DE NEOPLASIA ENDOCRINA MULTIPLE TIPO 1 (MEN-1) EN UNA FAMILIA ARGENTINA AFECTADA

MAGDALENA GUADAGNA<sup>1</sup>, MARTA MIGLIANO<sup>1</sup>, JORGE HERRERA<sup>2</sup>, PATRICIA RODRIGUEZ<sup>1</sup>, JOSE SCIORRA<sup>1</sup>,  
ANALIA ALFIERI<sup>1</sup>, MIRTA CORINO<sup>1</sup>, LILIANA COSTA<sup>1</sup>, BEATRIZ KAROTHY<sup>1</sup>, JOSE ORTIZ<sup>1</sup>, MARIO TARRUELLA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Endocrinología y Departamento de Análisis Bioquímicos, Hospital Nacional Alejandro Posadas, Ramos Mejía;

<sup>2</sup> Centro de Salud, Hospital Guillermo Rawson, San Juan

**Resumen** La Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1 (MEN-1) es una enfermedad genética autosómica dominante caracterizada por la presencia de neoplasias de paratiroides, páncreas endocrino e hipófisis anterior. El locus del MEN-1 se localizó en el cromosoma 11 banda q13. El análisis de ligamiento por restricción (A.L.) y las determinaciones hormonales permiten el diagnóstico precoz de los individuos afectados. Se estudió en su lugar de residencia a los veinte integrantes vivos de la primera, segunda y tercera generación de una familia con MEN-1, para determinar la presencia de marcadores genéticos moleculares en el locus del gen MEN-1 11q13, por A.L. y detectar en la tercera generación portadores presintomáticos por A.L. y enfermos por determinaciones hormonales y evaluación clínica. Se hallaron dos marcadores polimórficos a ambos lados de locus del MEN-1: PYGM y D11S987, haplotipos segregados por los dos integrantes enfermos de la segunda generación, heredados del padre, en un enfermo y un portador presintomático de la tercera generación. El resto de los integrantes no heredó el alelo ligado al MEN-1 con una confiabilidad del 99%. Con respecto a los hallazgos clínicos y de laboratorio encontramos en la tercera generación dos portadores de los marcadores moleculares del MEN-1, uno con litiasis renal, parathormona (PTH), prolactina (PRL) y glucagon elevados y otro con PTH elevada asintomático. Entre los que heredaron el alelo normal, uno presentó glucagon elevado, otro gastrina elevada y otro PTH elevada, todos asintomáticos. Establecimos el diagnóstico molecular de la familia estudiada y se detectó un portador presintomático. De acuerdo a la literatura y nuestros hallazgos, la precisión del diagnóstico molecular nos permitiría excluir del seguimiento a los portadores del alelo normal.

**Abstract** *Molecular diagnosis in an Argentine family with multiple endocrine neoplasia type-1 (MEN-1).*

MEN-1 is a hereditary autosomal dominant syndrome characterized by the involvement of parathyroid glands, pancreatic islet cells and anterior pituitary gland. Today molecular genetics permit gene carrier analysis to compare the data obtained with the clinical biochemical tests. The twenty living members of the first, second and third generation of a family with MEN-1 were studied to determine the presence of genetic markers in MEN-1 loci 11q13, by linkage analysis and in affected individuals by biochemical tests and clinical examination. Two very informative polymorphic markers immediately flanking the MEN-1 gene on chromosome 11 band q13 were detected: PYGM and D11S987, haplotypes segregated by two members of the second generation, inherited from their father and two of the third generation: the affected one and one presymptomatic. The third generation had the affected member with renal stones and elevated PTH, PRL and glucagon. The presymptomatic carrier of MEN-1 allele showed elevated PTH. Among the members who inherited the normal allele we found one with elevated gastrin, one with elevated glucagon and one with elevated PTH, all asymptomatic. Of one Argentine family studied, molecular diagnosis allowed us to detect one presymptomatic carrier in the members at risk. As suggested by the available literature, accuracy of molecular diagnosis seems to make it the test of choice to exclude those members at risk for MEN-1 inheriting the normal allele.

**Key words:** MEN-1, genetic linkage, hereditary neoplasia, cromosoma 11

El síndrome de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1 (MEN-1), es una enfermedad hereditaria con alta penetrancia, que se caracteriza por asociación de tumores endocrinos. Erdheim, en 1903, comunica el primer caso de MEN-1, en un paciente con agrandamiento de

las cuatro glándulas paratiroides y adenoma eosinofílico de la pituitaria<sup>1</sup>.

El MEN-1 es una enfermedad poco frecuente, autosómica dominante que predispone a los individuos al desarrollo de neoplasias de glándulas paratiroides, páncreas endocrino e hipófisis anterior<sup>2</sup>. Además se describe la presencia de lipomas viscerales y cutáneos, carcinoides bronquiales e intestinales, adenomas tiroideos, bocios difusos y neoplasias de la corteza adrenal<sup>3,4</sup>.

Recibido: 14-I-1998

Aceptado: 13-V-1998

Dirección postal: Dra. Magdalena Guadagna, Bolívar 362, 1704 Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina  
Fax: 54-1-654-8857

La prevalencia de la enfermedad se estima entre 0.02 y 0.175 por mil, según variaciones geográficas<sup>5</sup>.

La transmisión genética y familiar del MEN-1 fue identificada por Wermer en 1964 quien sugirió que un gen dominante autosómico controla los rasgos clínicos<sup>6</sup>.

El gen causante de este síndrome ha sido localizado en el brazo largo del cromosoma 11, banda q 13 por estudio de ligamiento genético realizado en familias afectadas<sup>7</sup>.

El MEN-1 puede desarrollarse muy lentamente motivo por el cual la descendencia no debe ser excluida como portador genético hasta la edad de 35 años, a pesar de determinaciones bioquímicas de pesquisa normales<sup>8</sup>.

En la actualidad la genética molecular permite realizar mediante el análisis de ligamiento por restricción, la detección de portadores genéticos de la enfermedad.

En relación a una familia afectada, los objetivos del presente trabajo consistieron en:

- 1) Determinar la presencia de marcadores genéticos moleculares en el locus del gen MEN-1 11q13, por análisis de ligamiento por restricción (A.L.).
- 2) Detectar en la tercera generación de la familia a los portadores presintomáticos por A.L. y a los enfermos por examen clínico y determinaciones hormonales.

**Material y métodos**

*Población estudiada*

Familia de 20 integrantes, residente en una zona rural de una provincia argentina (Fig. 1)<sup>9</sup>.

Se consideró enfermo a aquel integrante que era portador de hiperparatiroidismo, tumor pancreático y/o tumor hipofisario. (Tabla 1).

Los miembros enfermos se asisten en nuestro Hospital y la detección de portadores se realizó en el lugar de residencia de la familia. Para ello se confeccionó una Historia Clínica con interrogatorio y examen clínico de todos los integrantes.

*Análisis de ligamiento por restricción*

Se buscaron marcadores polimórficos cercanos al gen del MEN-1, cromosoma 11 banda q13.

La presencia de dos enfermos de la segunda generación y uno de la tercera, hizo posible realizar el análisis de ligamiento por restricción (linkage analysis).

Se extrajeron muestras de sangre periférica a toda la población con excepción de la integrante [18] de la tercera generación. (Fig. 1).

Se extrajo ADN de los leucocitos por procedimientos standard. Se ampliaron los locus marcadores del ADN mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR). El producto del PCR fue separado por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8-10% que mueve más rápidamente los fragmentos cortos del ADN a través del gel que los largos y fueron visualizados por tinción con plata de acuerdo al protocolo de manufactura (silver Staining Kit, Bio-Rad).

El análisis de ligamiento por restricción se realizó usando la versión 5.1 del Linkage package. El score de Lod para dos puntos del análisis de ligamiento y la predicción de portadores genéticos de riesgo fue calculado usando el programa MLINK, con los siguientes parámetros: la frecuencia del gen mutante para el MEN-1 fue establecida en 0.0001 y su penetrancia en 95%, la tasa de recombinación en hombres y mujeres fue establecida por igual.

Se realizó el genotipo de los siguientes marcadores microsatelitales del ADN: D11S913 y D11S987 basados en la referencia de Kytola et al.<sup>10</sup>. Además se utilizó otro marcador: PYGM Ca3-2/PYGM CAS (Accession ID # GDB: 186889).

*Laboratorio*

En toda la población estudiada se realizó radiología simple de silla turca y se determinaron glucemia y perfil fosfocálcico; además, se efectuaron determinaciones en suero de PTH e

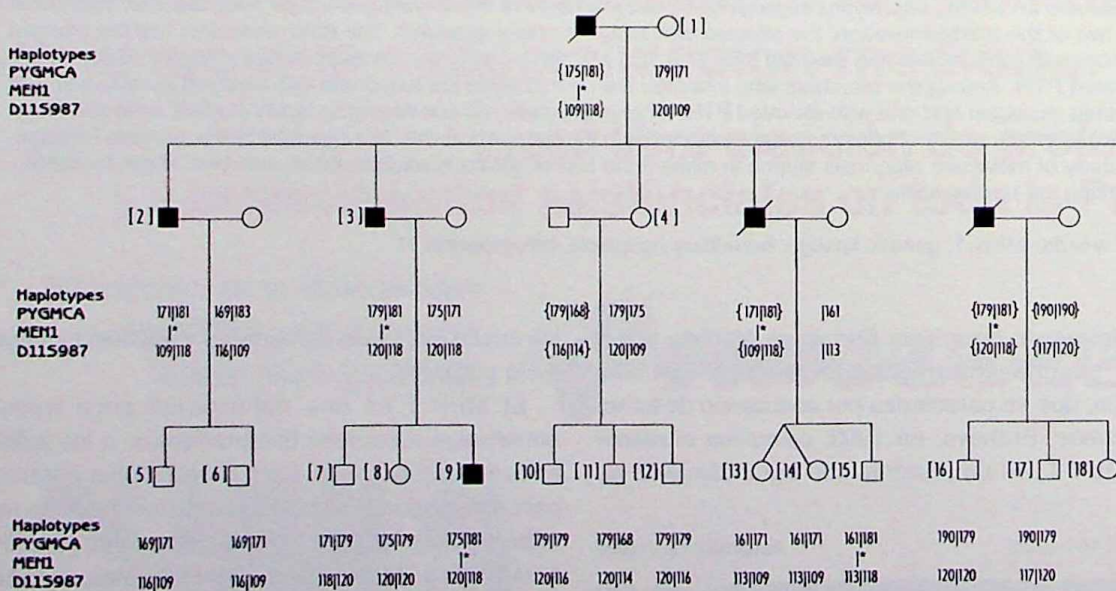


Fig. 1.- Arbol familiar ■ ● Enfermo. = Fallecido. { } Dato deducido. \* Afectado genético

TABLA 1.- Neoplasia endocrina múltiple tipo 1. Características de la población

	Número	Edad $\bar{x}$ años	Sexo		Población estudiada	
			Femenino	Masculino	Enferma	No enferma
1ª Generación	1	87	1	-	-	-
2ª Generación	3	56,3	1	2	2	1
3ª Generación	14	27,5	4	10	1	13
Total	18	-	6	12	3	14

IGF1 por ensayo inmunoradiométrico (Nichols Institute Diagnostics), de LH, FSH, PRL, cortisol, TSH e insulinemia por quimioluminiscencia (Access Sanofi-Pasteur) y de glucagon y gastrina por radioinmunoensayo.

## Resultados

### Historia Clínica de la familia

Por interrogatorio familiar se pudo inferir que el varón fallecido de la primera generación habría estado enfermo de MEN-1 (tumor pancreático).

Por historia clínica se constató un integrante de la tercera generación [9] con antecedente de litiasis renal y otro [8] con síndrome diarreico crónico y aplasia medular. Los miembros enfermos de la segunda generación (n = 5) presentaron 100% tumor pancreático (un integrante presentó dos tumores pancreáticos: un Vipoma y un gastrinoma), 80% hiperparatiroidismo, 60% prolactinoma y un adenoma folicular tiroideo como hallazgo quirúrgico.

### Análisis de ligamiento por restricción

Se detectaron dos marcadores polimórficos a ambos lados del locus del MEN-1, cromosoma 11 banda q13 PYGM (181 bp) y D11S987 (118 bp) (Fig. 2), haplotipos cosegregados por los dos integrantes enfermos de la segunda generación (derivados de su padre) y por un enfermo y un integrante de la población estudiada de la tercera generación con una precisión de 99%. (Fig. 1).

El resto de la familia estudiada no era portadora del alelo mutante del MEN-1 con una confiabilidad del 99%.

### Laboratorio

En la tercera generación los resultados de glucemia, perfil fosfocálcico, IGF1, insulinemia y radiología de silla turca fueron normales.

La PTH estuvo elevada en el enfermo [9] y en la población estudiada en el integrante [15] y en el [17] aunque este último presentó alelos no ligados al MEN-1.

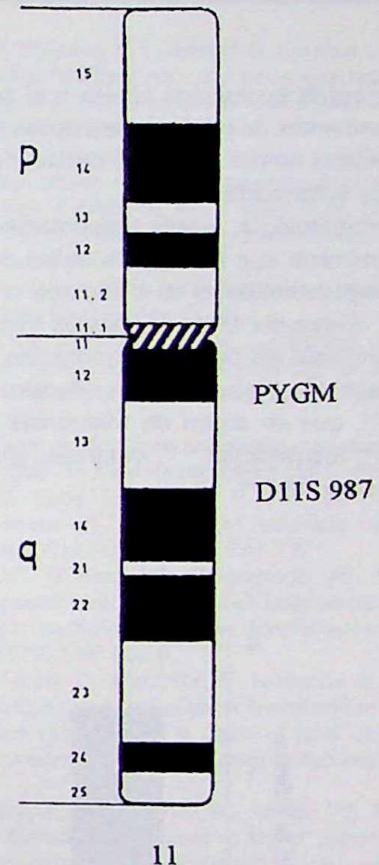


Fig. 2.- Descripción del cromosoma 11 y alelos de MEN-1 hallados

El glucagon estuvo elevado en el enfermo [9] y en un integrante con alelos no ligados al MEN-1 [7], la gastrina en un integrante con alelos no ligados al MEN-1 [8], y la prolactina en el enfermo [9]. (Tabla 2).

## Discusión

En el síndrome de MEN-1, por su carácter hereditario autosómico dominante, es extremadamente impor-

TABLA 2.- Hallazgos bioquímicos anormales

	Nro. Integrante	PTH vn 10-65 pg/ml	Glucagón vn 28-250 pg/ml	Gastrina vn 28-115 µg/ml	PRL vn h. 13,13 ng/ml
Enfermo	9	72,4	348		16,32
No enfermos					
* Portador genético	15	68			
* No portador genético	7		278		
	8			218	
	17	67,1			

tante realizar la evaluación clínica y el seguimiento de los descendientes de primer orden de las personas afectadas, quienes tienen un riesgo cercano al 50% de desarrollar la enfermedad.

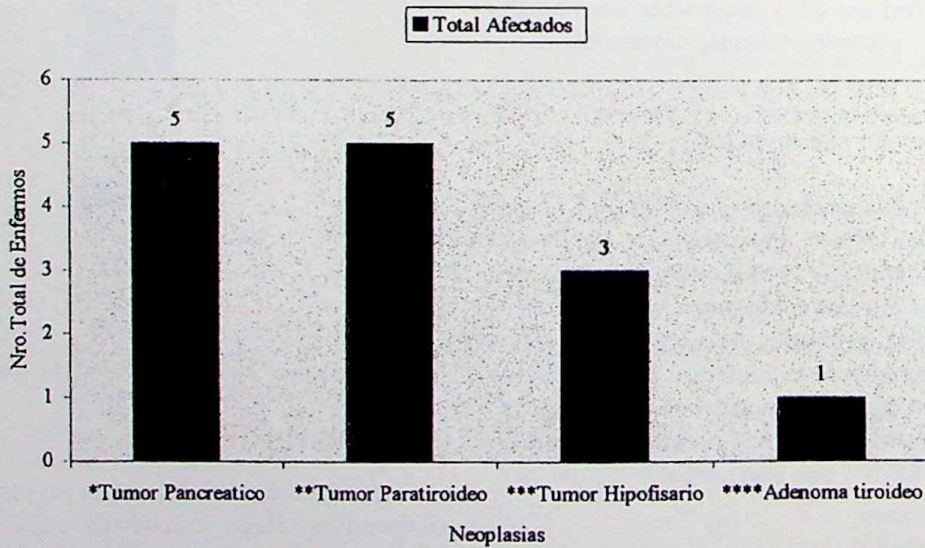
La sintomatología, puede presentarse en la adolescencia temprana, o a lo largo de varias décadas<sup>11</sup>.

El hiperparatiroidismo es a menudo la primera manifestación clínica del MEN-1 y la más frecuente (95%)<sup>12, 14</sup>. La neoplasia de páncreas endocrino y/o del tracto gastrointestinal es la segunda manifestación en este síndrome<sup>14, 16</sup>, que en orden de frecuencia presenta gastrinomas<sup>15</sup>, insulinomas<sup>16, 17</sup>, vipomas, glucagonomas y neurotensinomas<sup>18-20</sup>.

El adenoma hipofisario más común es el prolactínico, y menos frecuentes son los tumores secretores de STH, ACTH y TSH<sup>21</sup>.

En la familia estudiada la incidencia de tumor pancreático, a diferencia de otras publicaciones, es igual a la de enfermedad paratiroidea. (Fig. 3).

Se ha propuesto para el desarrollo de tumores en el MEN-1 el modelo de mutación en dos tiempos descrita por Knudson<sup>22</sup>, que si bien no es la única hipótesis, es la más aceptada. La misma sostiene que, al igual que para el retinoblastoma familiar causado por la herencia del gen Rb anormal, en estos tumores la primera de las dos mutaciones recesivas es heredada por línea germinal,



\* 83 % : 3 gastrinomas  
1 vipoma  
1 insulinoma  
1 glucagonoma

\*\* 83 % : 4 adenomas  
1 hiperplasia

\*\*\* 60 % : 3 prolactinomas

\*\*\*\* 16 % : 1 adenoma folicular tiroideo

Fig. 3.- Incidencia de Neoplasias en la Familia

está presente en todas las células del organismo pero no se expresa hasta que ocurra la segunda mutación del gen portado en el otro cromosoma<sup>23</sup>.

En nuestra población el estudio de A.L. permitió detectar dos marcadores polimórficos a ambos lados del locus del MEN-1 cromosoma 11 banda q13 que resultaron muy informativos: PYGM (181 bp) y D11S987 (118 bp), haplotipos cosegregados por cuatro integrantes de la familia, tres enfermos y un portador presintomático de 26 años de edad, que además presentó PTH elevada, quien probablemente por su edad aún no presenta sintomatología clínica.

El resto de la población no era portadora del alelo mutante del MEN-1 con una confiabilidad del 99%.

La presencia de valores elevados de gastrina, glucagon y PTH en tres integrantes de la población estudiada, uno de ellos con síndrome diarreico crónico y aplasia medular, nos abre el interrogante de la relevancia de estas determinaciones en una población menor de 40 años.

La confiabilidad de la metodología diagnóstica por análisis de ligamiento por restricción nos permitiría excluir del seguimiento a quienes no son portadores genéticos.

**Agradecimientos:** Nuestro agradecimiento por su asesoramiento y colaboración a la Dra. Aubrey Milunsky, Center for Human Genetics-at Boston University-School of Medicine, que hizo posible la realización de este trabajo.

## Bibliografía

1. Erdheim J. Zur normalen und pathologischen histologie der glandula thyroidea, parathyroidea und hypophysis. *Beitr Pathol Anat* 1903; 33: 158-236.
2. Smith CM, Wells SA, Gerhard DS. Mapping eight new polymorphisms in 11q13 in the vicinity of multiple endocrine neoplasia type 2: identification of a new distal recombinant. *Hum Genet* 1995; 96: 377-87.
3. Lips CJM, Vasen HFA, Lamers CBHW. Multiple endocrine neoplasia. *CRC Crit Rev Oncol Hematol* 1984; 2: 117-84.
4. Duh QY, Hybarger CP, Geist R, Gamsu G, Goodman PC, Gooding GA. et al. Carcinoids associated with multiple endocrine neoplasia syndromes. *Am J Surg* 1987; 154: 142-8.
5. Sheperd JJ. The natural history of Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. Highly uncommon or highly unrecognized. *Arch Surg* 1991; 126: 935-52.
6. Wermer P. Endocrine adenomatosis and peptic ulcer in a large kindred. *Am J Med* 1964; 35: 205-12.
7. Calender A, Giraud S, Cougard P, Chanson P, Lenoir G, Murat A, et al. Multiple endocrine neoplasia type 1 in France: clinical and genetic studies. *J. Intern Med* 1995; 238: 263-68.
8. Morelli A, Falcchetti A, Castello R, Furlani L, Tomassetti P, Tonelli F. et al. Genetic screening to identify the gene carrier in Italian and German kindreds affected by multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1) syndrome. *J Endocrinol Invest* 1995; 18: 325-35.
9. Guadagna M, Corino M, Migliano M, Karothy B, Rosenthal V, Kowadlo S. et al. Adenomatosis endocrina múltiple tipo 1, actualización de una familia. Presentación de un nuevo caso. VI Jornadas de la F.A.S.E.M. 1990; Libro de Resúmenes, 21-2.
10. Kytölä S, Leisti J, Winquist R, Salmela P. Improved carrier testing for multiple endocrine neoplasia type 1, using new microsatellital type DNA markers. *Hum Genet* 1995; 96: 449-53.
11. Skogseid B, Eriksson B, Lundkvist G, Lorelius LE, Rastad J, Wide L. et al. Multiple endocrine neoplasia type 1. A ten year prospective screening study in four kindreds. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 281-7.
12. Lamers CB, Froeling PG. Clinical significance of hyperparathyroidism in familial multiple endocrine adenomatosis type 1 (MEA 1). *Am J Med* 1979; 66: 422-4.
13. Marx SJ, Vinik AI, Santen RJ, Flyd JC Jr, Mills JL, Green J. Multiple endocrine neoplasia type 1: assessment of laboratory tests to screen for the gene in a large kindred. *Medicine* 1986; 65: 226-41.
14. Oberg F, Walinder O, Bostrom H, Lundqvist G, Wide L. Peptide hormone markers in screening for endocrine tumors in multiple endocrine adenomatosis type 1. *Am J Med* 1982; 73: 619-30.
15. Eberle F, Grun R. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1). *Ergeb Inn Med Kinderheilkd* 1981; 46: 76-149.
16. Croisier JC, Lehy T, Zeitoun P. A2 cell pancreatic microadenomas in a case of multiple endocrine adenomatosis. *Cancer* 1971; 28: 707-13.
17. Peaufory JT, Gómez LG, Thompson JS. Separate pancreatic gastrin cell and beta-cell adenomas: report of a patient with multiple endocrine adenomatosis type 1. *Arch Surg* 1979; 114: 956-8.
18. Tiengo A, Fedek D, Marchiori E, Nosadini R, Muggeo M. Suppression and stimulation mechanism controlling glucagon secretion in a case of islet cell tumour producing glucagon, insulin and gastrin. *Diabetes* 1986; 25: 408-12.
19. Long RG, Bryant MG, Mitchell SJ, Adrian TE, Polak JM, Bloom SR. Clinicopathological study of pancreatic and ganglioneuroblastoma tumour secreting vasoactive intestinal polypeptide (VI Poma). *Lancet* 1979; 2: 764-70.
20. Yamaguchi K, Kameya T, Abe K. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol Metab* 1980; 2: 261-84.
21. Larsson C, Calender A, Grimmond S, Giraud S, Hayward NK, Teh B. et al. Molecular tools for presymptomatic testing in multiple endocrine neoplasia type 1. *J Intern med* 1995; 238: 239-44.
22. Knudson AG. Mutation and cancer. Estadistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-3.
23. Levy CM. Neoplasias Endocrinas Múltiples. *RAEM* 1996; 2: 110-8.