

*Milena Gurgel Teles Bezerra
Ana Claudia Latronico
Maria Candida B.V. Fragoso*

*Disciplina de Endocrinologia e
Metabologia da Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo, São Paulo, SP.*

*Recebido em 15/07/05
Revisado em 17/07/05
Aceito em 22/07/05*

RESUMO

Diversas mutações em oncogenes promovem o crescimento tumoral através da indução de atividade de proteínas que normalmente transmitem sinais proliferativos a partir de fatores extracelulares. As proteínas G são uma família de proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina que apresentam homologia estrutural e estão amplamente distribuídas em células eucariotas. Elas são constituídas por três sub-unidades (δ , δ e δ). A sub-unidade δ apresenta o sítio de ligação ao nucleotídeo guanina e é única para cada proteína G. As proteínas G estão acopladas aos receptores de superfície celular com sete hélices transmembrana com uma grande variedade de efetores intracelulares e segundos mensageiros. Um subgrupo de tumores endócrinos, incluindo os tumores hipofisários secretores de GH e ACTH, nódulos tireoideanos autônomos, tumores adrenocorticais e gonadais, foram associados a mutações somáticas ativadoras em códons altamente conservados das proteínas Gs (Arg201 e Gln227) e Gi (Arg179, Gln205). Estes achados moleculares indicaram que as proteínas G atuam como oncogenes, contribuindo no processo da tumorigênese endócrina em humanos. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/5:784-790**)

Descritores: Proteína G; Sub-unidade δ ; Mutações ativadoras; Tumores endócrinos

ABSTRACT

Endocrine Tumors Associated to Protein $G_s\delta$ / $G_{i2}\delta$ Mutations.

Many oncogenic mutations promote tumor growth by inducing autonomous activity of proteins that normally transmit proliferative signal initiated by extracellular factors. G proteins are a family of guanine nucleotide binding proteins, which are structurally homologous and widely distributed in eukaryotic cells. They are composed of three different subunits (δ , δ e δ). The δ subunit, which contains the guanine nucleotide-binding site, is unique to each G protein. The G proteins couple an array of seven transmembrane receptors at the cell surface with a variety of intracellular effectors, which produce second messenger molecules. A subset of endocrine tumors, such as GH- or ACTH-secreting pituitary adenomas, functioning thyroid adenomas, adrenocortical and gonadal tumors were associated with somatic activating mutations in the highly conserved codons of the Gs (Arg201 and Gln227) and Gi (Arg179 and Gln205) proteins. These findings indicated that the G proteins play a role as oncogenes, contributing with the human endocrine tumorigenesis. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/5:784-790**)

Keywords: G protein; δ subunit; Activating mutations; Endocrine tumors

RODBELL E COLS. (1), em 1971, apresentaram a primeira evidência da importância do nucleotídeo guanina na geração de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) a partir do estímulo hormonal. Aproximadamente uma década após esta descoberta, a proteína heterotrimérica $G_{s\delta}$ que se acopla aos receptores de membrana estimulando o sistema efetor enzimático adenililciclase que culmina na produção de AMPC, foi purificada em membranas de tecido hepático (2).

Os receptores que transmitem o sinal celular via proteína G possuem características comuns em relação a sua estrutura. Apresentam uma região amino-terminal extracelular, uma região transmembrana com sete δ -hélices hidrofóbicas ligadas por três alças extracitoplasmáticas e três alças intracitoplasmáticas, sendo denominados receptores de sete domínios transmembrana (7TM). Esses receptores, juntamente com as proteínas G, participam de um sofisticado processo de transdução do sinal celular (3-6). Os ligantes extracelulares, tais como fóton de luz, odorantes, hormônios, neurotransmissores, íons, proteases, causam uma alteração na conformação do receptor, expondo sítios das δ -hélices e ativando as proteínas G. As proteínas G ativadas estimulam diferentes sistemas efetores intracelulares (7).

Nos últimos anos, anormalidades da transdução do sinal celular envolvendo mutações ativadoras no gene *GNAS1*, que codifica a proteína $G_{s\delta}$, têm sido descritas em várias condições patológicas, como na síndrome de McCune Albright, condição esporádica de origem embrionária caracterizada pela clássica tríade de pseudopuberdade precoce, manchas *café-au-lait*, fibrodysplasia óssea poliostótica e endocrinopatias (8-13). Tumores endócrinos isolados também foram relacionados a mutações dos genes *GNAS1* (14,15).

CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS G E O CICLO GTPASE

As proteínas G podem ser divididas em dois grupos com base no seu peso molecular: um grupo de baixo peso molecular de 20 a 50kDa, presente em todas as células eucariotas, representado principalmente pela família do proto-oncogene *ras*, e um grupo de alto peso molecular (80 a 90kDa) relacionado à transdução do sinal celular (16,17). Todas as proteínas de alto peso molecular são heterotriméricas, sendo constituídas de três polipeptídeos distintos, as sub-unidades: δ , δ e δ , em ordem decrescente de peso molecular. As sub-unidades δ ligam-se ao nucleotídeo guanina com alta afinidade e especificidade, interagem

com os receptores 7TM, com os efetores e com o complexo $\delta\delta$. Todas as sub-unidades δ possuem atividade intrínseca guanidina trifosfatase (GTPase) (18-20). As sub-unidades δ e δ são menos conservadas entre as espécies e estão fortemente associadas por uma ligação não covalente formando o dímero $\delta\delta$ (14,19).

De acordo com o grau de homologia de aminoácidos, a sub-unidade $G\delta$ é dividida em 4 subfamílias: G_s , G_q , G_i e G_{i2} . Os membros das subfamílias G_s e G_q em geral estão relacionados a eventos estimulatórios hormonais, enquanto os membros da família G_i inibem tais processos (21). Este sistema pode ser ativado por inúmeros ligantes, entre eles íons, fótons e hormônios. A ligação dessas substâncias ao receptor 7TM acarreta uma alteração estrutural levando a uma mudança da conformação da sub-unidade δ , diminuindo a sua afinidade pelo difosfato de guanosina (GDP). A concentração citosólica de trifosfato de guanosina (GTP) é maior do que a concentração do GDP, ocorrendo sua substituição após a dissociação do GDP da sub-unidade δ . Uma vez que o GTP está acoplado à sub-unidade $G\delta$, esta assume a sua conformação ativa, dissociando-se do receptor e do complexo $\delta\delta$, ligando-se posteriormente ao seu respectivo efetor, que irá desencadear a cascata de eventos intracelulares para ativar ou inativar mensageiros secundários, tais como o AMPC, diacilglicerol e cálcio. Em condições fisiológicas, a ativação dos efetores é transitória, sendo finalizada pela atividade GTPase intrínseca da sub-unidade δ . Esta converte o GTP em GDP por hidrólise do δ -fosfato do GTP, mantendo a sub-unidade δ com alta afinidade ao dímero $\delta\delta$, retornando ao seu estado inativo heterotrimérico (21, 22).

ESTRUTURA E LOCALIZAÇÃO DO GENE GNAS1

O gene *GNAS1* humano de 20Kb foi clonado em 1988 por Kosaza e cols. (23) e localiza-se no braço longo do cromossomo 20 na região 13.1-13.2. Inicialmente a seqüência de nucleotídeos foi descrita como contendo 13 exons e 4 *splicing* alternativos localizados nos exons 3 e 4 (23). Atualmente sabe-se que o gene *GNAS1* e seu homólogo em ratos (*Gnas*) apresentam alta complexidade com múltiplos *splicing* alternativos formando transcritos que codificam várias proteínas e transcritos não traduzidos. Utilizando promotores alternativos, os principais produtos transcritos pelo gene *GNAS1* são: a conhecida proteína $G_{s\delta}$, a proteína neuroendócrina secretória 55 (NESP55), uma proteína semelhante à cromogranina com expressão em tecidos neuroendócrinos (medula adre-

nal, hipófise, hipotálamo, e outras regiões do cérebro); e as proteínas XLas (XLN1a e XLN1b), isoformas longas da proteína $G_{s\delta}$, que apresentam também expressão em tecidos neuroendócrinos (hipófise, adrenal, coração, pâncreas) com funções biológicas ainda não determinadas (24-26). Em humanos e ratos, a região promotora do NESP55 sofre metilação do alelo paterno, sendo o alelo materno transcrito. Contrariamente, a região promotora da XLas está metilada no alelo materno com geração de transcritos a partir somente do alelo paterno. Estudos do padrão de metilação em ratos e fetos humanos, da região promotora do gene da proteína $G_{s\delta}$, mostraram expressão bialélica em alguns tecidos (ossos), e monoalélica em outros (túbulo proximal do nefron) com *imprinting* paterno e expressão do alelo materno (27).

PROTEÍNAS G COMO ONCOGENES

Um oncogene pode ser definido como um gene que sofre transformações suficientes para conferir um fenótipo alterado por si mesmo ou em colaboração com outros oncogenes. Geralmente são formas dominantes de um proto-oncogene (28,29). Muitos proto-oncogenes codificam proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal, ativadas por hormônios e fatores de crescimento que estimulam a proliferação celular (30). As proteínas G claramente se encaixam na definição de proto-oncogene, pois mutações do tipo ganho e perda de função podem alterar as vias de transdução de sinal que controlam o crescimento celular (31).

Mutações na proteína G que levam a ativação constitutiva do sinal intracelular foram relatadas envolvendo as sub-unidades δ das proteínas G_s e G_{i2} .

Mutações ativadoras no gene da sub-unidade δ , GNAS, transformam esse gene em um oncogene denominado *gsp*. Essas mutações descritas nos exons 8 e 9 do gene são somáticas, pontuais, do tipo *missense* em heterozigose e alteram códons altamente conservados e críticos para a atividade intrínseca GTPase (Arg201 e Gln227). Esse oncogene codifica uma proteína $G_{s\delta}$ mutada com menor atividade GTPase, diminuindo a hidrólise do δ -fosfato do GTP, mantendo constitutivamente o sinal celular com aumento significativo de AMPc (32,33). O papel do AMPc na regulação da proliferação celular parece ser tecido específico. Em alguns tecidos como hipófise e tireóide, o AMPc promove proliferação, diferenciação e secreção hormonal (34). O aumento de AMPc ativa a proteína quinase A (PKA) que fosforila o CREB (proteína ligadora responsiva a AMPc); uma vez

fosforilada, esta última atua no núcleo modulando a transcrição de um número relevante de genes envolvidos na mitogênese como *c-fos*, *c-jun* e *jun B* (35,36). Logo, a expressão do oncogene *gsp* nesses tecidos resulta em hiperplasia, hipertrofia e adenomas hiperfuncionantes (32). Em contrapartida, em outros tipos celulares o aumento de AMPc pode, via PKA, inibir a cascata MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) que é desencadeada por fatores de crescimento (35).

Em 1992, o gene *GNAI2* foi clonado e localizado no braço curto do cromossomo 3, região 2.1. Esse codifica a proteína $G_{\delta i2}$, que está envolvida em rearranjos celulares e malignidade (37). Mutações ativadoras no gene *GNAI2* também transformam o gene da sub-unidade $\delta i2$ em um oncogene denominado *gip2*. O potencial oncogênico da ativação constitutiva da proteína $G_{i2\delta}$ ainda não é totalmente compreendido, principalmente porque o produto do *gip2* causa inibição da adenililciclase e redução do cálcio citosólico em células transfectadas (38). No entanto, o achado de que os receptores acoplados a $G_{i2\delta}$ ativam constitutivamente a via MAK-ERK (*mitogen-activated extracellular-signal regulated kinase; extracellular-signal regulated kinase*) em células Rat1a indica que este pode ser o principal mecanismo pelo qual o oncogene *gip2* regula o crescimento celular (39). A inibição da via adenililciclase-AMPc-PKA realizada pelo *gip2* pode levar ao estímulo do sistema de proliferação celular, MERK-ERK (32). Portanto, em alguns sistemas celulares, uma ativação constitutiva de $G_{i2\delta}$ pode causar transformação celular (33,39).

MUTAÇÕES ATIVADORAS DAS PROTEÍNAS G EM TUMORES ENDÓCRINOS

Hipófise

O primeiro passo para a identificação de mutações ativadoras $G_{s\delta}$ em tumores endócrinos foi a observação de que tumores secretores de GH possuíam níveis elevados de GH basal e aumento da atividade da adenililciclase, não sendo estimulados por GHRH, que atua via receptor acoplado à proteína $G_{s\delta}$ e estímulo da adenililciclase (40). Aproximadamente 40% dos tumores secretores de GH apresentam mutações do tipo *missense* nos exons 8 e 9 do gene *GNAS1* em heterozigose que resultam nas substituições dos resíduos de aminoácidos Arg201 (por Cys, ou His) e Gln227 (por Arg ou Lys) da sub-unidade $G_{s\delta}$, respectivamente (41,42).

Bruce e cols. (43) demonstraram que em 21 de 22 adenomas hipofisários produtores de GH, a muta-

ção *gsp* estava presente no NESP55 e não no transcrito XLas, sugerindo que estas mutações ocorrem preferencialmente no alelo materno (43). Posteriormente, um tumor somatotrófico contendo a mutação Arg201Ser foi descrito (44). A prevalência destas mutações em pacientes acromegálicos coreanos foi bem menor (< 5%) do que na população caucasiana (45). A alteração nesses resíduos, como foi previamente mencionado, diminuiu dramaticamente a atividade intrínseca GTPase da sub-unidade $G_s\delta$; a ativação constitutiva da proteína G aumenta a concentração de AMPc nos somatotrófos (27), estimulando a diferenciação e proliferação celulares através de um fator de transcrição tecido-específico, GHF1 (46).

Não há prevalência quanto ao sexo ou idade na apresentação dos tumores com ou sem a mutação *gsp*. No entanto, existem algumas diferenças clínicas entre os tumores secretores de GH com *gsp+* e com *gsp-* (35). Os tumores *gsp+* são menores, porém mesmo os adenomas muito pequenos possuem sintomas clínicos exuberantes. Dados de microscopia eletrônica confirmam a presença de células densamente granuladas, com aparelho secretório bem desenvolvido (35). Além disso, tumores *gsp+* parecem ser mais sensíveis à ação inibitória dos análogos da somatostatina (47), indicando que as vias $G_{i2\delta}$, que inibem adenililciclase, estão intactas nesses tumores, sendo os análogos da somatostatina agentes terapêuticos úteis nos pacientes com tumores *gsp+* (27). A ativação da $G_s\delta$ causa ainda o aumento de um subtipo específico de fosfodiesterase (tipo 4), enzima que hidrolisa o AMPc em excesso, na tentativa de reduzir seu acúmulo. Parece haver um maior bloqueio na atividade dessa enzima em tumores *gsp+*, o que pode influenciar na apresentação fenotípica desses tumores (48).

Mutações *gsp* estão presentes em outros tipos de tumores hipofisários. À semelhança do GHRH nos somatotrófos, o CRH estimula a liberação de ACTH pelos corticotrófos via ativação de proteína $G_s\delta$ (27). Até o presente momento, poucos estudos relacionaram a mutação *gsp* com o adenoma corticotrófico. Williamson e cols. (49), demonstraram a presença de uma mutação *gsp* no códon 227 em 2 de 32 adenomas secretores de ACTH. Um outro adenoma apresentava uma mutação *gip2* no códon 179 (49). Mais recentemente, a troca Arg201His foi encontrada em um adenoma basofílico causador de doença de Cushing em um menino de 11 anos (50).

Adenomas não-funcionantes apresentam uma prevalência da mutação *gsp* de aproximadamente 10% (42,51,52). Duas alterações da proteína $G_s\delta$, a primeira no códon 201 resultando na conversão de Arg

para Cys e a outra no códon 227 caracterizada pela troca de glutamina pela arginina, foram identificadas em 2 de 22 adenomas de hipófise não-funcionantes (52). Nesse mesmo estudo, 3 tumores também apresentavam a troca da glutamina por arginina no códon 205 do gene GNAIS2 (mutações *gip2*). Dois desse três tumores também apresentavam mutações *gsp*. Todos os tumores com mutações nos genes das proteínas G apresentaram invasão óssea local e de tecidos adjacentes. A presença dos dois tipos de mutações em dois tumores sugere a possibilidade de múltiplos eventos na patogênese de neoplasias de hipófise (52). A ausência de mutações *gsp* em tireotrófos e lactotrófos pode ser explicada pela transdução do sinal celular por vias diferentes ao da proteína $G_s\delta$ (42,53).

Tireóide e paratireóide

O sistema adenilciclase-AMPc é o principal regulador da função e do crescimento da célula folicular tireoideana. A adenilciclase está sob o efeito estimulatório da proteína $G_s\delta$ e inibitório da proteína $G_{i2\delta}$ (54). O TSH exerce seus efeitos por meio de um receptor do tipo 7TM acoplado à proteína G (54). Em células tireoideanas, o AMPc estimula fatores de transcrição dependentes de AMPc e o p38/MAPK em uma via dependente de PKA resultando em efeitos na função e proliferação da célula folicular (55).

A presença de mutações em adenomas tireoideanos funcionantes foi confirmada em vários estudos (42,56). Mutações no receptor de TSH que ativam a mesma via acoplada à proteína $G_s\delta$ são as mais comumente encontradas em nódulos autônomos, e a sua prevalência pode chegar a 80% segundo algumas casuísticas (57,58). Mutações ativadoras da proteína $G_s\delta$ foram descritas em até 25% em nódulos tireoideanos autônomos (54). Há, no entanto, uma grande variabilidade nas prevalências reportadas em neoplasia de tireóide (42,56,59-61). Um estudo feito por Esapa e cols. (54) identificou duas mutações em 100 tumores examinados. O primeiro era um adenoma de células de Hürthle com mutação *gsp* Arg201Cys. O outro se tratava de um adenoma folicular com uma alteração no oncogene *gip2*, códon 179, resultando também na troca de uma arginina por uma cisteína. Uma revisão feita no mesmo estudo mostrou uma prevalência de 2 a 13% de mutações *gsp* em tumores papilíferos e foliculares da tireóide, mostrando assim que em comparação aos nódulos funcionantes, a prevalência de mutações na proteína G em neoplasias de tireóide é menor (54).

A presença de mutações *gsp* em paratireóide foi descrita por Williamson e cols. (62). Dois pacientes

com hiperparatireoidismo primário apresentaram a mutação Arg201Cys na análise molecular dos adenomas de paratireóide (62).

Supra-renais e gônadas

O receptor do ACTH é acoplado à proteína $G_{s\delta}$, tendo a adenililciclase como seu principal efetor. Portanto, mutações nessa via podem levar à proliferação celular secundária. Em um estudo realizado por Yoshimoto e cols. (62), apenas 1 de 19 tumores adrenocorticais examinados apresentava mutação na proteína $G_{s\delta}$. A paciente era portadora de um tumor em adrenal à direita de aproximadamente 2,0cm e apresentava sintomas clássicos de hiperaldosteronismo primário. Um outro estudo detectou a mutação Arg201Cys em 2 pacientes portadores de feocromocitoma (62). Entretanto, estudos posteriores sugeriram que mutações no gene *gsp* em tumores adrenocorticais são raramente encontradas (42,63). Mutações no oncogene *gip2* envolvendo o resíduo Arg179 foram encontradas em 3 de 11 tumores adrenocorticais e 3 de 10 tumores ovarianos (2 tumores de granulosa e 1 tecoma). Mutações no gene *gsp* não foram encontradas nesses tumores (42). Fragoso e cols. (64) descreveram mutações no gene $G_{s\delta}$ em 4 de 14 tumores do estroma do cordão sexual e não detectaram nenhuma mutação no gene *gip2*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, foi demonstrado que mutações constitutivas nas proteínas G resultam na ativação das vias de sinalização intracelular. Tais mutações são responsáveis por doenças humanas, apresentando-se com hipersecreção e neoplasia diferenciada. O estímulo à proliferação celular é o principal mecanismo envolvido na gênese dessas patologias. Mutações ativadoras no gene *GNAS1* estão bem caracterizadas em alguns tumores da hipófise (somatotróficos, adenomas não-funcionantes) e de tireóide (nódulos funcionantes e neoplasias diferenciadas) e na síndrome de McCune Albright. Mutações no gene *GNAI2* são extremamente raras e identificadas em alguns tipos celulares, tais como: tumores ovarianos, supra-renais e adenomas não-funcionantes de hipófise. Portanto, maiores estudos são necessários para se avaliar a importância da participação da sub-unidade $G_{i2\delta}$ no processo da tumorigênese.

A mutação *gsp* representa a base da patogênese molecular da síndrome de McCune Albright. Tais mutações podem se apresentar de forma isolada em

tecidos que são também acometidos na síndrome de McCune Albright, o que nos faz questionar se estas doenças não fazem parte de uma mesma entidade nosológica, com espectro de apresentação fenotípica variável. Estudos das vias de sinalização intracelular permitirão maior compreensão da participação das mutações *gsp* e *gip2* nas neoplasias benignas, malignas, funcionantes e não-funcionantes dos diferentes tumores endócrinos.

REFERÊNCIAS

1. Rodbell M, Krans HM, Pohl SL, Birnbaumer L. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanylnucleotides on binding of 125 I-glucagon. **J Biol Chem** 1971;246:1872-6.
2. Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl SL, Krans HM. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. **J Biol Chem** 1971;246:1877-82.
3. Spiegel AM, Shenker A, Weinstein LS. Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. **Endocr Rev** 1992;13:536-65.
4. Spiegel AM, Weinstein LS, Shenker A. Abnormalities in G protein-coupled signal transduction pathways in human disease. **J Clin Invest** 1993;92:1119-25.
5. Wess J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. **Pharmacol Ther** 1998;80:231-64.
6. Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. **Endocr Rev** 2000;21:90-113.
7. Felig P BJ, Frohman LA. **Endocrinology and metabolism**. In: Design AGA, ed. New York, 1995.
8. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. **N Engl J Med** 1991;325:1688-95.
9. Shenker A, Weinstein LS, Moran A, Pescovitz OH, Charest NJ, Boney CM, et al. Severe endocrine and nonendocrine manifestations of the McCune-Albright syndrome associated with activating mutations of stimulatory G protein GS. **J Pediatr** 1993;123:509-18.
10. Riminucci M, Liu B, Corsi A, Shenker A, Spiegel AM, Robey PG, et al. The histopathology of fibrous dysplasia of bone in patients with activating mutations of the Gs alpha gene: site-specific patterns and recurrent histological hallmarks. **J Pathol** 1999;187:249-58.
11. Shenker A, Weinstein LS, Sweet DE, Spiegel AM. An activating Gs alpha mutation is present in fibrous dysplasia of bone in the McCune-Albright syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 1994;79:750-5.
12. Silva ES, Lumbroso S, Medina M, Gillerot Y, Sultan C, Sokal EM. Demonstration of McCune-Albright mutations

- in the liver of children with high gammaGT progressive cholestasis. **J Hepatol** 2000;32:154-8.
13. Lumbroso S, Paris F, Sultan C. Activating Gs-alpha mutations: analysis of 113 patients with signs of McCune-Albright syndrome - a European Collaborative Study. **J Clin Endocrinol Metab** 2004;89:2107-13.
 14. Clapham DE. Mutations in G protein-linked receptors: novel insights on disease. **Cell** 1993;75:1237-9.
 15. Lefkowitz RJ. G-protein-coupled receptors. Turned on to ill effect. **Nature** 1993;365:603-4.
 16. Hepler JR, Gilman AG. G proteins. **Trends Biochem Sci** 1992;17:383-7.
 17. Spiegel AM. Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. **Mol Cell Endocrinol** 1987;49:1-16.
 18. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature** 1991;349:117-27.
 19. Birnbaumer L. Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. **Cell** 1992;71:1069-72.
 20. Conklin BR, Bourne HR. Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. **Cell** 1993;73:631-41.
 21. Spiegel AM. Mutations in G proteins and G protein-coupled receptors in endocrine disease. **J Clin Endocrinol Metab** 1996;81:2434-42.
 22. Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Ann Rev Biochem** 1987;56:615-49.
 23. Hayward BE, Bonthron DT. An imprinted antisense transcript at the human GNAS1 locus. **Hum Mol Genet** 2000;9:835-41.
 24. Hayward BE, Moran V, Strain L, Bonthron DT. Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998;95:15475-80.
 25. Pasolli HA, Klemke M, Kehlenbach RH, Wang Y, Huttner WB. Characterization of the extra-large G protein alpha-subunit XLalphas. I. Tissue distribution and subcellular localization. **J Biol Chem** 2000;275:33622-32.
 26. Weinstein LS, Yu S, Warner DR, Liu J. Endocrine manifestations of stimulatory G protein alpha-subunit mutations and the role of genomic imprinting. **Endocr Rev** 2001;22:675-705.
 27. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. **Cell** 1991;64:235-48.
 28. Hunter T. Cooperation between oncogenes. **Cell** 1991;64:249-70.
 29. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, et al. Oncogenes and signal transduction. **Cell** 1991;64:281-302.
 30. Dhanasekaran N, Heasley LE, Johnson GL. G protein-coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis. **Endocr Rev** 1995;16:259-70.
 31. Dhanasekaran N, Tsim ST, Dermott JM, Onesime D. Regulation of cell proliferation by G proteins. **Oncogene** 1998;17:1383-94.
 32. van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. **Endocr Rev** 1996;17:698-714.
 33. Dumont JE, Jauniaux JC, Roger PP. The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. **Trends Biochem Sci** 1989;14:67-71.
 34. Spada A, Lania A, Ballare E. G protein abnormalities in pituitary adenomas. **Mol Cell Endocrinol** 1998;142:1-14.
 35. Gaiddon C, Boutillier AL, Monnier D, Mercken L, Loeffler JP. Genomic effects of the putative oncogene G alpha s. Chronic transcriptional activation of the c-fos proto-oncogene in endocrine cells. **J Biol Chem** 1994;269:22663-71.
 36. Magovcevic I, Ang SL, Seidman JG, Tolman CJ, Neer EJ, Morton CC. Regional localization of the human G protein alpha i2 (GNAI2) gene: assignment to 3p21 and a related sequence (GNAI2L) to 12p12-p13. **Genomics** 1992;12:125-9.
 37. Wong YH, Federman A, Pace AM, Zachary I, Evans T, Pouyssegur J, et al. Mutant alpha subunits of Gi2 inhibit cyclic AMP accumulation. **Nature** 1991;351:63-5.
 38. Gupta SK, Gallego C, Lowndes JM, Pleiman CM, Sable C, Eisfelder BJ, et al. Analysis of the fibroblast transformation potential of GTPase-deficient gip2 oncogenes. **Mol Cell Biol** 1992;12:190-7.
 39. Vallar L, Spada A, Giannattasio G. Altered Gs and adenylyl cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas. **Nature** 1987;330:566-8.
 40. 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;340:692-6.
 41. Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grunewald K, Feichtinger H, et al. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. **Science** 1990;249:655-9.
 42. Hayward BE, Barlier A, Korbonits M, Grossman AB, Jacquet P, Enjalbert A, et al. Imprinting of the G(s)alpha gene GNAS1 in the pathogenesis of acromegaly. **J Clin Invest** 2001;107:R31-6.
 43. Yang I, Park S, Ryu M, Woo J, Kim S, Kim J, et al. Characteristics of gsp-positive growth hormone-secreting pituitary tumors in Korean acromegalic patients. **Eur J Endocrinol** 1996;134:720-6.
 44. Hosoi E, Yokogoshi Y, Horie H, Sano T, Yamada S, Saito S. Analysis of the Gs alpha gene in growth hormone-secreting pituitary adenomas by the polymerase chain reaction-direct sequencing method using paraffin-embedded tissues. **Acta Endocrinol (Copenh)** 1993;129:301-6.
 45. Castrillo JL, Theill LE, Karin M. Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. **Science** 1991;253:197-9.
 46. Spada A, Arosio M, Bochicchio D, Bazzoni N, Vallar L, Bassetti M, et al. Clinical, biochemical, and morphological correlates in patients bearing growth hormone-secreting pituitary tumors with or without constitutively active adenylyl cyclase. **J Clin Endocrinol Metab** 1990;71:1421-6.
 47. Persani L, Borgato S, Lania A, Filopanti M, Mantovani G,

- Conti M, et al. Relevant cAMP-specific phosphodiesterase isoforms in human pituitary: effect of Gs(alpha) mutations. **J Clin Endocrinol Metab** **2001**;86:3795-800.
48. Williamson EA, Ince PG, Harrison D, Kendall-Taylor P, Harris PE. G-protein mutations in human pituitary adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas. **Eur J Clin Invest** **1995**;25:128-31.
49. Riminucci M, Collins MT, Lala R, Corsi A, Matarazzo P, Gehron Robey P, et al. An R201H activating mutation of the GNAS1 (Gsalpha) gene in a corticotroph pituitary adenoma. **Mol Pathol** **2002**;55:58-60.
50. Tordjman K, Stern N, Ouaknine G, Yossiphov Y, Razon N, Nordenskjold M, et al. Activating mutations of the Gs alpha-gene in nonfunctioning pituitary tumors. **J Clin Endocrinol Metab** **1993**;77:765-9.
51. Williamson EA, Daniels M, Foster S, Kelly WF, Kendall-Taylor P, Harris PE. Gs alpha and Gi2 alpha mutations in clinically non-functioning pituitary tumours. **Clin Endocrinol (Oxf)** **1994**;41:815-20.
52. Dong Q, Brucker-Davis F, Weintraub BD, Smallridge RC, Carr FE, Battey J, et al. Screening of candidate oncogenes in human thyrotroph tumors: absence of activating mutations of the G alpha q, G alpha 11, G alpha s, or thyrotropin-releasing hormone receptor genes. **J Clin Endocrinol Metab** **1996**;81:1134-40.
53. Esapa C, Foster S, Johnson S, Jameson JL, Kendall-Taylor P, Harris PE. G protein and thyrotropin receptor mutations in thyroid neoplasia. **J Clin Endocrinol Metab** **1997**;82:493-6.
54. Pomerance M, Abdullah HB, Kamerji S, Correze C, Blondeau JP. Thyroid-stimulating hormone and cyclic AMP activate p38 mitogen-activated protein kinase cascade. Involvement of protein kinase A, rac1, and reactive oxygen species. **J Biol Chem** **2000**;275:40539-46.
55. O'Sullivan C, Barton CM, Staddon SL, Brown CL, Lemoine NR. Activating point mutations of the gsp oncogene in human thyroid adenomas. **Mol Carcinog** **1991**;4:345-9.
56. Parma J, Van Sande J, Swillens S, Tonacchera M, Dumont J, Vassart G. Somatic mutations causing constitutive activity of the thyrotropin receptor are the major cause of hyperfunctioning thyroid adenomas: identification of additional mutations activating both the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inositol phosphate-Ca2+ cascades. **Mol Endocrinol** **1995**;9:725-33.
57. Duprez L, Parma J, Van Sande J, Rodien P, Sabine C, Abramowicz M, et al. Pathology of the TSH receptor. **J Pediatr Endocrinol Metab** **1999**;12(suppl. 1):295-302.
58. Matsuo K, Friedman E, Gejman PV, Fagin JA. The thyrotropin receptor (TSH-R) is not an oncogene for thyroid tumors: structural studies of the TSH-R and the alpha-subunit of Gs in human thyroid neoplasms. **J Clin Endocrinol Metab** **1993**;76:1446-51.
59. Said S, Schlumberger M, Suarez HG. Oncogenes and anti-oncogenes in human epithelial thyroid tumors. **J Endocrinol Invest** **1994**;17:371-9.
60. Russo D, Arturi F, Wicker R, Chazenbalk GD, Schlumberger M, DuVillard JA, et al. Genetic alterations in thyroid hyperfunctioning adenomas. **J Clin Endocrinol Metab** **1995**;80:1347-51.
61. Williamson EA, Johnson SJ, Foster S, Kendall-Taylor P, Harris PE. G protein gene mutations in patients with multiple endocrinopathies. **J Clin Endocrinol Metab** **1995**;80:1702-5.
62. Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuda A, Sano T, Itakura M. Rare mutations of the Gs alpha subunit gene in human endocrine tumors. Mutation detection by polymerase chain reaction-primer-introduced restriction analysis. **Cancer** **1993**;72:1386-93.
63. Reincke M, Karl M, Travis W, Chrousos GP. No evidence for oncogenic mutations in guanine nucleotide-binding proteins of human adrenocortical neoplasms. **J Clin Endocrinol Metab** **1993**;77:1419-22.
64. Fragoso MC, Latronico AC, Carvalho FM, Zerbini MC, Marcondes JA, Araujo LM, et al. Activating mutation of the stimulatory G protein (gsp) as a putative cause of ovarian and testicular human stromal Leydig cell tumors. **J Clin Endocrinol Metab** **1998**;83:2074-8.

Endereço para correspondência:

Maria Cândida B. Villares Fragoso
Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155, PAMB,
2º andar, bloco 6
05403-900 São Paulo, SP
E-mail: mariafragoso@uol.com.br