ANDREA CECILIA TOSCANINI

**Identificação de genes diferencialmente expressos em
tecido de paratireóide de pacientes portadores de
hiperparatireoidismo primário: comparação entre
hiperplasias, adenomas e carcinomas**

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Giannella Neto

São Paulo

2004

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tendo a concessão de bolsa de estudo da FAPESP (*processo n° 02/10732-4*).

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals in Index Medicus*.

*Aos meus pais Andrés e Ada
e aos meus irmãos Gabriela e Hector, com amor.*

À minha família e amigos,

Vocês são o verdadeiro sentido daquilo que faço.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Malebranche, por estar sempre ao meu lado me ensinando a crescer e me fazendo feliz, agradeço seu amor.

Ao Prof. Dr. Daniel Giannella Neto, meu orientador, uma das pessoas que mais admiro, por ter me apresentado ao mundo da ciência, pelas noites mal dormidas fazendo análises estatísticas, pela sua dedicação e pelo seu entusiasmo e estímulo. Ao Daniel, agradeço os conselhos, as repreensões e principalmente a compreensão...

À Dra. Maria Lúcia C. C. Giannella, por ter sido minha professora na biologia molecular, sua disciplina e seriedade profissionais são um exemplo. É um presente trabalhar ao seu lado. À Malu, agradeço pela amizade, por dividir os momentos mais difíceis desta tese e pelo presente que você me deu, que espero levar comigo por toda a vida.

Aos biomédicos do laboratório Ricardo e Ana, e à bióloga Ângela por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

Ao Cássio, pela ajuda com o Wave, pela disponibilidade e complacência e pelos trabalhos que vamos fazer juntos.

À Karla, pela revisão do texto e pelas proveitosas discussões durante nossas reuniões científicas.

À secretária Norisa, pela paciência e carinho (acreditem) com que sempre me tratou.

Ao Tadeu, pela amizade e por ser o responsável pela minha vinda à esta Faculdade de Medicina. Torço por você.

Agradeço a todos os colegas do LIM-25 pela agradável convivência durante estes 5 anos.

Ao Dr. Fábio L. M. Montenegro, cirurgião de quase todos os casos do presente estudo, agradeço a disponibilidade e a atenção.

Ao Christian Collin e à Fernanda Festa do Instituto de Química USP, pela preciosa ajuda nas etapas de hibridização e RDA.

À Dra. Mari Cleide Sogayar do Instituto de Química USP, por ter me recebido em seu laboratório para realizar parte desta tese.

Ao Dr. Pedro Henrique da Unidade de Metabolismo Ósseo do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, pelos conselhos e observações clínicas

Ao Dr. Anoi Cordeiro, por ter me cedido espaço no centro cirúrgico para que pudesse coletar o material deste estudo e pelas agradáveis aulas desenhadas de anatomia das paratireóides.

À Dra. Inês Vieira de Castro, pela análise e revisão histológica de todos os casos deste estudo.

À Cida, secretária da Pós-graduação, pela paciência e atenção.

À FAPESP, pela concessão de bolsa de pesquisa.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de quadros

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO

1.1. As paratireóides..... 01

1.2. Tumorigênese paratireoideana..... 03

1.2.1. Proto-oncogenes..... 04

1.2.2. Genes de supressão tumoral..... 05

1.3. Hiperplasia das paratireóides..... 06

1.4. Adenoma de paratireóide..... 07

1.5. Carcinoma de paratireóide..... 08

1.6. Distinção histológica entre tumores de paratireóide..... 10

1.7. Técnicas de Biologia Molecular para o estudo de expressão gênica..... 12

1.7.1. Macroarranjos de cDNA..... 12

1.7.2. Análise da representação diferencial (RDA)..... 14

2. OBJETIVOS..... 16

3. CASUÍSTICA 17

4. MÉTODOS.....	23
4.1. Hibridização das membranas Atlas.....	24
4.1.1. Síntese das sondas marcadas.....	28
4.1.2. Hibridização das membranas.....	31
4.1.3. Análise das diferenças de expressão.....	31
4.2. Construção e hibridização das membranas <i>no match</i>	35
4.2.1. Seleção e purificação dos genes inéditos.....	35
4.2.2. Síntese das sondas marcadas.....	38
4.2.3. Hibridização das membranas	39
4.3. Análise da representação diferencial (RDA).....	39
4.3.1. Geração de <i>amplicons</i>	41
4.3.2. Hibridização subtrativa das diferentes representações.....	43
4.3.3. Clonagem	55
4.3.4. Seqüenciamento.....	58
4.4. Seleção dos genes diferencialmente expressos.....	59
4.5. PCR dos genes isolados	59
4.5.1. Amostras.....	60
4.5.2. PCR semi-quantitativa dos genes escolhidos.....	61
4.5.3. Análise estatística	63
5. RESULTADOS.....	64
5.1. Hibridização das membranas Atlas.....	64
5.2. Hibridização das membranas <i>no match</i>	73
5.3. Análise da representação diferencial.....	76
5.4. PCR dos genes isolados	82

5.5. Correlações	89
6. DISCUSSÃO.....	94
7. CONCLUSÃO.....	113
8. ANEXOS.....	114
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS

Am.	american
Biochem.	biochemistry
Biol.	biology
Chem.	chemistry
Clin.	clinical
Dr.	doutor
Endocr.	endocrine
Endocrinol.	endocrinology
et al.	e outros
Eur.	european
Genet.	genetics
Hum.	human
Int.	internal
J.	journal
Med.	medicine
Miner.	mineral
Molec.	molecular
Mutat.	mutation
Nat.	nature
Oncol.	oncology
Pathol.	pathology
p.	página
prof.	professor

Relat.	related
Res.	research
Surg.	surgery

LISTA DE SÍMBOLOS

A	absorbância
α	alfa
β	beta
[]	concentração
Ci	Curie
°C	graus Celsius
h	hora
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
mCi	miliCurie
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
min	minuto
M	molar
nm	nanômetro
%	porcentagem
rpm	rotações por minuto
s	segundo
U	unidade
X	vezes

LISTA DE SIGLAS

1, 25(OH) ₂ D ₃	1, 25 Dihidroxicolecalciferol
bFGF	fator de crescimento de fibroblastos básico ou 2 (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
BCR	<i>break point control region gene</i>
bp	pares de base (<i>base pairs</i>)
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CaS	cálcio sérico
CaSR	receptor sensível ao cálcio (<i>calcium sensing receptor</i>)
CaU	cálcio urinário
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	DNA complementar
dCTP	desoxicitosina trifosfato
DD	<i>differential display</i>
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAse	desoxirribonuclease
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
DTT	ditiotreitól
DP	produto diferencial
EDTA	<i>disodium ethylenediaminetetra acetate</i>
ETOH	etanol
FGF ₃	fator de crescimento de fibroblastos 3 (<i>fibroblast growth factor 3</i>)

GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GTPase	guanosina trifosfatase
H ₂ O _m Q	água mili Q
HCGP	Projeto Genoma Humano do Câncer (<i>Human Cancer Genoma Project</i>)
HCl	ácido clorídrico
HGP	Projeto Genoma Humano (<i>Human Genome Project</i>)
HPT	hiperparatireoidismo
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (<i>insulin like growth factor-1</i>)
IGF-1R	receptor do IGF-1
LB	Luria-Bertani
LD	longa distância
LICR	Ludwig Institute for Cancer Research
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
NEM-1	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1
NEM-2	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2
ON	durante a noite (<i>overnight</i>)
P ³²	fósforo 32
PCR	reação de polimerase em cadeia (<i>polimerase chain reaction</i>)
pHPT	hiperparatireoidismo primário (<i>primary hyperparathyroidism</i>)
PRAD1	<i>parathyroid adenoma 1</i>

PS	fosfato sérico
PTH	paratormônio
PTK7	receptor proteína tirosino-cinase 7 (<i>protein tyrosin kinase receptor 7</i>)
RB	retinoblastoma
RDA	análise da representação diferencial (<i>representational difference analysis</i>)
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
RT	transcriptase reversa (<i>reverse transcriptase</i>)
RT-PCR	reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH	hibridização subtrativa (<i>subtractive hybridization</i>)
SSC	citrato de sódio saturado
TA	temperatura ambiente
TAE	tris acetato EDTA
TE	tris EDTA
TIMP-3	inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 3 (<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i>)
UADO	unidades arbitrárias de densidade óptica

Figura	Legenda	p.
1	Representação esquemática do delineamento experimental.	24
2	Esquema da membrana <i>Human Cancer</i> 1.2. As zonas são representadas de A a F, contendo cada uma delas 196 genes. Nas extremidades superiores encontram-se marcadores de posição e na extremidade inferior, os controles internos.	25
3	Esquema da membrana <i>Oncogene/Tumor supressor gene</i> . Nas posições A, B, C, D, E, F, G, H e I, encontram-se os controles internos. Nas duas primeiras posições que seguem as letras J, K e L encontram-se os controles negativos e nas duas posições que seguem as letras M, N, O, e P encontram-se os calibradores e marcadores de posição. Também podem ser observados marcadores de posição nas extremidades superior e inferior.	27
4	Análise utilizada na seleção dos genes. Os genes (representados por círculos) cujas diferenças de expressão afastavam-se do ajuste à distribuição normal representam aqueles de maior relevância.	33
5	Organograma representativo da classificação de genes de acordo com sua função molecular (atividade bioquímica), processo biológico em que está envolvido e ao componente celular em que desempenha sua atividade.	34
6	Gel de agarose 1% utilizado para verificar a integridade do RNA. Podem ser visualizadas as duas subunidades ribossomais 18S e 28S. A amostra da esquerda corresponde ao adenoma e a amostra da direita corresponde ao carcinoma, ambos utilizados para	65

confeção da sonda.

- 7 Membranas *Atlas Human Cancer* 1.2 hibridizadas, à direita com a sonda sintetizada a partir dos cDNAs de carcinoma e à esquerda com a sonda sintetizada a partir dos cDNAs de adenoma de paratireóide. 67
- 8 Membranas *Oncogene/tumor supressor gene* hibridizadas, à direita com a sonda sintetizada a partir dos cDNAs de carcinoma e à esquerda com a sonda sintetizada a partir dos cDNAs de adenoma de paratireóide. 67
- 9 Classificação hierárquica de acordo com os níveis de expressão de cada gene obtidos após hibridização das membranas Atlas. As setas apontam os genes PTK7, RET e Notch-2, selecionados para PCR. 68
- 10 Classificação hierárquica de acordo com os níveis de expressão de cada gene obtidos após hibridização das membranas Atlas. 69
- 11 Análise dos produtos de PCR amplificados a partir do material obtido por *Mini Prep* das placas contendo os cDNAs *no match* em gel de agarose 2%. 73
- 12 Resultado da hibridização das membranas *no match*. 74
- 13 Amplificação da fita dupla de cDNA em diferentes ciclos (18, 21, 24 e 27). 3: cDNA do adenoma e 4: cDNA do carcinoma. O ciclo ideal é aquele onde começa a ser visto padrão de bandejamento no *smear*. 76
- 14 Gel de agarose 2% demonstrando os produtos da primeira digestão. 1: marcador de peso molecular, 2: adenoma não digerido, 3: adenoma digerido, 4: carcinoma não digerido, 5: carcinoma digerido, 6: carcinoma não digerido e 7: carcinoma digerido. 77

- 15 Gel de agarose 2% demonstrando os produtos da PCR realizada 77
para verificar a ligação dos adaptadores R. Na figura A, foram
realizadas diferentes ciclagens (8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24)
tanto para o adenoma como para o carcinoma. Na figura B as
amostras foram recicladas nos padrões ideais, para o adenoma 10
ciclos e para o carcinoma 9 ciclos.
- 16 Gel de agarose 2% demonstrando os produtos da PCR realizada 79
após a primeira hibridização. A figura apenas indica a presença de
material. 1: marcador de peso molecular, 2: hibridização utilizando o
adenoma como *DRIVER* e 3: hibridização utilizando o carcinoma
como *DRIVER*. As colunas 2 e 3 representam o primeiro produto
diferencial (DP1).
- 17 Gel de agarose 2% demonstrando a geração do segundo produto 80
diferencial (DP2). A figura A mostra o resultado da PCR realizada
para verificação da ligação dos adaptadores N, 1: peso molecular, 2:
adenoma como *DRIVER* e 3: carcinoma como *DRIVER*. Na figura B
o resultado da segunda hibridização. As colunas 4 e 5 representam
as diluições das colunas 2 e 3 respectivamente.
- 18 Gel de agarose 2% demonstrando resultado da PCR realizada após 80
a clonagem do produto da segunda hibridização. Foram utilizados
primers M13.
- 19 Eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da integridade 83
do RNA total. As duas subunidades ribossomais 18S e 28S podem
ser observadas. A amostra 14 não foi utilizada.
- 20 Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a PCR de 20 85
amostras tumorais para verificação da eficiência da síntese de
cDNA. O fragmento tem corresponde a 377 pares de bases e
corresponde ao gene BCR, utilizado como controle interno.

- 21 Eletroforese em gel de agarose 2% demonstrando os resultados da 87
reação de co-amplificação dos genes BCR e IGF-1-R, em 14
amostras e um controle negativo (amostra 15). A reação foi
realizada em duplicata.
- 22 Eletroforese em gel de agarose 2% demonstrando os resultados da 87
reação de co-amplificação dos genes BCR e NOTCH-2, obtidos para
13 amostras e um controle negativo (amostra 14). A reação foi
realizada em duplicata.
- 23 níveis séricos de cálcio total(A) e iônico (B), fósforo (C) e de PTH (D) 89
em portadores de pHPT causados por adenomas e hiperplasia
relacinada a NEM-1 comparados aos portadores de carcinomas.
Nota-se níveis sanguíneos significativamente maiores de cálcio total
e iônico e de PTH nos pacientes acometidos por carcinoma ($p < 0,05$) e maiores de fósforo naqueles com adenomas ($p < 0,05$). •
adenoma, + hiperplasia relacionada a NEM-1 e * carcinoma.
- 24 Expressão semiquantitativa do mRNA do TIMP3 (A), IRF1 (B), 91
RhoA (C) e PTK7 (D) em adenomas e hiperplasias relacionadas a
NEM-1 e carcinomas de paratireóides. Verifica-se maior expressão
do TIMP3 em adenomas que em carcinomas ($p < 0,05$); o inverso
ocorreu com o gene PTK7, com maior expressão em carcinomas ($p < 0,05$); o gene IRF1 apresentou menor expressão nas neoplasias
que na glândula normal ($p < 0,05$). O gene RhoA mostrou-se
significativamente mais expresso em carcinomas que em
paratireóide normal, não tendo sido observada diferença
estatisticamente significativa entre adenomas e carcinomas. NOR =
paratireóide normal; U.A.D.O. = unidades arbitrárias de densidade
óptica. ■ tecido normal, • adenoma, + hiperplasia relacionada a
NEM-1 e * carcinoma.

25 Expressão semiquantitativa do gene RAF1. Análise comparativa 92
entre adenomas e hiperplasias relacionadas a NEM-1, carcinomas e
paratireóides normais. Não há quaisquer diferenças estatisticamente
significantes entre os grupos. NOR = paratireóide normal. U.A.D.O.=
unidades arbitrárias de densidade óptica. • adenoma, + hiperplasia
relacionada a NEM-1 e * carcinoma.

LISTA DE TABELAS

Tabela	Legenda	p.
1	Dados dos pacientes estudados. Iniciais, resultado do exame anátomo-patológico, e maior diâmetro tumoral. sHPT: hiperparatireoidismo secundário e NEM-1: neoplasia endócrina múltipla do tipo 1.	18
2	Os valores das colunas designadas Pré correspondem àqueles obtidos antes da cirurgia. Os valores das colunas Atual, correspondem à última dosagem realizada no Serviço. CaS = cálcio sérico, PTH (cadeia intacta) = paratormônio, OS = fosfato sérico. Valores normais CaS = 8,5-10,5 mg/dL, Cai = 4,0-4,8 mg/ dL e PS = 2,3-4,6 mg/dL.	19
3	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados nas PCR semiquantitativas	62
4	Valores obtidos após a quantificação das amostras utilizadas para confecção da sonda.	65
5	Contagem em cintilador beta das sondas utilizadas em cada uma das 4 hibridizações.	66
6	Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos entre adenoma e carcinoma nas duas membranas Atlas.	70
7	Classificação dos genes diferencialmente expressos nas membranas <i>no match</i> .	75
8	Seqüências do Blast NCBI obtidas por comparação após sequenciamento dos cDNAs isolados no RDA.	81

9	Valores obtidos após a quantificação de cada amostra. A absorbância representa os valores obtidos no comprimento de onda 260 nm.	84
10	Condições utilizadas para realização das PCRs para cada um dos genes estudados .	86
11	Resultados obtidos após a quantificação dos produtos das PCR para os genes selecionados em relação ao controle interno.	88
12	Valores de média e desvio padrão da expressão semiquantitativa dos genes estudados por RT-PCR em adenomas e carcinomas de paratireóide. Alguns destes genes tiveram sua expressão verificada em glândula normal.	90
13	Coeficiente de variação de Spearman (ρ) e teste t de Student (p) das correlações positivas ou negativas estatisticamente significantes entre as expressões semiquantitativas de genes estudados em adenomas e carcinomas de paratireóides e em glândulas normais.	93

LISTA DE QUADROS

Quadro	Legenda	p.
1	Diagnóstico anátomo-patológico original obtido no Hospital das Clínicas FMUSP.	20
2	Representação de três das sete placas de genes inéditos utilizadas para hibridização. A nomenclatura representada segue o Padrão Ludwig de identificação dos clones na qual as duas primeiras letras referem-se ao tipo de tecido utilizado, os três números seguintes correspondem à biblioteca do tecido. Na segunda linha a data da clonagem e na terceira linha a localização do clone na placa inicialmente utilizada.	36

Toscanini AC. *Identificação de genes diferencialmente expressos em tecido de paratireóide: comparação entre hiperplasias, adenomas e carcinomas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

INTRODUÇÃO: Os mecanismos moleculares que levam ao desenvolvimento do hiperparatireoidismo primário (pHPT) ainda são desconhecidos. No entanto, alguns genes parecem ter seu papel definido na oncogênese das paratireóides, como os genes PRAD1 e MEN-1 que apresentam expressão aumentada em adenomas de pacientes com pHPT em relação ao tecido normal. Outro achado importante é a expressão aumentada do gene HRPT2 em carcinomas de paratireóide familiares ou não. A distinção entre hiperplasia, adenoma e carcinoma é difícil pelas limitações técnicas dos exames histo-patológicos atuais. Assim, este estudo tem como objetivo central identificar genes que possam servir como marcadores diferenciais entre hiperplasia, adenoma e carcinoma em pacientes com pHPT, com o intuito utilizá-los de forma auxiliar no diagnóstico diferencial destas condições.

MÉTODOS: Foram empregadas três metodologias: 1) utilização de clones obtidos no Projeto Genoma Humano do Câncer (HCGP) que foram fixados em membrana e hibridizados com sonda ora de adenomas (n = 2) ora de carcinoma (n = 1). 2) utilização de membranas comerciais (Atlas[®] cDNA Expression Array Human Oncogene/Tumor Suppressor, Human Cancer 1.2. BD Biosciences Clontech. Palo Alto, USA) contendo respectivamente 190 e 1176 genes conhecidos, utilizadas como substrato para hibridização com sondas de adenoma e carcinoma. 3) desenvolvimento da técnica de RDA (*Representational Difference Analysis*) para

obtenção de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos que foram clonados e seqüenciados para posterior análise. Os genes diferencialmente expressos, entre adenoma e carcinoma obtidos nas três metodologias tiveram sua expressão confirmada por RT-PCR em tecidos de paratireóide de pacientes portadores de pHPT, entre eles: hiperplasias, adenomas e carcinomas. RESULTADOS: foram escolhidos para confirmação por PCR os genes: IRF-1, RAF, TIMP-3, NOTCH-2 e bFGF, cuja expressão nas membranas mostrou-se aumentada nos adenomas e os genes IGF-1-R, PTK7 e RET, cuja expressão mostrou-se elevada nos carcinomas. Dois genes tiveram sua expressão diferencial confirmada. O gene IRF-1, apresenta expressão diminuída nas três condições estudadas (hiperplasia, adenoma e carcinoma) quando comparada à expressão do tecido normal. O gene PTK7, confirmou sua expressão aumentada nas amostras de carcinomas quando comparadas às hiperplasias e aos adenomas. DISCUSSÃO: Os dois genes que apresentaram sua expressão diferencial confirmada, IRF-1 e PTK7, não foram, até o momento, descritos como coadjuvantes no aparecimento e progressão tumoral nas paratireóides. Nossos achados associaram o gene supressor tumoral IRF-1 ao aparecimento de alterações morfológicas e funcionais nas paratireóides, uma vez que sua expressão nos tecidos acometidos por hiperplasia, adenoma ou carcinoma é sensivelmente menor que aquela encontrada nos tecidos normais, sugerindo que este gene tenha importante papel nos eventos iniciais de tumorigênese desta glândula. Por outro lado, expressão aumentada de PTK7 já foi descrita em tumores malignos de diversos tecidos. Embora seus mecanismos de ativação e ação permaneçam desconhecidos, nossos achados corroboram os da literatura e sugerem que este gene participe dos mecanismos moleculares de transformação celular nas paratireóides.

Toscanini AC. *Identification of differentially expressed genes in parathyroid tissue: comparison among hyperplasias, adenomas and carcinomas [thesis]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo, 2004.*

INTRODUCTION: The molecular mechanisms to the development of primary hyperparathyroidism (pHPT) are still unknown. Otherwise, several genes as PRAD1 and MEN-1 seem to play a role in parathyroid oncogenesis and are highly expressed in adenomas of pHPT patients when compared to normal glands. Another important data is the increased expression of HRPT2 in familiar and non-familiar parathyroid carcinomas. The distinction among hyperplasia, adenoma and carcinoma is a difficult task because there are limits in histopathologic parathyroid analysis in our days. This study has as main goal to identify genes that might help to distinguish hyperplasias from adenomas and both from carcinomas in pHPT patients. **METHODS:** Three techniques were employed: 1) clones from Human Cancer Genome Project (HCGP) fixed in membranes and hybridized with adenomas or carcinoma probes; 2) commercially available membranes (Atlas[®] cDNA Expression Array Human Oncogene/Tumor Suppressor, Human Cancer 1.2. BD Biosciences Clontech. Palo Alto, USA) which contain 190 and 1176 identified genes that were employed as substrate to hybridization with adenomas (n = 2) and carcinoma (n = 1) probes; 3) RDA technique (Representational Difference Analysis) in order to obtain differentially expressed cDNA fragments what in other steps were cloned and sequenced for further analysis. The genes, obtained from the three methods, that were differentially expressed between adenomas and carcinomas

had their expression evaluated by RT-PCR in parathyroid tissues from patients bearing pHPT caused by hyperplasias, adenomas or carcinomas. RESULTS: genes chosen for PCR analysis: IRF-1, RAF, TIMP-3, NOTCH-2 and bFGF, whose expressions in the membrane were increased in adenomas and the genes IGF-1-R, PTK7 and RET, whose expression in the membrane were increased in carcinomas. Two genes had their differential expression confirmed. The IRF-1 had a decreased expression in the three situations of pHPT (hyperplasia, adenoma and carcinoma) when compared to its expression in the normal gland. The gene PTK7 confirmed its increased expression in samples obtained from carcinomas when compared to hyperplasias or to adenomas. DISCUSSION: The two genes whose differential expressions were confirmed, IRF-1 and PTK7, have not been described till this moment as coadjutants in the beginning or progression of parathyroid tumors. Our results associate the tumor suppressor gene IRF-1 to the origin of morphological and functional disturbs in parathyroid, because its expression in hyperplasia, adenoma or carcinoma of this gland were clearly lower in these conditions when compared to normal tissues, thus suggesting an important role of this gene in early steps of parathyroid oncogenesis. On the other hand, increased expression of PTK7 has already been described in malignant tumors of several tissues. Although their mechanisms of activation and action remain unknown, our results reinforce the literature data and suggest that this gene shares the molecular mechanisms of cell transformation in parathyroids.

1. INTRODUÇÃO

1.1. As paratireóides

As paratireóides foram descobertas em 1880 pelo estudante de medicina sueco Ivar Sandstrom. Sabe-se hoje que estas glândulas normalmente pesam entre 35 e 50 mg, localizam-se na face posterior da tireóide, podendo ser encontradas algumas vezes no interior da tireóide ou ainda no mediastino, próximo ao timo. Quanto ao número, é variável entre indivíduos, encontrando-se quatro paratireóides em 84% dos adultos normais, três paratireóides em 1 a 7% e cinco glândulas em 3 a 13% dos adultos normais¹.

Cada uma das glândulas paratireóides é envolvida por uma cápsula de tecido conjuntivo, de onde partem trabéculas contínuas com as fibras reticulares que sustentam os grupos de células secretoras².

Histologicamente, cada paratireóide apresenta parênquima formado por células epiteliais dispostas em cordões anastomosados, havendo três tipos celulares principais: células fundamentais ou principais, responsáveis pela secreção do paratormônio (PTH)³, células oxífilas cuja função permanece pouco compreendida e aproximadamente 30% de células adiposas dispersas homogeneamente pela glândula normal. Outros tipos celulares foram descritos, quais sejam: células cromóforas, células cromófilas e células claras. Estas últimas podem ser vistas formando raros adenomas, porém, a função destes tipos celulares, presentes em menor quantidade, ainda é desconhecida⁴.

As paratireóides, pela ação do PTH, atuam sobre o metabolismo do cálcio e do fósforo e com isto, sobre o tecido ósseo e a excitabilidade neuromuscular elevando

os níveis de cálcio plasmático⁵, mobilizando cálcio dos ossos e aumentando a excreção urinária de fosfatos.

Podemos dividir os distúrbios funcionais primários destas glândulas em dois grandes grupos:

1. Hipoparatiroidismo: distúrbio clínico-funcional com poucas alterações anatômicas que leva a uma secreção deficiente de PTH, resultando em hipocalcemia e hiperfosfatemia. Entre suas muitas causas estão: ablação cirúrgica das quatro glândulas, ausência congênita das paratireóides e algumas doenças autoimunes ou síndromes autossômicas raras⁶.
2. Hiperparatiroidismo (HPT): distúrbio clínico-funcional onde ocorre secreção excessiva de PTH. É a principal causa de hipercalcemia sérica em pacientes não hospitalizados⁷. A relação homem:mulher é 1:2, sua incidência aumenta com a idade e cerca de 2% das mulheres menopausadas apresentam hiperparatiroidismo primário⁸. O HPT pode ser classificado em três subtipos: primário, secundário e terciário.

O hiperparatiroidismo primário (pHPT) produz hipersecreção autônoma de PTH, promovendo hipercalcemia e hipofosfatemia. O HPT secundário, também está associado à produção excessiva de PTH, porém como resposta a uma doença de base que gere hipocalcemia⁶, e o HPT terciário indica a transformação do secundário em primário, ou seja, a glândula torna-se autônoma.

O pHPT caracteriza-se por proliferação celular aumentada, geralmente em uma das paratireóides e hipersecreção de PTH independente dos níveis séricos de

cálcio⁸. Os principais efeitos relacionados a esta condição são: aumento da reabsorção óssea e mobilização de cálcio a partir do esqueleto, aumento da reabsorção tubular renal com retenção de cálcio e aumento da síntese renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Aproximadamente, 80-85% dos casos de pHPT esporádico podem ser atribuídos a adenomas, 15% a hiperplasias, 5% a adenomas duplos (ocorrência de dois adenomas na mesma glândula ou em glândulas distintas) e em menos de 2% dos casos, a carcinomas.

2.2. Tumorigênese paratireoideana

Nas últimas duas décadas, grandes avanços no entendimento dos mecanismos oncogênicos puderam ser observados ao nível molecular. Estes novos conhecimentos revelaram inúmeros “alvos” para o desenvolvimento de terapias e drogas. Estes alvos identificaram tanto eventos precoces como tardios no processo carcinogênico, oferecendo assim, oportunidade de prevenção.

Desenvolvimento e progressão tumoral envolvem uma enorme e, ainda desconhecida, cascata de alterações genéticas. Acredita-se que a glândula normal possa tomar três caminhos: evoluir para hiperplasia policlonal e posterior adenoma monoclonal, ou diretamente adenoma ou carcinoma monoclonais.

Pouco se sabe acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão tumoral das paratireóides, porém, esta progressão pode ser associada principalmente à ativação de proto-oncogenes e à inativação de genes de supressão tumoral.

2.2.1. *Proto-oncogenes*

Proto-oncogenes são genes normalmente envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular. Estes genes, quando têm sua expressão aumentada, seja por mutação ou por translocação cromossômica, entre outros mecanismos, passam a ser denominados oncogenes e podem contribuir para a transformação neoplásica.

Ao contrário dos genes supressores tumorais, que precisam ter dois alelos mutados para induzir transformação celular, um único alelo mutante é suficiente para alterar o fenótipo de uma célula de normal para neoplásica, podendo participar na tumorigênese por meio de seus produtos proteicos via três mecanismos principais:

1. Fosforilação de substratos proteicos ricos em serina, treonina e tirosina.

As proteíno-quinases dependentes de serina/ treonina têm diversos papéis na proliferação celular. O produto do proto-oncogene pode induzir tanto proliferação (alguns fatores de crescimento) quanto catálise (alguns receptores para fatores de crescimento)⁹.

2. Controle da transcrição de DNA, codificando proteínas nucleares.

Algumas destas proteínas funcionam como fatores de transcrição. A atividade excessiva de fatores de transcrição ou fatores de transcrição mutados pode produzir hiperexpressão ou repressão de expressão gênica¹⁰.

3. Sinalização via GTPases¹¹. Proteínas G consistem em três subunidades protéicas (α , β e γ). No estado de repouso, o nucleotídeo GDP permanece fortemente ligado à subunidade α , configurando aí o estado inativado do complexo proteína G. Quando este complexo é ativado,

ocorre uma dissociação entre o GDP e a subunidade α . O GDP é rapidamente substituído por GTP, que ativa a proteína G. Como consequência, temos o aparecimento de dois complexos protéicos: um α e outro $\beta\gamma$, um destes ou ambos podem ativar efetores, como adenilciclase. O complexo nesta situação está ativado. Em poucos segundos, a subunidade α , que é uma GTPase, hidrolisa GTP a GDP. Isto inativa a subunidade α , permitindo sua recombinação com a subunidade $\beta\gamma$, levando o complexo novamente à posição inativada.¹² As duas formas de GTPase envolvidas na regulação da proliferação celular são a proteína G, heterotrimérica e, *ras*, monomérica. As proteínas *ras* funcionam de forma semelhante, porém por meio de efetores únicos. Proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) estimulam as GTPases das proteínas *ras*.

2.2.2. Genes de supressão tumoral

Genes supressores tumorais geralmente codificam proteínas que inibem proliferação celular. A perda de um ou mais desses genes reguladores contribui para o desenvolvimento de diversos tumores malignos. Cinco classes amplas de proteínas são usualmente reconhecidas por serem codificadas por genes supressores tumorais, são elas:

1. Proteínas intracelulares como o inibidor da ciclina-cinase p16, que regula ou inibe a progressão para um estágio específico do ciclo celular;
2. Receptores para hormônios secretadores, como por exemplo o fator de crescimento derivado de tumor β , que age inibindo proliferação celular;

3. Proteínas de controle que interrompem o ciclo celular quando o DNA é danificado ou quando a estrutura cromossômica for anormal;
4. Proteínas que promovem apoptose;
5. Enzimas que participam dos mecanismos reparadores de DNA.

Embora as enzimas de reparo de DNA não funcionem diretamente inibindo proliferação celular, células que perderam a habilidade de reparar erros, falhas ou alterações terminais na cadeia de DNA, acumulam mutações em muitos genes, incluindo aqueles que são críticos no controle do crescimento e proliferação celular. Assim, mutações com perda de função em genes que codificam enzimas de reparo de DNA promovem inativação de outros genes supressores tumorais bem como a ativação de oncogenes.

Em geral, uma cópia de um gene supressor tumoral é suficiente para controlar proliferação celular. Desta maneira, ambos alelos de um gene supressor tumoral devem ser perdidos ou inativados para promover desenvolvimento neoplásico, hipótese elegantemente demonstrada por Knudson em retinoblastomas¹³. Pode-se concluir que mutações oncogênicas tipo perda de função neste tipo de genes agem recessivamente. Em diversos tumores malignos, podem ser encontradas deleções ou mutações pontuais em genes supressores, que inibem a produção de determinada proteína ou levam à produção de uma proteína sem função.

2.3. Hiperplasia das paratireóides

A hiperplasia consiste no aumento do número de células de um órgão ou tecido que pode, em consequência, aumentar o seu volume. Hiperplasias podem ocorrer

tanto em casos de hiperparatireoidismo primário como secundário¹⁴. A hiperplasia primária das paratireóides pode ocorrer de modo esporádico ou em síndromes, como na Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 1 (NEM-1), que pode cursar com tumores de pâncreas e hipófise¹⁵ e na Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 2A (NEM-2A), que também pode apresentar em seu fenótipo carcinoma medular de tireóide e feocromocitoma. O gene responsável pela NEM-1 foi clonado^{16,17,18,19,20,21} e algumas mutações foram identificadas nos indivíduos portadores desta síndrome^{22,23,24}. Na NEM-1, já foram descritas mutações em outros genes como, por exemplo, no p53, com uma frequência muito menor que as que ocorrem no gene NEM-1. A NEM-2^a tem como principal alteração genética mutações germinativas em um dos cinco resíduos cisteína nos exons 10 e 11 do protooncogene RET.

2.4. Adenoma de paratireóide

Adenomas são neoplasias epiteliais benignas, consideradas monoclonais em estudos de inativação do cromossomo X e que aparecem apenas em casos de hiperparatireoidismo primário²⁵.

Procurando definir padrões moleculares para os adenomas, alguns estudos mostraram que a expressão do receptor sensível ao cálcio (CaSR) está diminuída nestes tumores, o que pode estar relacionado com o aumento da secreção de PTH²⁶. Outros apontam maior expressão de FGF₃ em tecido paratireoideano normal quando comparado aos adenomas desta glândula^{27,28}.

A identificação de rearranjos no DNA do cromossomo 11 em dois adenomas de paratireóide levou à descoberta do oncogene PRAD₁²⁹, posteriormente identificado como o gene codificador da ciclina D₁³⁰. Uma inversão pericentromérica indica um

rearranjo entre os genes do PTH e PRAD₁, tendo como resultado a hiperexpressão da ciclina D₁. Este rearranjo foi inicialmente encontrado em um subtipo (5 %) de grandes adenomas de paratireóide. No entanto, a hiperexpressão da proteína ciclina D₁ foi encontrada em 18 % dos adenomas paratireoideanos³¹. As ciclinas D regulam a fase G1 do ciclo celular pela fosforilação da proteína supressora de tumor RB, o que leva à inativação do gene RB, promovendo replicação celular³². Assim, desregulação ou hiperexpressão da ciclina D₁ em células paratireoideanas pode acelerar a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular, causando proliferação celular excessiva sem, necessariamente, induzir fenótipo maligno.

O proto-oncogene RET, relacionado aos casos de hiperparatireoidismo associados à NEM-2, não evidenciou mutação quando analisado em pacientes portadores de hiperparatireoidismo primário esporádico³³.

Estudos de perda de heterozigosidade sugerem a existência de genes supressores tumorais nas regiões 1p, 11q, 6q, 11p e 15q³⁴. A região 1p35-p31 contém um excelente candidato a gene supressor de tumor, o gene p18, cujo produto, a ciclina cinase-dependente-6 (CDK6), que é regulador do ciclo celular e inibe ciclina D₁. A ciclina D₁ é considerada um oncogene, assim, a inativação de seu inibidor poderia causar o crescimento da glândula. No entanto, um estudo dos exons do gene p18, não evidenciou mutação em 25 adenomas de paratireóide³⁵.

2.5. Carcinoma de paratireóide

O diagnóstico patológico de carcinoma de paratireóide em alguns pacientes é intraoperatório quando é encontrada uma massa tumoral endurecida que invade estruturas adjacentes³⁶. Carcinomas de paratireóide tendem a estarem localizados

nas glândulas inferiores³⁷. Macroscopicamente, enquanto adenomas são macios, de coloração marrom avermelhada e ovais, os carcinomas tendem a ser grandes (> 3 cm), de consistência firme, lobulados e com uma densa cápsula fibrótica a seu redor. Todavia, é possível encontrar carcinomas de paratireóide pequenos e localizados o que representa um desafio aos patologistas.

As características histológicas dos carcinomas de paratireóide foram descritas por Shantz e Castelman³⁸ e incluem:

1. Pranchas uniformes de células arranjadas de modo lobulado cortado por trabéculas de tecido fibroso;
2. Presença de invasão capsular ou vascular;
3. Presença de figuras mitóticas, claramente diferentes daquelas observadas em células endoteliais.

Uma análise recente realizada em 27 pacientes portadores de carcinoma de paratireóide mostrou invasão vascular com presença de células em mitose e padrão trabecular em 37% dos casos, apenas invasão vascular foi encontrada em 26% dos casos e invasão trabecular e linfática em apenas 11% dos pacientes³⁹. Estes dados corroboram os da literatura, mostrando que os critérios clássicos patológicos nem sempre estão presentes no carcinoma de paratireóide. Ademais, figuras mitóticas e padrão trabecular podem também ser encontrados em adenomas de paratireóide⁴⁰.

Diversos oncogenes e genes supressores foram, inicialmente, associados ao aparecimento de carcinomas de paratireóide. A perda de uma região no cromossomo 13 foi citada por diversos autores⁴¹. Esta região contém o gene que codifica a proteína do retinoblastoma (RB) e o gene hereditário da susceptibilidade de carcinoma de mama (BRCA2), ambos supressores tumorais.

Por outro lado, recentemente foi descrita a ausência de mutações somáticas específicas tanto no gene RB como no BRCA2 sugerindo que eles não atuam como genes supressores tumorais clássicos na patogênese dos carcinomas paratireoideanos.

O gene supressor tumoral HRPT2, foi descrito recentemente e localiza-se no cromossomo 1. Este gene codifica uma proteína denominada parafibromina⁴². Mutações neste gene foram descritas e fortemente relacionadas ao hiperparatireoidismo associado a tumores de mandíbula (HPT-JT) e no desenvolvimento de alguns tumores esporádicos nas paratireóides⁴³. Foram encontradas mutações inativadoras da codificação da proteína parafibromina no gene do HRPT2 em 10 de 15 carcinomas de paratireóide: em 6 casos foi demonstrada presença de mutações somáticas e em 3 casos, germinativas⁴⁴. Mutações somáticas deste gene também foram descritas em quatro de quatro carcinomas de paratireóide⁴⁵. Foi proposto que mutações no HRPT2 constituem eventos iniciais que podem evoluir para doenças paratireoideanas malignas. Assim, estas mutações podem ser marcadores de doença maligna na paratireóide, tanto em tumores esporádicos como em familiares.

Foi demonstrado que o oncogene PRAD1 está freqüentemente hiperexpresso no carcinoma de paratireóide sugerindo que ele possa estar envolvido na transformação maligna destes tumores⁴⁶.

2.6. Distinção histológica entre tumores de paratireóide

Diferenciar adenomas de hiperplasias é tarefa difícil, considerando as limitações técnicas e a grande variedade celular. As características histológicas utilizadas

tradicionalmente na diferenciação entre estes dois tipos de alterações glandulares são controversas e pouco conclusivas.

O aparecimento de lesão única, rodeada por uma borda de tecido normal sugere adenoma e tem sido uma das ferramentas utilizadas nessa distinção, enquanto que o aumento de múltiplas glândulas, mesmo que apenas microscopicamente, representa hiperplasia. Os raros casos de adenomas duplos requerem atenção especial no exame anátomo-patológico.

Considerando que o acometimento de apenas uma glândula sugere adenoma e que o das quatro sugere hiperplasia, seria necessário obter uma pequena amostra de cada uma das quatro glândulas para certificar-se do diagnóstico. Como as paratireóides são glândulas extremamente sensíveis e por vezes a simples manipulação pode alterar sua função, cabe ao cirurgião avaliar todas as glândulas e procurar certificar-se de que as não retiradas estejam normais.

As dificuldades aumentam quando se somam a estes dois tipos patológicos os carcinomas. Embora os padrões histológicos para diagnóstico destes tumores sejam claros, como o aparecimento de invasão capsular e vascular ou o posterior aparecimento de metástases, freqüentemente ocorrem casos intermediários, onde a invasão é incompleta ou o padrão celular é trabecular, ou ainda, quando há necrose *in situ*.

Assim, é fundamental somar à experiência do cirurgião, o exame anátomo-patológico e, principalmente, o quadro clínico e laboratorial de cada caso para procurar obter o diagnóstico mais preciso.

Com o objetivo de selecionar genes envolvidos em cada um desses processos e, conseqüentemente, identificar seus possíveis marcadores, técnicas de biologia molecular vêm sendo exaustivamente utilizadas nas últimas décadas.

2.7. Técnicas de Biologia Molecular para o estudo da expressão gênica

Técnicas freqüentemente utilizadas para o estudo das alterações de expressão gênica como reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa (RT-PCR), reação de polimerase em cadeia de longa distância (LD-PCR) e *Northern Blot*, têm suas limitações. Algumas utilizam grandes quantidades de RNA, outras são demoradas e laboriosas e limitam-se ao estudo de um pequeno número de genes simultaneamente.

Genericamente, podem ser empregadas duas abordagens para se iniciar um estudo molecular. A primeira é a utilização do conhecimento atual sobre os mecanismos fisiopatológicos da doença como ponto de partida para a seleção dos genes de interesse a serem investigados. Com esta abordagem, o estudo de doenças poligênicas requer a análise individual de uma grande quantidade de genes. Uma segunda abordagem, que possibilita a visualização da interação entre genes, é o uso de painéis gênicos.

2.7.1. Macroarranjos de cDNA

O Projeto Genoma Humano iniciou a “Era da Genômica”. Bancos de dados internacionais foram criados para armazenar de forma ordenada os resultados deste Projeto. Milhares de genes conhecidos e desconhecidos foram catalogados utilizando-se os mais diversos critérios. A criação desta rede, onde puderam ser agrupados muitos dos genes seqüenciados, facilitou a análise interativa entre eles e seus mecanismos de ação.

No Brasil, o Projeto Genoma Humano do Câncer (HCGP) também gerou seqüências. O genes que à época (1999-2000) não puderam ser agrupados de

acordo com suas características estruturais e catalogados entre aqueles conhecidos, foram classificados como *no matches*, ou seja, inéditos.

Muito embora o estudo de genes conhecidos, sabidamente relacionados aos processos envolvidos no crescimento neoplásico, seja de grande importância, estudar genes inéditos, obtidos de genes expressos em tecidos acometidos por tumores malignos também alberga grandes expectativas na busca por marcadores tumorais.

A exorbitante quantidade de informações disponível nos Bancos de Dados Internacionais nos leva a analisar os genes e suas interações, criando perfis de expressão passíveis de serem correlacionados, ao invés de estudar isoladamente cada gene.

A recente tecnologia de *microarrays*, que possibilita a comparação simultânea de milhares de genes em uma única hibridização, tem sido muito utilizada para comparar situações clínicas diferentes e procurar estabelecer padrões entre elas.

Em menor escala, os *macroarrays* possibilitam o estudo de centenas de genes conhecidos, fixados em membranas disponíveis comercialmente. A hibridização comparativa de painéis de cDNA é uma ferramenta importante na determinação da expressão gênica entre dois ou mais tecidos. A literatura não apresenta trabalhos realizados com tecido de paratireóide, porém, em outros tecidos, como por exemplo, estômago⁴⁷, pâncreas⁴⁸ e fígado⁴⁹, esta metodologia mostra excelentes resultados na identificação de expressão diferencial.

2.7.2. Análise da representação diferencial (RDA)

Nos últimos anos foram desenvolvidas técnicas em biologia molecular capazes de identificar diferenças gênicas entre duas populações. Estas técnicas representam ferramentas importantes para detecção de alterações na expressão do mRNA pelo enriquecimento seletivo das amostras sem qualquer conhecimento prévio sobre a sequência ou informação contida dos genes em questão.

Entre as metodologias mais utilizadas para clonar genes diferencialmente expressos estão: *representational difference analysis* (RDA), *differential display* (DD) e *subtractive hybridization* (SH). Em suma, todas foram desenhadas para amplificar e isolar seqüências de ácidos nucleicos presentes em uma amostra e ausentes na outra. Entre os fatores que devem influenciar a escolha de uma ou outra metodologia estão:

1. Habilidade de amplificar mRNAs escassos.
2. Nível de diferenças de expressão detectável.
3. Habilidade de comparar múltiplas amostras simultaneamente.
4. Número de falsos positivos em relação ao número de genes diferencialmente expressos isolados.

O RDA consiste na utilização da técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) como base para a hibridização subtrativa de fragmentos de cDNA representativos de duas populações, utilizada para obtenção de fragmentos de cDNA que, clonados e seqüenciados, podem ser identificados e estudados. Nela ocorre seleção positiva das seqüências diferencialmente expressas e remoção das seqüências comuns entre as populações

A literatura não é conclusiva na diferenciação entre hiperplasia, adenoma e carcinoma de paratireóide. Esta diferenciação é decisiva para uma conduta

cirúrgica ideal, quando necessária, e para o estabelecimento do prognóstico adequado. Os avanços recentes da biologia molecular oferecem ferramentas importantes na busca de marcadores tumorais bem como na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese destas glândulas.

3. OBJETIVOS

Identificar genes diferencialmente expressos entre adenomas e carcinomas de paratireóide, utilizando para hibridização com sondas de adenoma e carcinoma:

1. Painéis de genes conhecidos relacionados ao câncer e à biologia tumoral;
2. Painéis gênicos construídos a partir de genes inéditos obtidos no HC GP;
3. Painéis contendo o produto da análise da representação diferencial entre adenoma e carcinoma.

Confirmar a expressão dos genes selecionados por RT-PCR em 36 tecidos de paratireóide, entre eles: hiperplasias, adenomas e carcinomas.

4. CASUÍSTICA

Todos os pacientes ou seus representantes legais assinaram o Termo de Consentimento Pós-Informação (Anexo 1) após terem sido devidamente informados quanto à finalidade da pesquisa, riscos envolvidos e conseqüentes benefícios científicos. Este Termo está de acordo com as normas aprovadas pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo 2).

Trinta e cinco pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob a supervisão da Unidade de Metabolismo Ósseo do Serviço de Endocrinologia e Metabologia desse Hospital foram submetidos à cirurgia.

Os tumores coletados consistiam em: 3 carcinomas, 23 adenomas e uma hiperplasia de pacientes portadores de hiperparatireoidismo primário esporádico, sem evidência de doença recorrente após a cirurgia, 5 casos de hiperplasia associada a NEM-1 e 3 hiperplasias de pacientes portadores de hiperparatireoidismo secundário. O seguimento clínico destes pacientes foi realizado entre 12 e 76 meses, com média de 44.4 meses. Os pacientes portadores de NEM-1 tiveram seu diagnóstico confirmado clinicamente pelo aparecimento de tumores em pituitária e pâncreas em 4 casos e em pâncreas em um.

Os tumores foram coletados a fresco em condições estéreis, durante o ato cirúrgico e imediatamente colocados em tubo de polipropileno para congelamento, contendo 1 mL da Solução Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati,

EUA). Os tumores foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados para uso posterior .

Tabela 1. Dados dos pacientes estudados. Iniciais, resultado do exame anátomo-patológico, e maior diâmetro tumoral. sHPT: hiperparatireoidismo secundário e NEM-1: neoplasia endócrina múltipla do tipo 1.

Iniciais	Diagnóstico Anátomo-patológico	Maior Diâmetro Tumoral (cm)
GCB	Hiperplasia	-
JAS	Hiperplasia	1,7
CB	Hiperplasia_NEM-1	-
LB	Hiperplasia_NEM-1	-
MEMD	Hiperplasia_NEM-1	3,8
SB	Hiperplasia_NEM-1	-
WA	Hiperplasia_NEM 1	-
AAC	Adenoma	1,4
ABF	Adenoma	1,5
AJC	Adenoma	2,0
AMR	Adenoma_	2,0
AN	Adenoma	1,5
BPC	Adenoma	2,6
DCM	Adenoma	0,8
JSO	Adenoma	1,3
LBC	Adenoma	1,3
LLC	Adenoma	2,6
LRE	Adenoma	1,2
LRSK	Adenoma	6
MJVS	Adenoma	1,6
MM	Adenoma	0,5
PJS	Adenoma	0,3
RMS	Adenoma	1,3
RPM	Adenoma	1,7
SMA	Adenoma	0,7
SMC	Adenoma	1,5
VCT	Adenoma	1,5
ZAP	Adenoma	1,7
TJR	Adenoma	2,5
MST	Adenoma atípico	4,0
MRG	Carcinoma	3,0
VJS	Carcinoma	3,2
MG	Carcinoma	6,5

Os dados dos pacientes foram divididos em:

A. Dosagens bioquímicas (Tabela 2)

B. Dados histopatológicos (Quadro 1)

Tabela 2. Os valores das colunas Atual, correspondem à última dosagem realizada no Serviço. CaS = cálcio sérico, PTH (cadeia intacta) = paratormônio, PS = fosfato sérico. Valores normais: PTH = 10-62 (pg/ mL), CaS = 8,5-10,5 mg/dL, Cai = 4,0-4,8 mg/ dL e PS = 2,3-4,6 mg/dL.

Iniciais	CaS (mg/dL)		Cai (mg/dL)		PTH (pg/mL)		PS (mg/dL)	
	Pré	Atual	Pré	Atual	Pré	Atual	Pré	Atual
GCB	9,7	12,1	5,0	6	1165	<17,8	6,5	5,3
JAS	10,6	10,1	5,6	5,3	69	35	2,6	3,8
CB	10,2	8,8	5,2	-	63	33	2,7	3
LB	10,0	10,5	5,6	5,2	71,4	<17,8	2,4	4,8
MEMD	9,9	9,1	5,6	5,4	1329	<17,8	2,5	4,5
SB	11,1	10,2	5,6	1,3	89	30	3,5	4,2
WA	11,0	9,4	6,0	5,1	86	54	3,9	4,9
MFP	11,1	6,9	4,9	3,5	2033	53	8,2	3,6
AAC	8,6	9,4	4,9	5,1	67	-	4,3	3,3
ABF	13,1	9,1	7,0	4,5	-	291	3,0	4,6
AJC	12,1	10,5	6,3	6,0	190	109	1,2	1,6
AMR	11,4	9,4	6,2	4,9	186	63	2,6	3,4
AN	10,2	9,5	5,3	-	87,7	16,3	3,2	3,7
BPC	10,8	9,3	5,7	1,28	51	13	2,8	3,6
DCM	8,8	9,1	4,7	5	87	17	3,9	4,4
JSO	11,8	7,9	6,4	4,3	150	23	3,5	3,9
LBC	10,2	9,2	4,6	4,8	82	64	3,5	3,8
LLC	8,3	8,9	4,6	4,8	229	57	2,4	3,9
LRE	10,1	9,2	5,3	5,2	240	39	2,7	3,5
LRSK	13,2	9,8	8,1	5,1	1281	79	2,5	3,4
MJVS	11,9	10,3	5,1	5,2	163	21	2,4	3,6
MM	10,4	9,5	4,8	1,1	63	39	3,1	3,3
PJS	10,6	7,7	6,0	3,5	191		2,4	2,7
RMS	11,6	9,9	5,9	5,0	270	46	2,7	4,2
RPM	11,9	9,5	6,8	5,0	530	89	2,4	2,7
SMA	8,6	8,0	4,8	4,1	-	-	-	3,4
SMC	10,8	10,0	4,7	4,4	77	21	3,4	3,9
VCT	11,3	9,7	5,6	5,1	145	18	2,1	3,6
ZAP	11,6	9,4	6,7	4,7	101	25	2,6	3,5
TJR	14,0	8,9	7,6	4,6	172	26	2,1	4,1
MST	12,5	8,7	4,7	4,5	915	24	2,0	2,9
MRG	15,3	9,4	8,7	5,4	1287	<17,8	2,6	3,6
VJS	15,5	9,5	8,1	5,4	1290	48	1,6	4,3
MG	15,0	15,4	9,4	9,5	2230	1985	1,3	3,1

Quadro 1

INICIAIS	DIAGNÓSTICO ORIGINAL GERADO NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS-FMUSP
AAC	produto de paratireoidectomia inferior esquerda: adenoma de paratireóide com predomínio de células principais
ABF	produto de exereses de paratireóide inferior direita: adenoma de paratireóide com predomínio de células principais. Produto de tireoidectomia parcial: tireoidite crônica de Hashimoto.
JC	produto de paratireoidectomia: adenoma de paratireóide. Produto de exereses de nódulo de tireóide: tireoidite crônica de Hashimoto.
AMR	produto de paratireoidectomia esquerda: adenoma de paratireóide. Produto de tireoidectomia: carcinoma papilífero bem diferenciado, multifocal, com invasão vascular e extensão extra-tireoideana com áreas de hiperplasia folicular.
AN	paratireóide inferior direita: adenoma de paratireóide com predomínio de células principais.
BPC	adenoma de paratireóide. Paratireóide superior direita normal .
CB	produto de exereses de paratireóide: proliferação de células principais formando nódulos, blocos e ácinos ao lado de células oncócicas, tendo vascularização habitual e adipócitos isolados. Hiperplasia de três paratireóides.
DCM	adenoma de paratireóide. Lobo esquerdo de tireóide: tireoidite crônica de Hashimoto.
GCB	produto de paratireoidectomia total: paratireóide superior direita: hiperplasia difusa de células principais, paratireóide inferior direita: hiperplasia difusa de células principais com áreas de calcificação.
JAS	produto de paratireoidectomia inferior esquerda: adenoma de paratireóide, com predomínio de células principais o diagnóstico de adenoma se faz pela correlação anátomo-clínica. Hiperplasia linfóide reacional de padrão histiocitose sisusal. Fragmento de tecido tireoideano dentro dos limites da normalidade.
JSO	exereses de paratireóide esquerda: hiperplasia nodular e difusa.
LB	Paciente portador de NEM-1. Produto de paratireoidectomia: hiperplasia de paratireóide.
LBC	paratireóide: adenoma de células principais medindo 1,0 cm de diâmetro. Lobo direito de glândula tireóide: tecido tireoideano dentro dos limites da normalidade
LLC	paratireóide superior direita: adenoma de paratireóide. Istmo de tireóide: tireoidite crônica de Hashimoto.
LRE	produto de paratireoidectomia de localização não especificada: adenoma de paratireóide (células principais). Istmo de tireóide e tecido tireoideano sem alterações histológicas significativas.

LRSK	produto de paratireoidectomia: adenoma de paratireóide inferior direita. Tecido tireoideano adjacente dentro dos limites da normalidade.
MEMD	paratireóide superior direita: hiperplasia nodular e difusa de células principais e oxifílicas, paratireóide inferior esquerda (intratireoideana): hiperplasia difusa de células principais e nodular e difusa de células oxifílicas.
MFP	produto de paratireoidectomia total: paratireóides inferior direita, superior direita e superior esquerda com hiperplasia difusa, paratireóide inferior esquerda apresentando extensas áreas de fibrose e calcificação. Bócio adenomatoso em tireóide.
MG	carcinoma de provável origem em paratireóide, em topografia de pólo inferior esquerdo de tireóide, infiltrando extensamente tecido fibroadiposo e parênquima tireoideano. Presença de êmbolos tumorais em vasos sanguíneos, neoplasia atingindo a margem cruenta de ressecção.
MJVS	paratireóide: adenoma de paratireóide. Tireóide: carcinoma papilífero bem diferenciado de lobo esquerdo, multifocal (2 nódulos medindo 0,6 e menos de 0,1 cm de diâmetro), ausência de extensão extra-tireoideana e invasão vascular. Tireoidite crônica de Hashimoto associada e linfonodo peri-ístmico livre de neoplasia (0/1).
MCM	produto de exereses de paratireóide: adenoma de paratireóide. Tireóide: carcinoma papilífero.
MMR	produto de paratireoidectomia total: paratireóide inferior esquerda: hiperplasia difusa de células oxifílicas. paratireóides superiores direita e esquerda e inferior direita: hiperplasia difusa de células principais e oxifílicas.
MRG	paratireóide superior direita: carcinoma de paratireóide, padrão trabecular, atividade mitótica baixa. Presença de invasão capsular e invasão vascular na cápsula tumoral. Lobo direito de tireóide: tireóide sem particularidades, fragmento de paratireóide inclusa sem particularidades .
MST	adenoma atípico de paratireóide medindo 4,0 cm de diâmetro. Presença de áreas de necrose tumoral e aderência ao lobo esquerdo sem infiltração do parênquima glandular. Pleomorfismo nuclear moderado. mitoses não identificadas, invasão capsular e vascular não detectadas. Lobo tireoideano esquerdo dentro dos limites da normalidade. fragmento de paratireóide superior direita com moderada infiltração
PJS	produto de paratireoidectomia total: hiperplasia de células principais da paratireóide (nos fragmentos submetidos a congelamento e um frasco designado paratireóide inferior direita), escassa representação de paratireóide no fragmento congelado e designado paratireóide inferior esquerda. Tecido tireoideano dentro dos limites da normalidade.
RMS	paratireóide inferior esquerda: adenoma de paratireóide.
RPM	produto de paratireoidectomia: adenoma de paratireóide, fragmento de paratireóide superior esquerda com moderada infiltração gordurosa. Tireóide dentro dos limites da normalidade.
SB	produto de exereses de paratireóides: hiperplasia de células principais nas quatro paratireóides analisadas.

SMA	adenoma de paratireóide inferior direita. Produto de tireoidectomia total: microcarcinoma papilífero multifocal variante clássica, presente no lobo superior direito com 0,4 cm e no lobo inferior esquerdo com 0,4 cm. Tireoidite crônica de Hashimoto com focos de hiperplasia nodular de células de Hurthle.
SMC	produto de exereses de paratireóide: adenoma de paratireóide superior direita, fragmento de paratireóide inferior esquerda sem particularidades. Lobo esquerdo de tireóide: tireoidite crônica de Hashimoto.
TJR	produto de exereses de paratireóide: adenoma de paratireóide com predomínio de células principais. Infiltração linfocitária em tireóide e discreta fibrose.
VCT	paratireóide superior direita: adenoma de paratireóide. gordura e linfonodo cervical -tecido linfóide reacional em meio a tecido adiposo.
VJS	produto de exereses de tumor de paratireóide inferior esquerda, lobo esquerdo tireoideano e esvaziamento recorrencial à esquerda: carcinoma de paratireóide inferior esquerda, medindo 2,8 x 2,8 x 1,8 cm, neoplasia de padrão trabecular, baixo índice mitótico invasão capsular presente, presença de paratireóide intratímica no esvaziamento recorrencial esquerdo. fragmento de paratireóide superior direita enviada em separado com discreta infiltração gordurosa.
WA	paratireóides dentro dos limites da normalidade (4 paratireóides). Timo dentro dos limites da normalidade para a idade. Paciente portador de NEM-1, sugere-se diagnóstico histológico de hiperplasia.
ZAP	produto de paratireoidectomia inferior direita: adenoma de paratireóide medindo 1,2 cm de diâmetro. Produto de tireoidectomia total: tireoidite crônica de Hashimoto e bócio adenomatoso.

Quadro1. Diagnóstico anátomo-patológico original, obtido no Hospital das Clínicas FMUSP.

5. MÉTODOS

Para identificação de genes diferencialmente expressos em tecido paratireoideano foram empregadas três metodologias:

1. Utilização de membranas Clontech (*Atlas cDNA Expression Arrays – Hybond Atlas Array Human Cancer* e *Hybond Oncogene and Tumor Supressor Genes*) contendo genes conhecidos envolvidos em tumorigênese em diversos tecidos. Estas membranas foram hibridizadas com sondas de cDNA marcado com α P^{32} dCTP de dois adenomas e um carcinoma.

2. Construção de membranas contendo genes obtidos no HCGP e sua posterior hibridização com sondas de cDNA marcado com α P^{32} dCTP de dois adenomas e um carcinoma.

3. Análise da Representação Diferencial (RDA) entre um adenoma e um carcinoma paratireoideano obtida por meio de sucessivas amplificações e hibridizações. Esta representação diferencial, obtida durante a comparação de duas populações – adenoma e carcinoma, corresponde aos genes presentes em uma população e ausentes na outra e vice-versa.

A expressão dos genes isolados pelas metodologias acima mencionadas, foi analisada por RT-PCR semiquantitativa em todas as amostras obtidas de tecido paratireoideano. Todo o delineamento experimental está representado na Figura 1

Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental.

4.1. Hibridização das Membranas Atlas

Foram utilizados dois modelos de membranas Clontech: *Atlas[®] cDNA Expression Array Human Cancer 1.2* (Figura 2) e *Human Oncogene/ Tumor Suppressor Gene BD Biosciences Clontech*. Palo Alto, EUA (Figura 3).

A primeira membrana contém 1.176 cDNAs de genes conhecidos relacionados a processos tumorigênicos em diversos tecidos. A membrana contém também cDNA plasmidial e de bacteriófagos utilizados como controles negativos para confirmar a especificidade da hibridização e alguns cDNAs de genes constitutivos, considerados controles positivos (*"housekeeping genes"*), para controlar a abundância de RNA.

Nas membranas *Atlas[®] cDNA Expression Array Human Cancer 1.2*, os genes aparecem fixados em seis zonas designadas de A a F, onde os cDNAs foram agrupados de acordo com algumas características funcionais em seis diferentes regiões.

1. Região A: Oncogenes e genes supressores de tumor, ciclinas, inibidores CDK, cinases reguladoras do ciclo celular, proteínas do ciclo celular.
2. Região B: Membros de redes cinase intracelulares, ativadores e inibidores de proteínas tirosino-cinase, proteínas G, moduladores da atividade GTPase, adenilato e guanilato ciclases, adaptadores e receptores intracelulares associados a proteínas, moduladores, efetores e transdutores intracelulares, proteínas fosfatases intracelulares.
3. Região C: Receptores e cinases para morte celular, proteínas associadas à apoptose, proteínas da família BCL, caspases, adaptadores e receptores associados a proteínas para morte celular, proteínas e ligases reparadoras de DNA.

4. Região D: Antígenos celulares de superfície, receptores de adesão intercelular, receptores hormonais, receptores de adesão da matriz, receptores de interferon e interleucinas, receptores de fatores de crescimento, proteínas de adesão celular, proteínas da cromatina e de ligação ao DNA, proteínas relacionadas ao *stress* celular, histonas, neuropeptídeos, metabolismo xenobiótico, receptores do tipo proteína-quinase, receptores ligados à proteína G, proteínas e receptores de adesão celular.
5. Região E: Citocinas e fatores de crescimento, interleucinas e interferons, moduladores, efetores e transdutores de sinais intracelulares, metaloproteínas, cisteíno-proteases, aspartato-proteases, serino-proteases, proteínas do Complexo Maior de Histiocompatibilidade, imunoglobulinas, proteínas comunicadoras extracelulares, amino e carboxipeptidases, receptores hormonais, inibidores de proteases, proteínas do sistema imune, enzimas envolvidas no *turnover* protéico, proteínas da matriz extracelular.
6. Região F: Co-fatores metabólicos, nucleotídeos metabólicos, proteínas do citoesqueleto relacionadas à motilidade celular, proteínas filamentosas intermediárias, proteínas marcadoras, proteínas transportadoras de RNA, proteínas processadoras do *turnover* de RNA, proteínas do metabolismo de hidratos de carbono simples e complexos, outras enzimas metabólicas, proteínas ribossomais, proteínas da matriz extracelular, proteínas do metabolismo de lipídeos simples, proteínas microfilamentosas, receptores hormonais, fatores de tradução.

A segunda membrana, *Hybond Atlas Oncogenes and Tumor Supressor Genes*, contém 190 cDNAs fixados em duplicata (Figura 2), controles negativos para confirmar a especificidade da hibridização e controles positivos (“*housekeeping genes*”) para controlar a abundância de RNA.

Os genes fixados nesta membrana são antígenos de superfície celular, fatores de transcrição, reguladores do ciclo celular, ciclinas, receptores de adesão celular, proteínas do sistema imune, oncogenes e genes supressores, transportadores e canais de membrana, proteínas da matriz extracelular, proteínas associadas à apoptose, receptores celulares, proteínas relacionadas à motilidade celular, reparo, recombinação e síntese celular, fatores ligados à replicação ou ainda, ligases.

1.1.1. Síntese das sondas marcadas

A etapa de síntese das sondas marcadas consiste em: escolha das amostras, extração de RNA, tratamento deste RNA com DNase e preparo das sondas que consiste na marcação radioativa do cDNA. Assim, temos:

A. Escolha das amostras:

Foram selecionados três tumores de paratireóide, dois adenomas e um carcinoma, para serem utilizados como sonda nas hibridizações contra as membranas.

Os tumores foram obtidos por ablação cirúrgica de pacientes portadores de hiperparatireoidismo primário. Estes tumores foram colhidos a fresco em condições estéreis durante o ato cirúrgico, fracionados em dois pedaços e colocados em dois tubos de polipropileno para congelamento, o primeiro contendo 1 mL da Solução Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, EUA) e o segundo, seco. Os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados para uso posterior.

B. Extração de RNA:

O RNA total foi extraído utilizando-se aproximadamente 100 mg de tecido tumoral fragmentado em pulverizador de tecido (Mikro-Dismembrator II, B. Braun, Melsungen, RFA) após a adição de nitrogênio líquido. O material pulverizado foi homogeneizado em 1 mL de solução Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, EUA) e incubado durante 5 min a 15° C. Posteriormente, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio à solução, agitando-a durante 15 s.

O homogeneizado repousou durante 3 min a 15° C. Em seguida, a amostra foi centrifugada durante 15 min a 10.000 rpm na temperatura de 4° C (centrífuga refrigerada Hettich EBA 12R. Tuttingen, RFA). Ao término da centrifugação a fase incolor aquosa foi transferida para outro tubo de 1,5 mL. O RNA presente nesta fase foi precipitado com a adição de 0,5 mL de álcool isopropílico para cada 1 mL de solução Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, EUA.). A mistura repousou durante 10 min em temperatura ambiente (TA) e foi posteriormente centrifugada a 10.000 rpm a 4° C.

O RNA precipitado é incolor, de aspecto gelatinoso e localiza-se na base do tubo. Após sucessivas lavagens com concentrações decrescentes de etanol (100% e 75%), o precipitado foi seco e, ressuspenso em solução Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 e armazenado a -70° C para posterior utilização. A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria [GeneQuant DNA/RNA Calculator (Pharmacia, LKB Biotechnology. Upsala, Suécia)]. Foram utilizados somente preparados de RNA com relação A260/A280 > 1,7. O material foi armazenado a 4° C até o seu processamento.

C. Tratamento com DNase:

As amostras de RNA foram tratadas com DNase (PROMEGA. Madison, EUA), para retirar possível contaminação com DNA genômico.

Para cada 1 µg de RNA foi usado 1U de DNase livre de RNase (PROMEGA. Madison, EUA) e adicionados tris-HCl 400 mM [pH 8,0], MgSO₄ 10 mM e CaCl₂ 10 mM. A reação foi incubada a 37 °C durante 1 h em termociclador “*Mini Cycler*” (MJ Research. Watertown, EUA). Para inibir a ação da enzima foi acrescentado solução contendo EGTA 2 mM [pH 8,0] e incubado a 65° C por 10 min.

Em todas as amostras tratadas com DNase foi realizada extração com fenol:clorofórmio na proporção de 1:1. Após centrifugação a 14.000 rpm por 1 min a 4° C, foi adicionado ao sobrenadante 2,5 X o volume de etanol 100 % gelado, 10 % acetato de sódio 3 M [pH 5,2] e 10µL de glicogênio livre de RNase, O RNA foi precipitado a -20° C *overnight* (ON). Após centrifugação a 14.000 rpm por 15 min a 4° C o sobrenadante foi descartado e o *pellet* precipitado novamente com etanol 70%. O *pellet* formado foi ressuspense em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,01 %. Estas amostras de RNA foram novamente quantificadas em espectrofotômetro “GeneQuant II RNA/DNA Calculator” (Amersham Pharmacia Biotech) em comprimento de onda de 260 nm e armazenadas a -80 °C até posterior utilização.

D. Síntese das sondas marcadas:

Finalmente, realizou-se o preparo das sondas marcadas a partir dos RNAs armazenados. Em cada tubo contendo os RNAs tratados, foram adicionados os *primers* de marcação específicos para cada membrana [11,0 µL RNA (5 µg) + 2,0 µL *primer* CDS 10µM]. As amostras foram incubadas durante 2 min a 70°C e em seguida a 50°C durante 30 min. Após 2 min de mudança de temperatura foram adicionados 11,0 µL do seguinte *mix*: 2,5 µL de tampão (*Buffer First Strand* 20X), 0,8 µL de dNTP 50mM (exceto dCTP), 14,0 µL de [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol – 10 mCi/mL), 2,0 µL de DTT 100mM, 4,0 µL de *Superscript II* 200/µL, totalizando 23,3µL para cada par de membranas.

Estas sondas foram purificadas em coluna para gel do Kit Qiagen (Missinanga, Ontário, Canadá), eluídas em 55 µL de *Elution Buffer* previamente aquecido e, em seguida, contadas em cintilador.

4.1.2. Hibridização das membranas

Cada uma das membranas foi pré-hibridizada em 5 mL de tampão de hibridização (*Express Hybridisation Buffer*) e 500 µg de DNA de esperma de salmão em tubo de vidro de 35 mm x 150 mm (Robbins Scientific) com agitação constante.

Após 30 min de pré-hibridização, as membranas foram hibridizadas ON (16h) a 68° C e lavadas com as soluções 1 (SSC 2x, SDS 1%) e 2 (SSC 0,1x e SDS 0,5%) durante 30 min, duas vezes cada uma. Uma lavagem final foi feita com 200 mL de SSC 2x em temperatura ambiente (TA). As membranas foram imediatamente removidas dos tubos de lavagem e colocadas em cassetes apropriados para exposição de material radioativo.

4.1.3. Análise das diferenças de expressão

Análise do perfil de expressão gênica por microarranjos de oligonucleotídeos:

A análise dos perfis de expressão gênica das amostras do adenoma e do carcinoma de paratireóide, utilizados como sonda nas hibridizações das membranas Atlas, foi realizada pelo cálculo do logaritmo de base dois ($\log_2$) da razão dos valores de D.O. de cada um dos genes individuais [$\log_2(a/c)$]. Fixou-se os limites superior do $\log_2(a/c) > 4.146$ e inferior do $\log_2(a/m) < -2.463$, correspondentes aos percentis 97,5 e 2,5 para os genes com expressão $a > c$ e $c > a$, respectivamente.

O cálculo dos quantis (valor Q) foi obtido pela classificação em escores dos valores de D.O., subtraídos de 0,5 e divididos pelo total de valores de densitometria

dos genes do painel⁵⁰. Os valores Q calculados para os genes expressos no adenoma (Qa) foi subtraído dos valores Q para os genes expressos no carcinoma (Qc). A interpolação entre os valores observados de Qa-Qc e os quantis esperados permitiu a identificação de genes cujas diferenças de expressão afastavam-se do ajuste à distribuição normal (Figura 4). Fixou-se os limites superior de $Qa-Qc > 0,57$ e inferior de $Qa-Qc < -0,57$, correspondentes aos percentis 97,5 e 2,5 para os genes com expressão $Qa > Qc$ e $Qc > Qa$, respectivamente.

Grupamento hierárquico

A coleção de genes com diferenças Qa-Qc acima e abaixo dos limites de corte foi particionada em subconjuntos de genes pela técnica de grupamento hierárquico (“hierarchical clustering”). Por seu caráter combinatório, o algoritmo proporciona a aglomeração, em um mesmo subconjunto, dos genes com um mesmo comportamento nas diferentes condições analisadas. O subconjunto inicial foi constituído pelos valores Qa e Qc de cada um dos genes e, calculando-se a distância entre cada subconjunto, combina-se os dois subconjuntos mais próximos.

O processo combinatório continua até que todos os pontos fiquem reunidos em um único grupamento final. Determinando-se o número de subconjuntos de genes, compõe-se uma árvore (dendograma) cujas extremidades correspondem aos genes individuais, o grupamento final único ao tronco e as combinações dos subconjuntos intermediários aos ramos. Os subconjuntos de genes com expressões similares em cada uma das condições, isto é, adenoma x carcinoma, foram arranjados visando maximizar a similaridade na expressão dos genes de um mesmo subconjunto e minimizar a similaridade na expressão entre subconjuntos distintos de genes. Utilizou-se a regra de Ward para definir a distância entre os

Figura 4. Análise utilizada na seleção dos genes. Os genes (representados por círculos) cujas diferenças de expressão afastavam-se do ajuste à distribuição normal representam aqueles de maior relevância.

subconjuntos de genes. O programa empregado para essa análise foi o JMP 5.1.1 (SAS Institute, Inc. Cary, EUA).

Ontologia gênica

Os genes diferencialmente expressos foram subsequentemente classificados de acordo com sua função molecular (atividade bioquímica), processo biológico em que está envolvido e ao componente celular em que desempenha sua atividade (Figura 5). Com o objetivo de identificar tendências no comportamento biológico mais expressivo nas duas condições estudadas, utilizou-se a subrotina do

programa GenMAPP⁵¹ que permitiu relacionar cada um dos genes com as anotações constantes no banco de dados desenvolvido pelo Gene *Ontology* (GO) *Consortium*. Nesse vocabulário estruturado, os termos ou códigos, hierarquicamente dispostos, descrevem diferentes propriedades e qualidades que mantêm os organismos em contínua atividade, manifestada por suas funções orgânicas tais como, o metabolismo, o crescimento, a reação a estímulos, a adaptação ao meio, a reprodução, etc. O programa relaciona os resultados de cada gene do painel com os termos do GO, calculando a porcentagem de genes que se alteraram em cada um dos componentes: função molecular, processo biológico e componente celular. O programa, calculando, ainda, o total acumulado das alterações dos genes alocados em cada ramo ou subramo da árvore, fornece um quadro completo das alterações gênicas associadas a um determinado termo GO que permite caracterizar com significância estatística onde ocorrem as alterações importantes.

Figura 5. Organograma representativo da classificação de genes de acordo com sua função molecular (atividade bioquímica), processo biológico em que está envolvido e ao componente celular em que desempenha sua atividade.

4.2. Construção e hibridização das membranas *No Match*

4.2.1. Seleção dos genes inéditos

A partir dos protocolos recomendados pela Coordenação do HCGP (FAPESP/LICR), foi possível obter seqüências expressas em diferentes tipos tumorais que até aquele momento (1999-2000) eram consideradas inéditas pois suas seqüências não haviam sido associadas a genes conhecidos. A utilização destas seqüências deu-se em duas etapas: seleção e purificação dos clones.

A. Seleção dos clones:

Partindo de aproximadamente 1.800 seqüências (considerando apenas as obtidas pelo laboratório MR2), foram selecionados clones de acordo com os critérios:

- a) Tamanho: acima de 100 bp
- b) Qualidade: excluíram-se as extremidades e apenas foram usados fragmentos centrais com grau de qualidade estabelecido pela Coordenação do Projeto.
- c) Ineditismo: utilizadas apenas seqüências que até o momento do levantamento dos dados não havia sido depositadas no *Genebank*.

Após uma primeira seleção, foram isoladas aproximadamente 800 seqüências. As seqüências selecionadas consideradas de altíssima qualidade foram submetidas ao BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), o que permitiu verificar a homologia entre elas. Foram excluídas seqüências similares de menor tamanho, restando 672 clones divididos em 7 placas.

Quadro 2

1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BT 0590 02/02/00 109-c09	BT 0590 02/03/00 109-c09	BT 0590 02/03/00 204-b02	BT 0590 02/03/00 204-e04	BT 0590 03/03/00 114-c04	BT 0590 09/03/00 106-a03	BT 0590 09/03/00 112-c04	BT 0590 09/03/00 112-e03	BT 0590 09/03/00 116-h04	BT 0590 09/03/00 203-a04	BT 0590 09/03/00 203-c04	BT 0590 10/03/00 118-e10
B	BT 0590 10/03/00 118-g11	BR 0590 21/12/00 102-e09	BT 0590 21/02/00 102-g08	BT 0590 21/02/00 202-d06	BT 0590 21/02/00 202-h10	BT 0590 24/04/00 201-c10	BT 0590 25/02/00 105-c10	BT 0590 25/02/00 105-d10	BT 0590 25/02/00 105-h01	CN 0037 01/03/00 103-b05	CN 0037 02/03/00 104-c09	CN 0037 09/03/00 104-a03
C	CN 0037 09/03/00 104-a09	CN 0037 09/03/00 104-b06	CN 0037 09/03/00 104-d01	CN 0037 09/03/00 104-d04	CN 0037 09/03/00 104-e10	CN 0037 10/03/00 106-c07	CN 0037 21/02/00 101-e10	CN 0037 21/02/00 101-h05	CN 0037 21/02/00 201-c10	CN 0037 21/02/00 201-d08	CN 0037 21/02/00 201-e08	CN 0037 21/02/00 202-a11
D	CN 0037 21/02/00 202-g01	CN 0037 25/02/00 203-b01	CN 0038 17/02/00 102-e02	CN 0038 21/02/00 203-d11	CN 0038 24/02/00 204-c10	CN 0038 25/02/00 204-e12	CN 0038 25/02/00 204-g11	CT 0175 21/20/99 001-b08	CT 0175 21/20/99 001-c01	CT 0175 25/10/99 001-e12	CT 0222 01/11/99 007/b02	CT 0222 01/11/99 007-c05
E	CT 0222 01/11/99 007-d05	CT 0222 01/11/99 007-d06	CT 0222 01/11/99 007-d07	CT 0222 01/11/99 007-d10	CT 0222 01/11/99 007-d12	CT 0222 01/11/99 007-e10	CT 0222 20/10/99 001-e01	CT 0222 20/10/99 001-e05	CT 0222 20/10/99 001-g05	CT 0222 20/10/99 001-g12	CT 0222 20/10/99 001-h03	CT 0222 21/10/99 002-a07
F	CT 0222 21/10/99 002-a10	CT 0222 21/10/99 002-d04	CT 0222 21/10/99 002-d08	CT 0222 21/10/99 002-f09	CT 0222 21/10/99 002-h03	CT 0222 21/02/99 002-h08	CT 0222 26/10/99 003-a08	CT 0222 26/10/99 003-b10	CT 0222 26/20/99 003-c03	CT 0222 26/10/99 003-d02	CT 0222 26/10/99 003-d06	CT 0222 26/10/99 003-e02
G	CT 0222 26/10/99 003-f07	CT 0222 28/10/99 005-e05	CT 0222 28/10/99 005-e06	CT 0222 28/10/99 006-a09	CT 0222 28/10/99 006-b01	CT 0222 28/10/99 006-c03	CT 0222 28/10/99 006-d03	CT 0223 28/10/99 006-d11	CT 0223 20/10/99 001-a04	CT 0223 20/10/99 001-a11	CT 0257 01/11/99 011-a01	CT 0257 01/11/99 011-a04
H	CT 0257 01/11/99 011-a05	CT 0257 01/11/99 011-a06	CT 0257 01/11/99 011-a08	CT 0257 01/11/99 011-b11	CT 0257 01/11/99 011-e09	CT 0257 01/11/99 011-f12	CT 0257 01/11/99 011-g06	CT 0257 01/11/99 022-a09	CT 0257 01/11/99 022-c12	CT 0257 01/11/99 022-g02	CT 0257 01/11/99 023-a05	CT 0257 01/11/99 023-b08
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		CT 0257 14/11/99 012-a03	CT 0257 14/11/99 012-d01	CT 0257 14/11/99 012-d05	HT 0376 04/01/00 012-b12	HT 0376 04/01/00 012-c08	HT 0376 04/01/00 012-e11	HT 0376 04/01/00 012-g1	HT 0376 04/01/00 012-h08	HT 0376 04/01/00 018-c08	HT 0376 04/01/00 018-d01	HT 0376 04/01/00 018-b03
B	HT 0376 04/01/00 131-c05	HT 0376 04/01/00 131-e01	HT 0376 04/01/00 131-g10	HT 0376 07/01/00 117-b11	HT 0376 07/01/00 129-f08	HT 0376 11/01/00 124-c08	HT 0376 11/01/00 124-g07	HT 0376 11/01/00 135-a01	HT 0376 12/01/00 111-h04	HT 0376 12/01/00 137-b08	HT 0376 13/01/00 138-a09	HT 0376 31/01/00 131-h10
C	HT 0376 13/01/00 138-c10	HT 0376 13/01/00 142-g01	HT 0376 13/01/00 142-g12	HT 0376 17/01/00 139-b12	HT 0376 18/01/00 118-b07	HT 0376 18/01/00 118-e08	HT 0376 18/01/00 118-f03	HT 0376 18/01/00 118-f04	HT 0376 18/01/00 118-g05	HT 0376 18/01/00 118-g12	HT 0376 18/01/00 118-h08	HT 0376 18/01/00 118-h11
D	HT 0376 18/12/99 011-b02	HT 0376 20/01/00 141-a09	HT 0376 20/01/00 141-d03	HT 0376 20/01/00 141-e07	HT 0376 20/01/00 141-g02	HT 0376 20/01/00 141-g05	HT 0376 27/12/99 019-a05	HT 0376 27/12/99 019-d05	HT 0376 27/12/99 019-h03	HT 0377 07/01/00 011-h02	HT 0377 07/01/00 013-a05	HT 0377 07/01/00 013-c07
E	HT 0377 07/01/00 013-g07	HT 0378 14/02/00 202-c04	HT 0378 14/01/00 202-c10	HT 0378 14/02/00 202-g01	HT 0378 17/02/00 202-b04	HT 0378 17/02/00 202-c07	HT 0378 17/02/00 202-d01	HT 0378 17/02/00 202-e02	HT 0378 17/02/00 202-h05	HT 0378 31/01/00 203-a04	HT 0378 31/01/00 203-a05	HT 0378 31/01/00 203-e02
F	HT 0379 16/02/00 104-d10	HT 0379 21/02/00 102-c04	HT 0379 24/02/00 102-d09	HT 0379 24/02/00 105-e02	HT 0379 24/02/00 105-e03	HT 0379 24/02/00 105-e06	HT 0379 24/02/00 105-e12	HT 0379 24/02/00 105-f12	HT 0379 24/02/00 105-g09	HT 0379 25/02/00 106-b06	HT 0379 25/02/00 106-c04	HT 0379 25/02/00 106-d06
G	HT 0379 25/02/00 106-e04	HT 0380 01/02/00 101-d11	HT 0380 01/02/00 101-g05	HT 0380 01/02/00 101-g07	HT 0380 01/02/00 101-h02	HT 0380 16/02/00 104-b05	HT 0380 16/02/00 104-d11	HT 0380 16/02/00 104-h03	HT 0380 17/02/00 106-b06	HT 0380 17/02/00 106-b09	HT 0380 17/02/00 106-b09	HT 0380 17/02/00 106-h12
H	HT 0380 29/01/00 103-a11	HT 0380 29/01/00 103-b07	HT 0380 29/01/00 103-d07	HT 0380 29/01/00 103-e05	HT 0380 29/01/00 103-e11	HT 0380 29/01/00 103-e11	HT 0380 29/01/00 103-g05	HT 0380 29/01/00 103-g12	HT 0380 31/01/00 102-h09	HT 0380 31/01/00 102-a05	HT 0380 31/01/00 102-c04	HT 0380 31/01/00 102-c08
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST 0129 05/0/99 007-a10	ST 0129 05/10/99 008-a02	ST 0129 05/10/99 008-a11	ST 0129 05/10/99 008-b05	ST 0129 06/10/99 008-c04	ST 0129 05/10/99 008-e08	ST 0129 05/10/99 008-g04	ST 0129 05/10/99 008-h04	ST 0129 06/10/99 009-a10	ST 0129 06/10/99 009-c06	ST 0129 06/10/99 009-c09	ST 0129 06/10/99 009-d02
B	ST 0129 06/10/99 009-d03	ST 0129 06/10/99 009-d05	ST 0129 06/10/99 009-e11	ST 0129 06/10/99 009-h06	ST 0129 06/10/99 010-a11	ST 0129 06/10/99 010-b02	ST 0129 06/10/99 010-b04	ST 0129 06/10/99 010-b07	ST 0129 06/10/99 010-b09	ST 0129 06/10/99 010-c03	ST 0129 06/10/99 010-c11	ST 0129 06/10/99 010-d08
C	ST 0129 06/10/99 010-e12	ST 0129 06/10/99 010-f02	ST 0129 06/10/99 010-f05	ST 0129 06/10/99 010-h12	ST 0129 11/11/99 014-a03	ST 0129 11/11/99 014-a07	ST 0129 11/11/99 014-a11	ST 0129 11/11/99 014-b05	ST 0129 11/11/99 014-c04	ST 0129 11/11/99 014-e06	ST 0129 11/11/99 014-e07	ST 0129 11/11/99 014-g04
D	ST 0129 11/11/99 014-h05	ST 0129 19/10/99 011-b04	ST 0129 19/10/99 011-d07	ST 0129 19/10/99 011-d07	ST 0129 19/10/99 011-d09	ST 0129 19/10/99 011-d12	ST 0129 19/10/99 011-g09	ST 0129 19/11/99 003-d01	ST 0129 19/11/99 003-e03	ST 0129 20/10/99 003-g02	ST 0129 20/10/99 004-b11	ST 0129 20/10/99 004-b12
E	ST 0129 20/10/99 004-c02	ST 0129 20/10/99 004-c04	ST 0129 20/10/99 004-d03	ST 0129 20/10/99 004-e01	ST 0129 20/10/99 004-e04	ST 0129 20/10/99 004-e09	ST 0129 20/10/99 004-g05	ST 0129 20/10/99 004-g09	ST 0129 20/10/99 004-g10	ST 0129 20/10/99 004-h09	ST 0129 20/11/99 012-e08	ST 0129 21/11/99 012-g04
F	ST 0129 22/10/99 012-a05	ST 0129 22/10/99 012-b01	ST 0129 22/10/99 012-b05	ST 0129 22/10/99 012-c06	ST 0129 22/10/99 013-a11	ST 0129 22/10/99 013-c01	ST 0129 22/10/99 013-e06	ST 0129 22/10/99 013-g06	ST 0129 29/09/99 001-a11	ST 0129 29/09/99 001-b04	ST 0129 29/09/99 001-b07	ST 0129 29/09/99 001-b12
G	ST 0129 29/09/99 001-c02	ST 0129 29/09/99 001-c03	ST 0129 29/09/99 001-c06	ST 0129 29/09/99 001-d03	ST 0129 30/09/99 005-a07	ST 0129 30/09/99 005-b03	ST 0129 30/09/99 005-b04	ST 0129 30/09/99 005-b05	ST 0129 30/09/99 005-b08	ST 0129 30/09/99 005-c06	ST 0129 30/09/99 005-d07	ST 0129 30/09/99 005-d11
H	ST 0129 30/09/99 005-e03	ST 0129 30/09/99 005-e05	ST 0129 30/09/99 005-e-6	ST 0129 30/09/99 005-e08	ST 0129 30/09/99 005-g02	ST 0129 30/09/99 005-g03	ST 0129 30/09/99 005-g04	ST 0129 30/09/99 005-g07	ST 0129 30/09/99 005-g12	ST 0129 30/09/99 006-d09	ST 0129 30/09/99 006-g04	ST 0129 30/09/99 006-h04

Quadro 2. Representação de três das sete placas de genes inéditos utilizadas para hibridização. A nomenclatura representada segue o Padrão Ludwig de identificação dos clones no qual as duas primeiras letras referem-se ao tipo de tecido utilizado, os três números seguintes correspondem à biblioteca do tecido. Na segunda linha a data da clonagem e na terceira linha a localização do clone na placa inicialmente utilizada.

As 3 placas selecionadas para serem usadas estão demonstradas no Quadro 2. Cada uma dessas placas de 96 poços aglomerados continha meio de cultura LB com ampicilina onde havia crescido, em cada poço, uma colônia de bactéria contendo plasmídeos com as seqüências selecionadas. Uma cópia de cada placa foi mantida congelada com glicerol.

B. Purificação dos plasmídeos contendo os cDNAs dos genes inéditos:

A purificação do DNA plasmidial contido em cada um dos poços aglomerados foi realizada utilizando-se o protocolo do fornecedor do *R.E.A.L. Prep 96 Plasmid Kits - for rapid extration alkaline lysis of bacterial cultures* – Qiagen (Missinanga, Ontário, Canadá). As placas de 96 poços aglomerados contendo 1,3 mL de meio LB com ampicilina foram incubadas durante 24h em agitador a 37° C. Em seguida, a cultura foi centrifugada por 5 min e o sobrenadante desprezado por inversão.

O *pellet* de bactérias foi ressuspensão em 0,3 mL do Tampão 1 e homogeneizado por *vortex*. Posteriormente, foram adicionados 0,3 mL do Tampão 2, realizou-se homogeneização por inversão e incubação em TA por 5 min. Em cada poço foram adicionados 0,3 mL do Tampão 3 e novamente realizou-se homogeneização por inversão (10X). O homogeneizado foi transferido por pipetagem para uma placa de 96 poços aglomerados contendo cada poço uma coluna filtrante, esta placa foi colocada sobre um bloco base também contendo 96 poços aglomerados. Uma vez aplicado o vácuo, o homogeneizado foi transferido através das colunas da placa filtrante para o bloco base.

Em cada poço foram acrescentados 0,7X o volume de isopropanol em TA por poço. O bloco foi selado e homogeneizado por inversão (3X). O produto foi centrifugado, seu sobrenadante desprezado por inversão e seco completamente,

restando apenas o *pellet* que foi posteriormente lavado com 0,5 mL de etanol 70% gelado. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* seco completamente e ressuspenso em 100 µL de água destilada autoclavada.

4.2.2. Síntese das sondas marcadas

Esta etapa, consiste em: escolha das amostras, extração de RNA, tratamento com DNase e preparo das sondas.

A. Escolha das amostras:

Foram selecionadas duas amostras para confecção da sonda marcada, sendo um adenoma e um carcinoma, ambos de pacientes portadores de hiperparatireoidismo primário. A escolha do adenoma baseou-se na inexistência de outras doenças associadas como: tireoidite crônica de Hashimoto, câncer papilífero de tireóide, bócio adenomatoso, entre outras. Por outro lado, a escolha do carcinoma priorizou a presença de metástase.

B. Extração de RNA:

A metodologia utilizada para extração de RNA total, pela técnica do Trizol, foi descrita no item 4.1.1.

A integridade das amostras de RNA foi analisada em gel de agarose a 2% pela visualização das subunidades 28S e 18S coradas com brometo de etídeo. Estas amostras foram quantificadas no GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech).

C. Tratamento com DNase:

As amostras de RNA foram tratadas com DNase (PROMEGA. Madson, EUA), para retirar possível contaminação com DNA genômico, seguindo o protocolo exposto no item 4.1.1.

D. Síntese das sondas marcadas:

As sondas foram preparadas a partir de RNA total tratado com DNase cuja integridade foi verificada em gel de agarose. As amostras foram quantificadas pelo *Gene Quant II*. A síntese procedeu de acordo com o explanado no item 4.1.1.

4.2.6. *Hibridização das membranas*

Cada uma das membranas *no match* foi pré-hibridizada em 5 mL de Tampão de Hibridização (*Express Hybridisation Buffer*) e 500 µg de DNA de esperma de salmão.

Após 30 min de pré-hibridização, as membranas foram hibridizadas ON (16h) a 68°C e lavadas com as soluções 1 (SSC 2X, SDS 1%) e 2 (SSC 0,1X e SDS 0,5%) durante 30 min, duas vezes com cada uma. Uma lavagem final foi feita com 200 mL de SSC 2X em TA. As membranas foram imediatamente removidas dos tubos de lavagem e colocadas em cassete apropriado para exposição de material radioativo.

4.3. **Análise da representação diferencial**

A PCR é utilizada como base para a hibridização subtrativa de fragmentos de cDNA representativos de duas populações na técnica conhecida por

RDA utilizada para obtenção de fragmentos de cDNA que, clonados e seqüenciados, podem ser identificados e estudados. Nela ocorre seleção positiva das seqüências diferencialmente expressas e remoção das seqüências comuns entre as populações estudadas. O RDA pode ser dividido em três fases que são explicadas a seguir: obtenção de uma população representativa do mRNA das duas situações, hibridização subtrativa destas populações e clonagem e sequenciamento do produto diferencial. Cada fase contém as seguintes etapas:

Fase 1: Geração de *amplicons* representativos do mRNA original de uma dada população.

- Isolamento do RNA
- Preparo do cDNA de fita simples e de fita dupla

Fase 2: Hibridização subtrativa das diferentes representações (genes diferencialmente expressos são enriquecidos) – DP1 e DP2.

- Digestão 1 – cDNA
- Ligação dos adaptadores R
- Geração da Representação (PCR)
- Digestão 2 – *DRIVER*
- Ligação dos adaptadores J – *TESTER 1*
- Hibridização 1
- Geração DP1 – Amplificação DP1 – PCR
- Digestão 3
- Ligação dos adaptadores N – *TESTER 2*
- Hibridização 2

- Geração DP2 – Amplificação DP2 – PCR

Fase 3: Clonagem e seqüenciamento do produto resultante.

- Clonagem
- Sequenciamento

Para realização do RDA, foram escolhidos dois adenomas não associados a outras doenças e um carcinoma confirmado pelo aparecimento de metástases. Destas três amostras iniciais, foram selecionadas as duas nas quais se obtiveram os melhores resultados durante a execução do experimento.

4.3.1. Geração de amplicons

O isolamento do RNA foi realizado de acordo com a técnica do Trizol anteriormente descrita. A partir do RNA, foram sintetizadas as moléculas de cDNA fita simples e, a seguir, fita dupla.

Experimento A. Síntese da 1ª fita (SMART cDNA synthesis Kit)

Para cada amostra de RNA total foi preparada a reação:

- 1µg de RNA total
- 1µL *SMART II A Oligo* – Sau 3A1 20µM (*Forward*)
- 1µL de *Primer 3'* SMART CDS Primer IIA – Sau 3A1 20µM (*Reverse*)
- H₂O para completar 5µL

As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 70°C por 2 minutos. O material foi homogeneizado e em cada tubo foram adicionados 5,2µL do seguinte *mix*:

	Mix 1
5X <i>First Strand Buffer</i> (15mM MgCl ₂)	2,0 µL
dNTP (10mM)	1,0µL
Super Script Transcriptase Reversa	1,0µL
Inibidor de RNase (RNase out)	1,0µL
DTT(100mM)	0,2µL

A reação foi gentilmente homogeneizada e incubada nas seguintes temperaturas:

- 42°C por 35 minutos
- 55°C por 50 minutos
- 42°C por 60 minutos

A primeira fita foi diluída em 40µL de TE e incubada a 72°C durante 7 min.

Experimento B. Síntese de cDNA fita dupla por LD – PCR (SMART cDNA *synthesis* Kit)

Cada amostra foi dividida em 3 tubos de 50µL cada, 2 tubos "estoque" e 1 para a padronização do número de ciclos. Os tubos para estoque foram mantidos a 4°C até o término do experimento. Após a padronização do número de ciclos, os tubos “estoque” voltaram para o termociclador para completarem o número de ciclos padronizado.

A 1ª Fita foi incubada a 72°C por 7 minutos para inativação da enzima Super Script. O seguinte *mix* foi preparado para o LD-PCR:

	[] final	Mix 1 (150 μ L)
H ₂ O	-	122,1 μ L
Tampão <i>Hi-Fi</i> (10X)	1X	15, μ L
MgSO ₄ (50mM)	2mM	6,0 μ L
dNTPs (10mM)	0,2mM	3,0 μ L
PCR <i>Primer Smart IIA – Sau 3A1</i> (200 μ M)	0,2 μ M	0,15 μ L
<i>Template</i> (1 ^a . Fita diluída)	-	1,5 μ L

Os tubos foram colocados no termociclador e só então adicionados 0,75 μ L de Taq *Hi-Fi* por tubo (*Hot Start*). Ciclagem:

- 95°C – 1min
 - 95°C – 5 s
 - 65 °C – 5 s
 - 68°C – 8 min
- } 15 - 27 ciclos

Ao término do 15^o ciclo, dois tubos de cada amostra (tubos "estoque") foram retirados do termociclador e mantidos a 4°C. Do terceiro tubo foi retirada uma alíquota de 5 μ L após o término dos ciclos 15, 18, 21, 24 e 27. O resultado foi analisado em gel de agarose 1,2% em TAE 0,5X. Foi escolhido o número de ciclos ideal e, este número foi utilizado para realização de PCR com os tubos estoque (previamente guardados). Verificou-se a amplificação em gel de agarose.

4.3.2. Hibridização subtrativa das diferentes representações

Nesta etapa, foram realizadas sucessivas digestões seguidas de hibridização para obtenção dos fragmentos diferencialmente expressos. Também foram realizadas amplificações para enriquecimento do material.

Experimento A. Digestão I do cDNA com a enzima de restrição Mbol

Os cDNAs foram assim purificados: 150 μ L de H₂O_mQ (150 μ L amostra + 150 μ L H₂O_mQ = 300 μ L) adicionados a 300 μ L de fenol (fase inferior) e em seguida homogeneizado por *vortex*. Após centrifugação durante 1min a 13000rpm, a fase superior foi transferida para outro tubo e 300 μ L de clorofórmio foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas por *vortex* e centrifugadas durante 1 min a 13000rpm. A fase superior foi transferida para outro tubo.

Na precipitação, foram adicionados 30 μ L de acetato de potássio a 10% e 300 μ L de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas por *vortex*, incubadas em gelo durante 35 min e centrifugadas a 4°C durante 25 min a 14000rpm. Na etapa de lavagem, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram adicionados 200 μ L de ETOH 80%, seguido por homogeneização e centrifugação a 4°C durante 15 min a 12000rpm. O sobrenadante foi descartado, e as amostras foram secas e ressuspensas em 100 μ L de H₂O_mQ.

Três microlitros de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2% para verificação da presença do material. Dez microlitros do cDNA purificado foram separados para posterior análise da eficiência da digestão.

A seguinte reação foi preparada para a primeira digestão:

	<i>Mix 1</i> (50 μ L)
H ₂ O	3,0 μ L
Tampão R (Fermentas – Hanover, USA)	5,0 μ L
Mbol (Fermentas – Hanover, USA)	2,0 μ L
Amostra	40,0 μ L
Volume final	50,0 μ L

As amostras foram incubadas ON em banho seco. As amostras de cDNA digeridas e não digeridas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2% para verificação da digestão.

Experimento B. Ligação I do cDNA digerido c/ Mbol aos adaptadores R

Os cDNAs digeridos com a enzima de restrição Mbol foram purificados utilizando a técnica do fenol-clorofórmio (item A de 4.4.2.). Em seguida, as amostras foram diluídas em 50 μ L de H₂O_mQ e quantificadas.

Realizou-se, a seguir a reação de ligação (Volume final 60 μ L):

	<i>Mix 1 (50μL)</i>
Tampão T4 ligase 10X	6,0 μ L
<i>Primer</i> R12 (500 μ M)	2,0 μ L
<i>Primer</i> R24 (500 μ M)	2,0 μ L
Amostra	volume total
H ₂ O _m Q qsp	58,0 μ L

As amostras foram aquecidas a 50°C durante 1 min e resfriadas até 10°C, 1°C por minuto. Em termociclador, foram submetidas à seguinte ciclagem:

- 50°C – 1 min 40 ciclos (diminuindo 1°C por ciclo até atingir 10 °C)
- 10 °C – manutenção

Foram adicionados 2 μ L de T4 DNA ligase antes da incubação a 14°C ON.

Experimento C. Geração da Representação – padronização da PCR

Em cada um de seis tubos de 200 μ L foram aliquoteados 100 μ L de amostra. O *template* não foi diluído e os seguintes ciclos foram utilizados para a padronização:

18, 20 ,22 ,24

Preparou-se o seguinte *mix*:

	[] final	Mix 1 (100 μ L)
H ₂ O	-	81,54 μ L
Tampão (10X)	1X	10,0 μ L
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM	3,0 μ L
dNTPs (10mM)	0,32mM	3,2 μ L
Oligo R 24 (500 μ M)	0,26 μ M	0,26 μ L
Volume final		98,0 μ L

Foi adicionado 1 μ L do produto da ligação não diluído e incubado em termociclador a 72°C durante 3 min. A seguir, adicionou-se 1 μ L da enzima Taq polimerase, a reação foi incubada por mais 5 min a 72°C e submetida à seguinte ciclagem:

- 95°C – 1min
 - 95°C – 30 s
 - 72 °C – 3 min
- } 8 - 24 ciclos
- 4°C manutenção

Foram retirados 8 μ L nos ciclos: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 24 para o gel analítico. Os produtos foram corridos em gel de agarose 1,2% e foi determinado para cada amostra o número de ciclos adequado para manter a reação na fase exponencial. Uma vez determinado o número de ciclos ideal, os demais tubos foram colocados no termociclador e amplificados. Verificou-se a presença de material em gel de agarose 1,2%.

Experimento D. Digestão II do cDNA – geração do *DRIVER*

As amostras foram reunidas e divididas em 2 tubos contendo cada um 300 μ L de amostra. Para cada um dos tubos foi realizada purificação por fenol-clorofórmio acrescentando-se à amostra:

- 300 μ L de H₂O_mQ (300 μ L amostra + 300 μ L H₂O_mQ = 600 μ L)
- 600 μ L de fenol (fase inferior), homogeneizando por vortex

As amostras foram centrifugadas durante 1min a 13000rpm e a fase superior foi transferida para outro tubo e adicionados 600 μ L de clorofórmio. Após homogeneização por vortex e centrifugação durante 1min a 13.000rpm a fase superior foi transferida para outro tubo.

Na etapa de precipitação foram adicionados 60 μ L de acetato de potássio (10%) e 600 μ L de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas por vortex e precipitadas em gelo ON e centrifugadas a 4°C durante 25min a 14.000rpm.

Na lavagem, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 400 μ L de ETOH 80%. O produto foi homogeneizado e centrifugado a 4°C durante 15min a 12000rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco no *Speed Vac*. As amostras foram ressuspensas em 150 μ L de H₂O_mQ.

O produto das duas purificações foi reunido para a seguinte reação de digestão:

	Mix 1 (50 μ l)
H ₂ O	60,0 μ l
Tampão R (Fermentas)	35,0 μ l
Mbol (Fermentas)	5,0 μ l
Amostra	250,0 μ l
Volume final	350,0 μ l

As amostras foram incubadas ON em banho seco e na manhã seguinte submetidas à eletroforese em gel de agarose para análise da digestão.

Os cDNAs digeridos com a enzima de restrição Mbol foram purificados pela técnica do fenol-clorofórmio e quantificados utilizando-se espectrofotômetro. O

DRIVER é o produto da digestão purificado. Ressaltamos que tanto a amostra de adenoma como a de carcinoma possuem *DRIVER*.

Experimento E. Ligação II do cDNA digerido aos adaptadores J – geração do *TESTER*

Foram separados 20µl do *DRIVER* para fazer o *TESTER*. A concentração do material foi de 1µg/µl em para um volume total de 10µl. Foi realizada a seguinte reação de ligação:

	1 reação
Tampão T4 ligase 10X	3,0µL
<i>Primer</i> R12 (500 µM)	1,0µL
<i>Primer</i> R24 (500 µM)	1,0µL
Amostra	10,0µL
H ₂ Omq qsp	14,0µL
Volume final	29,0µL

As amostras foram aquecidas a 50°C durante 1 minuto e resfriadas até 10°C, 1°C por minuto. Em seguida foram submetidas à seguinte ciclagem:

- 50°C – 1 min (40 ciclos diminuindo 1°C por ciclo até 10°C)
- 10°C – manutenção

Adicionou-se 1µL de T4 DNA Ligase e incubou-se a 14°C ON. O *TESTER* é o produto desta ligação. Novamente ressaltamos que as duas amostras são *DRIVER* e *TESTER*.

Experimento F. PCR para testar a eficiência da Ligação II

Uma pequena alíquota do produto de PCR foi utilizada para verificar a eficiência da ligação nas duas amostras após eletroforese em gel de agarose. Em seguida, foi realizada a reação de PCR:

	1 reação
H ₂ O mQ	7,65µl
Tampão	1,0µl
MgCl ₂ 50mM	0,3µl
DNTP 10mM	0,32µl
Oligo J12 100mM	0,13µl
<i>Template</i>	0,5µl
Volume final	9,9µl

A reação foi aquecida a 72°C durante 3min e adicionou-se 0,1µl da enzima Taq polimerase. A reação foi submetida à seguinte ciclagem:

- 72°C – 5 min
 - 95°C – 30 s
 - 72°C – 3 min
- } 15 ciclos

Experimento G. Hibridização I

A cada um dos tubos da ligação (um contendo a amostra *TESTER* 1 e o outro contendo a amostra *TESTER* 2) foram adicionados 70µL de H₂O. A primeira hibridização foi feita com 10µg de DRIVER e 0,1µg de TESTER (razão de 100X). Assim, foram utilizados 10µl de TESTER e 20µL de DRIVER. As amostras foram concentradas, secas e ressuspensas em 4µL de tampão EE 3X.

Em seguida, foi acrescentada à amostra 1 gota de óleo mineral para a realização da denaturação durante 5 min a 98°C. Foi acrescentado 1µL de NaCl 5M e a temperatura foi diminuída para 67°C. A hibridização foi realizada a 67°C durante 20 horas. O óleo foi removido e adicionados 200µl de TE (H₂O).

Experimento H. Geração do DP1 – PCR 1 e 2 Amplificação do produto da Hibridização I.

Com o produto da primeira hibridização, foi realizada PCR, acrescentando-se a cada tubo 97,7µL do seguinte *mix*:

	1 reação
H ₂ O mQ	71,5µL
Tampão 10X	10,0µL
MgCl ₂ 50mM	3,0µL
DNTP 10mM	3,2µL
<i>Template</i>	10,0µL
Volume final	97,7µL

A enzima Taq polimerase foi acrescentada após incubação prévia a 72°C durante 3 min. As amostras foram aquecidas a 72°C durante 5 min e acrescentado 1,3µL de Oligo J24 (100mM). A reação foi submetida à seguinte ciclagem:

- 95°C – 1 min
 - 70°C – 3 min
 - 72°C – 10 min
- } 11 ciclos

O produto de PCR foi diluído 10X (5µL de *template* + 45µL de H₂O mQ).

Realizou-se a segunda PCR de acordo com o protocolo que segue:

	1 reação
H ₂ O mQ	71,5µL
Tampão 10X	10,0µL
MgCl ₂ 50mM	3,0µL
DNTP 10mM	3,2µL
<i>Template</i>	10,0µL
Volume final	97,7µL

Da reação acima, foram aliquotados 97,7 μ L em cada tubo, aquecidos a 95°C durante 3 min e acrescentado 1 μ L de Taq polimerase. A reação foi aquecida a 80°C durante 5 min foram acrescentado 1,3 μ L de Oligo J24 (100mM) para a realização da seguinte ciclagem:

95°C – 1 min	} 18 ciclos
70°C – 3 min	
72°C – 10 min	

O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% para confirmação da presença de material.

Experimento I. Digestão III do DP1

As amostras, DP1, foram purificadas com fenol-clorofórmio, ressuspendidas em 30 μ L de H₂O mQ e quantificadas. Foram utilizadas 2,0 μ g de cada amostra para a reação de digestão abaixo:

	<i>Mix 1 (35μL)</i>
Tampão R (Fermentas)	3,5 μ L
Mbol (Fermentas)	2,0 μ L
Amostra	2,0 μ g
H ₂ O mQ	q.s.p.
Volume final	35,0 μ L

A digestão ocorreu em forno de hibridização pré-aquecido a 37°C ON.

Experimento J. Ligação III do cDNA digerido aos adaptadores N

As amostras foram purificadas pela técnica do fenol-clorofórmio, ressuspensas em 25 μ L de H₂O mQ e quantificadas. Na reação de ligação abaixo foram usados 200ng de cDNA:

	1 reação
Tampão T4 ligase 10X	3,0 μ L
<i>Primer</i> R12 (500 μ M)	1,0 μ L
<i>Primer</i> R24 (500 μ M)	1,0 μ L
Amostra	200ng
H ₂ O mQ	q.s.p.
Volume final	29,0 μ L

Os produtos foram aquecidos a 50°C durante 1 min e em seguida resfriados até 10°C, reduzindo-se 1°/min. Foi adicionado 1,0 μ L de T4 DNA Ligase, aumentada a temperatura para 14°C e realizada posterior incubação ON.

Experimento L - PCR para testar a eficiência da Ligação III

Foi utilizada uma pequena alíquota do produto de PCR para verificar a eficiência da ligação nas duas amostras. Utilizou-se o protocolo que segue:

	1 reação
H ₂ O mQ	7,65 μ L
Tampão	1,0 μ L
MgCl ₂ 50mM	0,3 μ L
DNTP 10mM	0,32 μ L
Oligo J12 100mM	0,13 μ L
<i>Template</i>	0,5 μ L
Volume final	9,9 μ L

As amostras foram aquecidas a 72°C durante 3 min, adicionou-se 0,1 μ L da enzima Taq polimerase. As amostras foram submetidas à seguinte ciclagem:

- 72°C – 5 min
 - 95°C – 30 s
 - 72°C – 3 min
- } 15 ciclos

- 72°C – 10 min

O produto da reação de ligação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% para a confirmação da reação.

Experimento M. Hibridização II

Foram adicionados 130,0µL de tampão TE ao produto da ligação III (30µL). A enzima da reação para síntese do *TESTER* foi inativada por aquecimento (65°C durante 10 min).

A reação de Hibridização II foi realizada como segue:

TESTER – 10µl (diluído)

DRIVER – mesma quantidade usada na Hibridização I

Relação entre eles = 1:800

As amostras foram concentradas no *Speed Vac* até a secagem quase completa. Foram adicionados 4µL de tampão EE. Em seguida, as amostras foram aquecidas durante 1 min a 37°C ou 40°C para serem solubilizadas. Acrescentou-se 1 gota de óleo mineral para a realização da desnaturação durante 5 min a 98°C. Acrescentou-se 1,0µL de NaCl 5M e a temperatura foi diminuída para 67°C. A hibridização ocorreu a 67°C durante 20 horas.

Experimento N. Geração do DP2 – PCR 1 e 2

Foi retirado o óleo das amostras para realização das PCRs de acordo com o seguinte protocolo:

	1 reação
H ₂ O mQ	71,8µL
Tampão 10X	10,0µL

MgCl ₂ 50mM	3,0μL
DNTP 10mM	3,2μL
<i>Template</i>	10,0μL
Volume final	97,7μL

Os tubos foram aquecidos a 72°C durante 3 min e foi acrescentado 1μl da enzima Taq polimerase. Novamente aqueceram-se as amostras a 72°C durante 5 min e acrescentou-se 1,3μl de Oligo J24 (100mM). As amostras foram submetidas à ciclagem que se segue:

95°C – 1 min
 70°C – 3 min
 72°C – 10 min

} 11 ciclos

O produto da PCR foi diluído 10X para a segunda PCR que foi realizada conforme o protocolo abaixo:

	1 reação
H ₂ O mQ	71,5μL
Tampão 10X	10,0μL
MgCl ₂ 50mM	3,0μL
DNTP 10mM	3,2μL
<i>Template</i>	10,0μL
Volume final	97,7μL

Os tubos foram aquecidos a 95°C durante 1 min e foi acrescentado 10μL da enzima Taq polimerase. Novamente aqueceram-se as amostras a 80°C durante 5 min e acrescentou-se 1,3μL de Oligo J24 (100mM). As amostras foram submetidas à ciclagem que se segue:

95°C – 1 min

} 18 ciclos

70°C – 3 min

72°C – 10 min

O material foi analisado após eletroforese em gel de agarose 1,2%.

4.3.3. Clonagem

Experimento A. Clonagem do DP2 – Topo TA

As amostras foram purificadas por fenol-clorofórmio, ressuspensas em 50 μ L de H₂O_mQ e quantificadas.

A reação de clonagem foi realizada conforme o protocolo que se segue:

Produto de PCR	4,0 μ L
<i>Salt Solution</i>	1,0 μ L
Vetor (Topo TA)	1,0 μ L
Volume final	6,0 μ L

As amostras foram gentilmente homogeneizadas e incubadas em TA durante 7 min. Em seguida foram colocadas no gelo e aliquoteados 2 μ L da amostra. Os demais 4 μ L foram armazenados para uso posterior. Ao tubo *One Shot* do *Kit Topo TA*, foram adicionados os 2 μ L da amostra. A reação foi homogeneizada e transferida para o gelo durante 30 min e rapidamente colocada em banho a 42°C durante 30 s. A reação foi novamente transferida para o gelo e foram adicionados 250 μ L de meio de cultura SOC a TA. Homogeneizou-se horizontalmente em agitador (200 rpm a 37°C) durante 1h.

Setenta microlitros da reação em cada placa contendo 25 mL de meio LB ágar com ampicilina (100 μ g/ μ L), 32 μ L de Xgal (50mg/mL) e 8 μ L de IPTG 2%. As placas foram incubadas ON a 37°C.

Experimento B. Clones Diferencialmente Expressos

Em placas específicas para cultura contendo 96 poços aglomerados, foram adicionados 10 mL de meio LB líquido (pH 7,4) contendo 100 μ L de ampicilina. As colônias de bactérias obtidas após o experimento descrito anteriormente foram repicadas e incubadas em agitador a 150 rpm a 37°C ON.

Experimento C. PCR de Colônia

Foi realizada reação de PCR a partir do meio LB contendo cada uma das colônias que cresceram em presença de ampicilina conforme o seguinte protocolo:

	Placa 96 reações
<i>Primer</i> M13 F 20mM	13,0 μ L
<i>Primer</i> M13 R 20mM	13,0 μ L
Tampão 10X	150,0 μ L
MgCl ₂ 50mM	45,0 μ L
DNTP 25mM	7,5 μ L
H ₂ O mQ	1165,0 μ L
<i>Template</i>	1,0 μ L

O produto da reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% para confirmação da amplificação.

Experimento D. Purificação plasmidial

Foram selecionados os clones que apresentaram PCR satisfatória para serem purificados por *Mini Prep*.

Em tubo de 50 mL contendo 3 mL de meio LB líquido de pH 7,4 com ampicilina foi adicionado 1µL de amostra (1 tubo para cada amostra) e incubado ON em agitador a 150 rpm e 37°C.

Para reação de *Mini Prep*, os tubos de 50 mL foram centrifugados durante 10 min a 3.000 rpm em TA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 150µL de tampão para ressuspensão. Foram adicionados 150µL de tampão de lise, o material foi homogeneizado (6X) por inversão e a reação foi incubada em TA por 3 min.

Em seguida, foram adicionados 150µL de *Precipitation Salt* gelado, o material foi homogeneizado por inversão (6X) e centrifugado em TA durante 5 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi pipetado em tubo estéril e o *pellet* foi descartado. Adicionou-se 600µL de tampão de ligação e homogeneizou-se por inversão (6X). A solução foi transferida para o topo da coluna de purificação.

Esta coluna foi centrifugada em TA a 3.000 rpm durante 30 s e o conteúdo do tubo coletor foi descartado. Foram adicionados 500µL de tampão de lavagem e centrifugou-se o produto em TA a 3.000 rpm durante 30 s, descartando-se novamente o conteúdo do tubo coletor. Foram adicionados 900µL de Tampão de lavagem final 1X e a coluna foi centrifugada em TA a 3.000 rpm durante 30 s e, em seguida, por 1 min nas mesmas condições.

Foram adicionados 60µL de H₂O pré-aquecida (60°C) e incubou-se o purificado em TA durante 3 min. Em seguida e centrifugou-se durante 30 s em TA e 14.000 rpm. O produto foi transferido para tubo adequadamente identificado.

4.3.4. Seqüenciamento

O seqüenciamento dos produtos diferencialmente expressos foi executado em seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer. Utilizou-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Applied Biosystems, Foster, USA), usando-se o *ABI PRISM^R Big Die™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*. A reação foi realizada conforme protocolo que se segue:

	1 reação
<i>Big Die</i>	2μL
Tampão save	2μL
DNA (plasmídeo)	100ng
<i>Primer</i>	1,6 pmol
H ₂ O q.s.p.	10μL

As amostras foram colocadas em termociclador e submetidas à seguinte ciclagem: 96°C durante 10 s, 50°C durante 5 s, 60°C durante 4 min. Esta etapa foi repetida por 25 vezes com uma rampa de 1°C por segundo.

Em seguida foi realizada a precipitação acrescentando-se ao produto da reação de seqüenciamento 10μL de H₂O e 30μL de ETOH. As amostras foram homogeneizadas por *vortex* e repousaram em TA durante 15 min. As amostras foram reconcentradas a 14.000 rpm durante 20 min e lavadas com 200μL de ETOH 70%. As amostras foram secas em TA e aplicadas no gel para seqüenciamento.

4.4. Seleção dos genes diferencialmente expressos

Para selecionar os genes diferencialmente expressos, inicialmente deu-se preferência àqueles genes cuja diferença de expressão entre adenoma e carcinoma era acentuada. Também foram selecionados genes sabidamente envolvidos na tumorigênese de outros tecidos, como os pertencentes ao sistema IGF, moléculas de adesão celular, ou ainda oncogenes. Foram selecionados genes cuja atividade funcional conhecida poderia relacionar-se com os mecanismos moleculares já conhecidos do hiperparatireoidismo primário.

3.5. PCR dos genes isolados das membranas

Com o objetivo de confirmar a expressão diferencial de genes selecionados a partir da hibridização dos painéis *Atlas Array*, foi realizada análise semi-quantitativa por PCR. Todas as reações foram realizadas em co-amplificação com o gene BCR, utilizado como controle interno.

Para a reação de co-amplificação de cada gene, foi realizada uma curva de *annealing*, no intuito de estabelecer a temperatura ideal de amplificação conjunta dos dois fragmentos: controle interno e gene selecionado e minimizar a amplificação de produtos inespecíficos.

Em seguida, foi realizada uma curva de ciclos para cada um dos genes. Sabe-se que com o aumento do número de ciclos, a amplificação aumenta progressivamente, até o momento em que é atingido o ponto máximo no qual ocorre saturação da reação. Neste ponto a quantificação do material amplificado é ineficaz. O objetivo da realização da curva de ciclagem é estabelecer o número de ciclos onde a curva encontra-se em sua fase exponencial.

4.5.1. Amostras

A. Extração de RNA:

A metodologia utilizada para extração de RNA total, pela técnica do Trizol, foi descrita. A integridade das amostras de RNA foi analisada em gel de agarose a 2% pela visualização dos fragmentos 28 e 18 S corados com brometo de etídeo. Estas amostras foram quantificadas no *GeneQuant II RNA/DNA Calculator* (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

B. Síntese de cDNA:

A síntese de cDNA foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Life Technologies - Gibco) para o uso da enzima *SuperScript*.

Os seguintes reagentes perfizeram um volume total de 12 μL :

	1 reação
RNA	2 a 5 μg
Hexanucleotídeos randômicos(100 pmol)	2,0 μL
Água mili-Q autoclavada	q.s.p.

A mistura foi aquecida a 70° C durante 10 min e imediatamente colocada no gelo.

Foram adicionados os seguintes reagentes para um volume final de 20 μL :

Tampão da enzima (5x)	4,0 μL
DTT 0,1 M	2,0 μL

DNTP <i>Mix</i> (10 mM)	1,0 µL
<i>SuperScript</i>	1,0 µL

O produto foi homogenizado por *vortex*, incubado durante 50 min a 42° C e em seguida a 70°C durante 15 min.

A fim de testar a qualidade dos cDNA obtidos, foi realizada uma PCR, utilizando *primers* para o gene BCR, pois a expressão deste gene é perdida quando ocorre degradação do RNA. Este gene também foi utilizado como controle interno para realizar as quantificações relativas de todos os genes. O gene do GAPDH, comumente utilizado, aparece hiperexpresso em tecidos onde há expressão aumentada do receptor da vitamina D.

4.5.2. PCR semiquantitativa dos genes escolhidos

A. Reação de PCR: Cada PCR consistiu na amplificação de um fragmento de DNA desejado, utilizando *primers* específicos (Tabela 3), isolados a partir das seqüências selecionadas dos genes diferencialmente expressos nas três metodologias empregadas.

As reações de PCR foram padronizadas de acordo com as características de cada um dos genes selecionados para estudo individual. Estes genes foram co-amplificados com *primers* específicos para o gene do BCR, que foi utilizado como controle interno endógeno por ser expresso em todos os tecidos e tipos celulares, além de considerado marcador da boa qualidade do RNA.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados nas PCR semi-quantitativas.

GENE	SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i>
FGF2	F: GAG AAG AGG GCG AAC AAG R: CTC TGC TTA AAT CCA GTG GC
IGF-1-R	F: ACC CGG AGT ACT TCA GCG CT R: CAC AGA AGC TTC GTT GAG AA
TIMP-3	F: CAA TTG GCA GCT CTG TTT CC R: TTT TAC AGA GTG GGG GTT GG
NOTCH-1	F: GGG TAC AAG TGC GAC TGT GA R: TTG TTC AGA CAT GGG TTG GA
PTK-7	F: ACC CAG GTC AAA CTT CGT TG R: CAA GCC TGG CTA AAA GCA CT
RET	F: CTC CTA GCA ATG CCA CA R: GCG GCA ACT AGA AAA ATC CA
RAF	F: AGA TCG GTG ACT TTG GCT TG R: TGT GGC TGT AAG GCA GTG AG
RAS	F: CTA ACA GCC CTC CTC TGC AC R: CGG AGT AAA GCC CTG AAG TG
E-Cadherin	F: TGC CCA GAA AAT GAA AAA GG R: GTG TAT GTG GCA ATG CGT TC
BCR	F: GAG AAG AGG GCG AAC AAG R: CTC TGC TTA AAT CCA GTG GC

B. Quantificação dos produtos de PCR:

A quantificação da maior parte dos produtos de PCR foi realizada utilizando-se unidades arbitrárias de densidade óptica (UADO). Desta forma, foi quantificado cada um dos fragmentos amplificados (gene e controle interno) e em seguida, efetuada divisão do gene pelo controle interno (BCR) em cada amostra, obtendo-se assim um valor numérico correspondente à expressão relativa de cada um dos genes.

Para os genes IGF-1-R e RET também foi realizada análise quantitativa utilizando-se cromatografia líquida desnaturante de alta performance, com o equipamento “WAVE Nucleic Acid Fragment Analysis System” em conjunto com o programa “WAVE Maker” (Transgenomic Inc. Omaha, EUA), o qual é baseado no princípio de separação de fragmentos pelo seu tamanho (peso molecular).

Embora a análise quantitativa realizada utilizando o equipamento WAVE apresente aparentemente maior confiabilidade, não foram encontradas diferenças entre as metodologias, quando comparados os resultados dos genes que foram quantificados por ambas as técnicas.

4.5.3. Análise estatística

A análise estatística dos resultados de expressão dos genes estudados, dados clínicos, bioquímicos e anátomo-patológicos, foi realizada utilizando testes não-paramétricos e considerando apenas coeficiente de *Spearman* $<0,05$

5. RESULTADOS

Os resultados serão expressos em quatro grandes blocos:

1. Hibridização das membranas *Atlas*;
2. Hibridização das membranas *no match*;
3. Análise da representação diferencial;
4. Análise das diferenças de expressão.

5.1. Hibridização das membranas *Atlas*

A hibridização das membranas *Atlas* pode ser dividida em etapas conforme apresentado em casuística e métodos, são elas:

- A. Síntese das sondas marcadas;
- B. Hibridização das membranas;

A. Síntese das sondas marcadas:

Foi utilizado cDNA obtido de RNA extraído de dois adenomas e um carcinoma. Para verificação da integridade do RNA, foi preparado gel de agarose 1% e, após eletroforese, observada a presença das subunidades 18S e 28S do RNA (figura 6).

A visualização destas subunidades pode ser traduzida em qualidade pois elas não costumam ser vistas quando há degradação de RNA.

Em seguida, o RNA foi quantificado (Tabela 4) para que fosse observada a relação DNA/ proteína e para que fosse determinada sua concentração a fim de calcular a quantidade necessária para a síntese da sonda.

Determinar a concentração do RNA é imprescindível para calcular a quantidade de material que será usada na síntese de cDNA. Assim, embora as amostras tenham concentrações diferentes, foi usada a mesma quantidade de RNA em ng/ μ L para síntese de cDNA.

Tabela 4. Valores obtidos após a quantificação das amostras utilizadas na confecção da sonda.

	Adenoma	Carcinoma
Absorbância	1,790 Au	0,523 Au
Concentração	2470 ng/ μ L	716 ng/ μ L
Relação A_{260}/A_{280}	1,80	1,85

As sondas foram preparadas marcando-se radioativamente o cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído das amostras de adenoma e carcinoma.

As sondas foram purificadas em colunas GFX e contadas em cintilador beta (Tabela 5). Esta tabela também mostra o volume que foi utilizado de cada sonda, os volumes foram calculados em função dos resultados da contagem para que a concentração final de cDNA marcado seja a mesma nas duas sondas (adenoma e carcinoma).

Tabela 5. Contagem em cintilador beta das sondas utilizadas em cada uma das 4 hibridizações.

Sonda – tipo de membrana	Contagem total	Volume da sonda a ser utilizado
Adenoma – <i>Human Cancer</i>	$1,37 \times 10^7$	100,0 μL
Carcinoma – <i>Human Cancer</i>	$2,21 \times 10^7$	62,0 μL
Adenoma – <i>Oncogenes/ Tumor Supressor</i>	$2,34 \times 10^7$	100,0 μL
Carcinoma – <i>Oncogenes/ Tumor Supressor</i>	$3,71 \times 10^7$	63,0 μL

B. Hibridização das membranas:

Foram utilizados dois modelos de membrana: *cDNA Expression Array Human Cancer 1.2* e *Human Oncogene/ Tumor Suppressor Gene*. Duas membranas de cada modelo foram hibridizadas, uma com a sonda sintetizada a partir dos cDNAs de dois adenomas e a outra com a sonda sintetizada a partir do cDNA de um carcinoma (figura 7 e 8).

Como explicado em materiais e métodos, foi realizada análise do perfil de expressão gênica por macroarranjos de cDNA (membranas Atlas), o que possibilitou agrupar hierarquicamente os genes selecionados (Figuras 9 e 10) e em seguida, verificar a ontologia destes genes (Tabela 6).

Figura X. Classificação hierárquica de acordo com os níveis de expressão de cada gene obtidos após hibridização das membranas Atlas. As setas apontam os genes PTK7, RET e Notch-2, selecionados para PCR.

Figura 10 . Classificação hierárquica de acordo com os níveis de expressão de cada gene obtidos após hibridização das membranas Atlas.

Tabela 6. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos entre adenoma e carcinoma nas duas membranas Atlas.

Comportamento	Comportamento biológico	Identidade ontológica / tipo ontológico	Função	Genes alterados/ dosados (%)	Genes alterados/ presentes (%)	p=
<i>Processos biológicos</i>	<i>Carcinoma</i>	<i>24 (60.0%)</i>	morphogenesis	8/136 (5.9%)	136/994 (13.7%)	0,034
			organogenesis	8/121 (6.6%)	121/872 (13.9%)	0,015
			skeletal development	3/25 (12.0%)	25/126 (19.8%)	0,035
			cell migration	2/10 (20.0%)	10/47 (21.3%)	0,030
			regulation of cell migration	2/3 (66.7%)	3/4 (75.0%)	0,002
			posterior midgut development	1/1 (100.0%)	1/1 (100.0%)	0,029
			midgut development	1/1 (100.0%)	1/1 (100.0%)	0,029
			thymic T-cell selection	1/1 (100.0%)	1/2 (50.0%)	0,027
			hair cell fate commitment	1/1 (100.0%)	1/2 (50.0%)	0,027
			mechanoreceptor differentiation	1/1 (100.0%)	1/2 (50.0%)	0,027
			hair cell differentiation	1/1 (100.0%)	1/2 (50.0%)	0,027
			epidermal cell differentiation	1/1 (100.0%)	1/3 (33.3%)	0,027
			negative regulation of Wnt receptor signaling pathway	1/1 (100.0%)	1/3 (33.3%)	0,027
			protein-nucleus export	1/1 (100.0%)	1/4 (25.0%)	0,023
			negative regulation of signal transduction	1/1 (100.0%)	1/4 (25.0%)	0,027
			limb morphogenesis	1/1 (100.0%)	1/4 (25.0%)	0,027
			T-cell selection	1/1 (100.0%)	1/4 (25.0%)	0,027
			regulation of Wnt receptor signaling pathway	1/1 (100.0%)	1/9 (11.1%)	0,027
			regulation of proteolysis and peptidolysis	1/1 (100.0%)	1/9 (11.1%)	0,029
			mitotic spindle assembly	1/1 (100.0%)	1/11 (9.1%)	0,023
			spindle assembly	1/1 (100.0%)	1/11 (9.1%)	0,023
			embryonic morphogenesis	1/1 (100.0%)	1/13 (7.7%)	0,027

Molecular Function			regulation of catabolism	1/1 (100.0%)	1/14 (7.1%)	0,029
			M-phase specific microtubule process	1/1 (100.0%)	1/16 (6.3%)	0,023
			transcription from <i>Pol II</i> promoter	4/51 (7.8%)	51/422 (12.1%)	0,043
			cell differentiation	3/20 (15.0%)	20/184 (10.9%)	0,021
			negative regulation of transcription	2/10 (20.0%)	10/107 (9.3%)	0,034
			negative regulation of transcription, DNA-dependent	2/9 (22.2%)	9/76 (11.8%)	0,032
			negative regulation of transcription from <i>Pol II</i> promoter	2/8 (25.0%)	8/54 (14.8%)	0,028
			mRNA polyadenylation	1/2 (50.0%)	2/7 (28.6%)	0,049
		16 (40.0%)	regulation of cell differentiation	2/4 (50.0%)	4/41 (9.8%)	0,003
			ventral midline development	1/1 (100.0%)	1/1 (100.0%)	0,029
			regulation of body size	1/1 (100.0%)	1/1 (100.0%)	0,031
			positive regulation of neuron differentiation	1/1 (100.0%)	1/2 (50.0%)	0,031
			positive regulation of cell differentiation	2/2 (100.0%)	2/9 (22.2%)	0,000
			protein splicing	1/1 (100.0%)	1/5 (20.0%)	0,029
			regulation of growth	1/1 (100.0%)	1/8 (12.5%)	0,031
			protein ubiquitination	1/1 (100.0%)	1/20 (5.0%)	0,026
			cellular morphogenesis	1/1 (100.0%)	1/28 (3.6%)	0,026
			sodium ion transport	1/1 (100.0%)	1/90 (1.1%)	0,025
	Carcinoma	11 (57.9%)	guanyl-nucleotide exchange factor activity	2/9 (22.2%)	9/93 (9.7%)	0,029
			nucleoside kinase activity	1/2 (50.0%)	2/16 (12.5%)	0,047
			deoxycytidine kinase activity	1/1 (100.0%)	1/1 (100.0%)	0,017
			tumor necrosis factor receptor activity	1/1 (100.0%)	1/1 (100.0%)	0,023

Comportamento celular			RAN small monomeric GTPase activity	1/1 (100.0%)	1/1 (100.0%)	0,023
			Wnt-protein binding	1/1 (100.0%)	1/1 (100.0%)	0,027
			interleukin-6 receptor activity	1/1 (100.0%)	1/2 (50.0%)	0,027
			interleukin-6 binding	1/1 (100.0%)	1/2 (50.0%)	0,027
			ARF guanyl-nucleotide exchange factor activity	2/2 (100.0%)	2/7 (28.6%)	0,000
			deoxynucleoside kinase activity	1/1 (100.0%)	1/4 (25.0%)	0,017
				1/1 (100.0%)	1/24 (4.2%)	0,037
			chromatin binding	1/2 (50.0%)	2/51 (3.9%)	0,046
			monooxygenase activity	1/2 (50.0%)	2/101 (2.0%)	0,038
			interleukin-3 receptor binding	1/1 (100.0%)	1/1 (100.0%)	0,024
		9 (47.4%)	prolactin receptor binding	1/1 (100.0%)	1/2 (50.0%)	0,031
			growth hormone receptor binding	1/1 (100.0%)	1/3 (33.3%)	0,031
			protein stabilization activity	1/1 (100.0%)	1/9 (11.1%)	0,026
			endoribonuclease activity	1/1 (100.0%)	1/47 (2.1%)	0,030
			ribonuclease activity	1/1 (100.0%)	1/71 (1.4%)	0,030
			cell	27/811 (3.3%)	811/12258 (6.6%)	0,042
	Carcinoma	3 (60.0%)	cellular_component	25/683 (3.7%)	683/10636 (6.4%)	0,025
			interleukin-6 receptor complex	1/1 (100.0%)	1/1 (100.0%)	0,027
	Adenoma	2 (40.0%)	cytosol	3/27 (11.1%)	27/300 (9.0%)	0,043
			chromatin	2/13 (15.4%)	13/147 (8.8%)	0,039

5.2. Hibridização das membranas *no match*

A hibridização das membranas *no match* pode ser dividida nas seguintes etapas:

- A. Seleção e purificação dos genes inéditos;
- B. Síntese das sondas marcadas;
- C. Hibridização das membranas.

A. Seleção e purificação dos genes inéditos:

A purificação deste material foi realizada conforme anteriormente explicado e foi realizada uma PCR utilizando-se *primers* M13 (que amplificam a sequência do plasmídeo no qual o cDNA está inserido) para confirmação da presença do material (Figura 11).

Figura 11: Análise dos produtos de PCR amplificados a partir do material obtido por *Mini Prep* das placas contendo os cDNAs *no match* em gel de agarose 2%.

B. Síntese das sondas marcadas:

Foram utilizadas as mesmas sondas descritas no item 5.1.

C. Hibridização das membranas:

Foram hibridizadas duas membranas, uma com a sonda sintetizada a partir do cDNA de adenoma e a outra com a sonda sintetizada a partir do cDNA de carcinoma (Figura 12). As membranas foram reveladas e analisadas em *software* apropriado.

Os clones fixados nas membranas *no match* têm suas seqüências depositadas no Gene Bank por fazerem parte do HCGP. À época da montagem das membranas todos os clones selecionados eram inéditos. Hoje, após a análise das membranas e identificação dos genes com expressão diferencial ($p < 0,05$) alguns dos clones iniciais já têm sua seqüência associada a algum gene conhecido. Assim, foi realizada nova pesquisa e os resultados podem ser vistos na Tabela 7.

Quadro 7. Classificação dos genes diferencialmente expressos nas membranas *no match*.

Maior expressão no adenoma		Maior expressão no carcinoma	
Nomenclatura LICR	Gene Bank	Nomenclatura LICR	Gene Bank
BT0590 030300 114 c04	hypothetical protein XP_065370	CT0222 201099 001 e05	No significant similarity found
BT0590 090300 106 a03	No significant similarity found	CT0222 211099 002 h08	KIAA1952 protein
BT0590 090300 203 c04	No significant similarity found	CT0257 011199 023 a05	AUTS2: autism susceptibility candidate 2
CN0037 210200 202 a11	KIAA1952 protein	HT0380 010200 101 g05	IMP-2 IGF-2 mRNA binding protein 2
CT0175 211099 001 c01	hypothetical protein FLJ22378	ST0130 081099 004 c04	Hypotetical protein FLJ20095
ST0129 051099 007 g07	BCKDHB: (maple syrup urine disease)	ST0131 111099 123 b02	LOC343486
CT0222 201099 001 g12	ST6GalNAcI	ST0131 201099 014 f12	AGTRAP: angiotensin II receptor associated protein
CT0222 26109 003 f07	hypothetical protein FLJ23059		
ST0129 061099 099 f11	PCTK2: PCTAIRE protein kinase 2		
CT0222 281099 005 e06	hypothetical gene supported by AK000477		
ST0129 061099 009 a05	MUC4: mucin 4, tracheobronchial		
HT0379 210200 102 c04	CREB binding protein (Rubinstein- Taybi syndrome)		
ST0129 061099 009 a05	IRF-1		

5.3. Análise da representação diferencial

Esta etapa pode ser dividida nas seguintes fases:

- A. Geração de amplicons;
- B. Hibridização subtrativa das diferentes representações;
- C. Clonagem;
- D. Sequenciamento.

A. Geração de amplicons:

Os amplicons são fragmentos de cDNA dupla fita, representativos do mRNA original de uma dada população, conforme demonstrado na Figura 13.

Figura 13. Amplificação da fita dupla de cDNA em diferentes ciclos (18, 21, 24 e 27). O número 3 refere-se ao cDNA do adenoma e o número 4 ao cDNA do carcinoma. O ciclo ideal é aquele onde começa a ser visto padrão de bandejamento no *smear*.

Cada população celular tem características próprias que fazem com que os padrões de bandejamento e amplificação no decorrer da ciclagem sejam diferentes. A escolha das condições ideais é individualizada. Neste caso, escolheu-se 22 ciclos para amplificação das amostras de adenoma e carcinoma.

B. Hibridização subtrativa das diferentes representações:

A primeira etapa inicia-se com a digestão do DNA demonstrada na Figura 14, onde pode ser verificada a eficiência da reação, pois podem ser vistos diferentes tamanhos de cDNA antes e após a digestão. A ligação dos adaptadores R e a geração por PCR da primeira representação é apresentada na Figura 15, onde há presença de material em todas as ciclagens realizadas.

Em seguida, foi realizada uma segunda digestão para ligação dos adaptadores J seguida de nova PCR para verificação da existência de material. O produto da segunda digestão é o DRIVER e o produto da ligação dos adaptadores J é o TESTER.

As hibridizações são realizadas entre DRIVER e TESTER de diferentes amostras, ou seja, DRIVER do adenoma contra TESTER do carcinoma e vice-versa. Ao reunir estas amostras pode haver ligação entre os DRIVERS, entre DRIVER e TESTER e entre os TESTERS.

A ligação entre os DRIVERS representa ligação entre fragmentos de cDNA complementares de uma mesma população, ou seja, há ligação de fragmentos do adenoma entre si ou fragmentos do carcinoma entre si. Esta ligação, embora represente um produto diferencial entre as duas populações, não é passível de amplificação, pois os DRIVERS não possuem adaptadores ligados e esta condição inviabiliza a ação das enzimas polimerases, impedindo a amplificação do material.

A ligação entre DRIVER e TESTER representa ligação entre fragmentos comuns a duas populações, no caso seriam os cDNAs comuns entre adenoma e carcinoma. Esta ligação não oferece informações acerca das diferenças entre as condições analisadas. A amplificação desta ligação ocorre linearmente, pois apenas o TESTER possui adaptadores ligados.

A última possibilidade de ligação é a que ocorre entre TESTER e TESTER. Esta ocorre entre fragmentos complementares de uma população, como aquela que ocorre entre os DRIVERS, porém, como há adaptadores ligados ao TESTER ocorre amplificação exponencial deste produto.

Após a hibridização, uma PCR é realizada para diferenciar as ligações e após a PCR, a ligação do tipo TESTER-TESTER é a predominante. Assim, se o TESTER

foi de adenoma, o produto da PCR revela fragmentos presentes apenas no adenoma. Por outro lado, se o TESTER foi da amostra do carcinoma, o produto da PCR representa fragmentos exclusivos ao carcinoma.

A Figura 16 mostra o resultado da primeira PCR, onde pode ser confirmada a presença de material. Em seguida foi realizada curva de ciclos e nova PCR para enriquecer o produto (TESTER-TESTER) com a ciclagem ideal, evidenciando padrão de bandeamento.

Este ciclo: digestão-ligação-hibridização-PCR ocorre tantas vezes quanto forem necessárias para obter um produto contendo apenas os fragmentos desejados. A PCR mostra o produto da hibridização, o qual deve conter bandas evidentes e de padrão diferente entre as amostras obtidas do adenoma e do carcinoma.

Assim, as amostras foram novamente digeridas para serem ligadas agora aos adaptadores N. Foi realizada PCR para verificar a ligação (Figura 17A) e a seguir, foi realizada a segunda hibridização também verificada por PCR (Figura 17B). A presença de bandas na Figura 17A confirma a presença de material e na Figura 17B pode ser visto o produto diferencial da segunda hibridização que, como

esperado, apresenta padrão de bandejamento diferente daquele onde foi utilizado o adenoma como *DRIVER* e aquele onde o carcinoma foi o *DRIVER*.

C. Clonagem:

O produto da clonagem foi purificado e submetido à PCR (Figura 18).

Verificou-se a existência de material e estes produtos foram purificados em coluna GFX para sequenciamento.

Todos os clones amplificados mostrados na Figura 13 foram seqüenciados e submetidos à análise em bancos de dados internacionais, a fim de serem identificados. Os cDNAs isolados no RDA estão apresentados na Tabela que segue (Tabela 8).

Tabela 8. Seqüências do Blast NCBI obtidas por comparação após seqüenciamento dos cDNAs isolados no RDA.

Clone presente apenas no adenoma	
Clone	Nomenclatura (Blast NCBI)
1	Human DNA sequence from clone RP11-457O1 on chromosome X.
Clones presentes apenas no carcinoma	
2	Cloning vector pUCP26, Escherichia-Pseudomonas.
3	Human chromosome 14 DNA sequence BAC C-3051D23 of library CalTech-D from chromosome 14 of Homo sapiens.
4	Shuttle vector pJIR751 beta-galactosidase alpha-peptide (lacZ) gene, partial cds; and replication enzyme (rep) and RNA methylase.
5	Human DNA sequence from clone RP11-552M6 on chromosome 13q21.31-22.2.
6	Homo sapiens cDNA FLJ20617 fis, clone KAT05223.
7	Homo sapiens protein phosphatase 3 (formerly 2B).
8	BAC 13C18 of library CITB 29-Sv from chromosome 10 of strain 129 of Mus musculus.
9	Human DNA sequence from clone RP11-173N7 on chromosome 13.
10	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q, section 71/105.
11	Sus scrofa steroidogenic acute regulatory protein gene, promoter region and partial cds.
12	Homo sapiens, Similar to NADH dehydrogenase 4.
13	Human DNA sequence from clone RP11-487A20 on chromosome 13.
14	Homo sapiens, pancreatic lipase, clone MGC:22594.
15	Mus musculus anti-cardiolipin antibody CAR Ig heavy chain mRNA, partial cds.
16	Homo sapiens BAC clone RP11-356G6 from 2.

17	Homo sapiens, clone IMAGE:3510538, mRNA.
18	ficolin [human, uterus, mRNA, 1736 nt].
19	Homo sapiens KIAA0728 protein (KIAA0728), mRNA. ACCESSION XM_031821.
20	Homo sapiens chromosome , clone RP11-52618
21	Homo sapiens pancreatic lipase (PNLIP), mRNA. ACCESSION XM_052925.
22	Homo sapiens similar to keratin associated protein 1.1 (LOC115775).
23	Human DNA sequence from clone RP4-727110 on chromosome 20. Contains a novel gene, ESTs, STSs and GSSs.

5.4. PCR dos genes isolados

Os genes obtidos nas três metodologias descritas foram submetidos à análise estatística para identificação daqueles com maior diferença de expressão (Figura 10). Utilizando como base os resultados da análise, foram selecionados os genes que seriam utilizados para confirmação da expressão diferencial por RT-PCR semiquantitativa em todas as amostras de tumores de paratireóide. São eles: FGF2, IGF-1-R, Timp-3, NOTCH-1, PTK7, RET e B-raf. O gene RhoA, ausente nas membranas, porém, integrante da mesma via do B-raf, também foi estudado.

O preparo das amostras utilizadas e as reações de PCR seguiram as etapas:

- A. Extração e quantificação do RNA total
- B. Síntese de cDNA e PCR para checar a síntese
- C. PCR dos genes selecionados

A. Extração e quantificação do RNA total:

Todas as amostras foram submetidas à extração de RNA total pela técnica do Trizol descrita anteriormente. A confirmação da integridade do RNA foi realizada após eletroforese m gel de agarose 1% para análise das subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal (Figura 19), todas as amostras exceto a de número 14 foram utilizadas. Em seguida, o material foi quantificado em espectrofotômetro (Tabela 9).

Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA total. As duas subunidades ribossomais 18S e 28S podem ser observadas. A amostra 14 não foi utilizada.

Tabela 9. Valores obtidos após a quantificação de cada amostra. A absorvância representa os valores obtidos no comprimento de onda 260nm.

Paciente	Absorvância (AU)	Concentração (ng/ μ L)	Relação A_{260}/A_{280}
AAC	0,225	309,0	1,75
ABF	0,163	858,3	1,78
AJC	0,824	1153,1	1,76
AMR	0,253	354,1	1,73
NA	0,465	661,6	1,70
BPC	0,650	950,0	1,77
CB	0,786	789,6	1,80
DCM	0,861	1206,4	1,76
GCB	0,368	500,3	1,76
JAS	0,768	938,9	1,83
JSO	0,221	309,4	1,70
LB	0,897	1280,0	1,9
LBC	0,475	438,9	1,75
LLC	0,705	987,6	1,82
LRE	0,455	637,4	1,72
LRSK	0,903	1264,6	1,84
LZL	0,464	649,6	1,90
MEMD	0,347	466,9	1,70
MFP	0,698	964,6	1,83
MG	1790,0	2470,0	1,75
MJVS	0,233	186,9	1,71
MM	0,246	344,2	1,70
MMR	0,507	709,9	1,85
MRG	0,953	1333,7	1,86
MST	0,176	238,5	1,74
PJS	1556,0	2178,4	1,9
RMS	0,707	989,6	1,72
RPM	0,169	227,8	1,70
SB	0,786	1495,2	1,80
SMA	0,420	560,0	1,80

SMC	0,580	812,0	1,82
TJR	0,348	487,2	2,00
VCT	0,500	699,7	1,77
VJS	0,646	1808	1,93
WA	0,678	678	1,80
ZAP	0,359	452,5	1,94

B. Síntese de cDNA e PCR para checagem:

Utilizando-se os RNAs anteriormente extraídos, foi realizada síntese de cDNA. Para verificar a eficiência da reação, uma PCR foi realizada utilizando –se *primers* do gene BCR que foi também utilizado como controle interno em todas as reações. Conforme demonstrado na Figura 20, a reação para síntese de cDNA foi eficiente em todas as amostras testadas.

C. PCR dos genes selecionados:

Para cada gene selecionado foi realizada padronização da PCR a fim de se determinar as condições ideais de amplificação. Assim, foram estabelecidos os números de ciclos nos quais a reação estivesse na fase exponencial e a temperatura de *annealing* (Tabela 10).

Tabela 10. Condições utilizadas para realização das PCRs em cada um dos genes estudados .

Gene	<i>Annealing</i>	Ciclos
FGF ₂	58°C	39
IGF-1-R	56°C	37
TIMP-3	55°C	38
NOTCH-1	55°C	38
PTK-7	55°C	35
RET	58°C	40
RAF	59°C	35
RAS	59°C	35
BCR	55°C	35

Foi realizada co-amplificação de todos os genes com o controle interno BCR. Nas Figuras 21 e 22 estão representadas a co-amplificação do BCR com o gene IGF-1R e com o gene NOTCH-2, respectivamente. A magnitude da expressão de cada um dos genes foi determinada em relação ao BCR (Tabela 11). Todas as reações foram realizadas em duplicata.

Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 2% demonstrando os resultados da reação de co-amplificação dos genes BCR e IGF-1-R, obtidos para 14 amostras e um controle negativo (amostra 15). A reação foi realizada em duplicata.

Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 2% demonstrando os resultados da reação de co-amplificação dos genes BCR e NOTCH-2, obtidos para 13 amostras e um controle negativo (amostra 14). A reação foi realizada em duplicata.

Tabela 11. Resultados obtidos após a quantificação dos produtos de PCR para os genes selecionados em relação ao controle interno. A escassez de material, bem como a dificuldade da manipulação de RNA, dificultaram a execução da PCR de todos os genes em todos os pacientes

	FGF ₂	IGF1-R	NOTCH-1	TIMP-3	IRF-1	E-CADH	RAS	PTK7	RAF	RET
AAC					3,3	1,94	0,73			0,84
ABF	0,3	0,65	0,28	0,53	2,1	1,06	0,82	0,80		0,93
AJC	0,17	0,52	0,03	1,06	3,42	2,05	1,28	0,72	0,39	1,53
AMB	0,18	0,66	0,87	0,92	1,18	1,33				
AN	0,22	0,62	0,33	1,11	2,12	1	0,16	0,43		1,12
BPC										0,85
CB						0,78		0,81	0,55	3,17
DCM	0,17	0,23	0,17	0,67	2,53	1,7	1,6	0,60	0,47	1,03
GCB					1,33	2,29	0,42			1,16
JAS	0,39	0,45	0,39	81	1,05	1,75	0,45			
JSO										
LB								0,63	0,52	0,73
LBC					2,74					
LLC	0,34	0,71	0,17	1,22	1,78	1,02	0,75			0,94
LRE	0,21	0,61	0,89	0,9	1,09	1,56				
LRSK	0,18	0,48	0,26	0,36	2,93	0,9	1,9	1,87	0,90	
LZL										
MEMD					1,97	2,13	0,41	0,35		0,96
MFP										
MG					1,6	1,28	1,21	1,88	0,71	1,70
MJVS	0,38	0,43	0,26	1,63	1,65	1,41				
MM					1,25	1,37		0,27		0,80
MMR								0,83	0,49	0,70
MRG	0,1	1,78	0,35	0,33	3,07	1,1	1,67	1,45	0,53	2,14
MST					1,83			0,39	0,64	0,95
PJS								0,48		
RMS	0,21	0,44	0,12	0,74	3,07	1,88	0,58	0,49	0,47	1,06
RPM					2,13	2,04	0,1	0,39		1,53
SB								0,71	0,54	
SMA										
SMC								0,92		
TJR						1,04		0,59	0,49	0,80
VCT	0,2	0,67	0,11	1,29	2,95		0,96	0,75		0,79
VJS								1,66	0,62	1,95
WA								0,78		
ZAP					1,98					0,75

5.5. Correlações encontradas

Foram correlacionados dados bioquímicos e hormonais com o diagnóstico anátomo-patológico. Esta análise possibilitou encontrarmos achados característicos de pHPT, como níveis sanguíneos significativamente maiores ($p < 0,05$) de cálcio total e iônico, assim como de PTH em portadores de carcinomas, quando comparados aos portadores de adenomas e hiperplasia relacionada a NEM-1 (Figura 23A, B e D). Por outro lado, níveis séricos de fósforo apresentaram

comportamento inverso, encontrando-se níveis significativamente menores ($p < 0,05$) nos carcinomas do que nos adenomas e hiperplasia relacionada a NEM-1 (Figura 23C).

A paciente MST está representada de forma diferente nos gráficos que se seguem por ter um diagnóstico histológico de adenoma atípico. O paciente LRSK, apesar do diagnóstico anátomo-patológico de adenoma apresentou comportamento clínico e molecular sugestivo de carcinoma, tendo assim sido considerado em todos as análises que se seguem. (Figuras 23, 24 e 25)

Figura 23. A: níveis séricos de cálcio total(A) e iônico (B), fósforo (C) e de PTH (D) em portadores de pHPT causados por adenomas e hiperplasia relacionada a NEM-1 comparados aos portadores de carcinomas. Nota-se níveis sanguíneos significativamente maiores de cálcio total e iônico e de PTH nos pacientes acometidos por carcinoma ($p < 0,05$) e maiores de fósforo naqueles com adenomas ($p < 0,05$). • adenoma, + hiperplasia relacionada a NEM-1, * carcinoma e ◇ adenoma atípico..

Os genes cuja expressão por PCR semiquantitativa foi medida em adenomas e hiperplasias relacionadas a NEM-1 e carcinomas de paratireóides são apresentados na Tabela 12 e, em alguns destes, pudemos analisar tal

expressão em tecido normal. Em todas as amostras que se seguem, dados de adenomas e hiperplasias relacionadas a NEM-1 foram agrupados, pois não foi encontrada, nos genes analisados, diferenças estatisticamente significantes entre estas duas condições. Não foram consideradas nesta análise as hiperplasias secundárias.

Tabela 12. Valores de média e desvio padrão da expressão semiquantitativa dos genes estudados por RT-PCR em adenomas e carcinomas de paratireóide. Alguns destes genes tiveram sua expressão verificada em glândula normal.

	ADENOMA	CARCINOMA	
IGF1R	0.545±0.044	0.480±0.000	
FGF2	0.252±0.025	0.140±0.040	
NOTCH2	0.329±0.088	0.305±0.045	
TIMP3	0.989±0.095	0.345±0.015	
IRF1	0.541±0.050	0.427±0.097	2.360±0.170
RET	0.957±0.151	0.567±0.186	0.230±0.000
RHOA	0.687±0.127	1.590±0.202	
PTK7	0.582±0.050	1.717 0.102	0.902±0.111
RAF1	0.509±0.026	0.681±0.112	0.914±0.179

Ao compararmos as expressões semiquantitativas do mRNA dos genes TIMP3, IRF1, RhoA e PTK7 entre adenomas e hiperplasias relacionadas a NEM-1 e carcinomas de paratireóides hipersecretantes de PTH, pudemos verificar menor expressão em carcinomas do gene supressor tumoral TIMP3 ($p < 0,05$) (Figura 24A). De maneira inversa, houve maior expressão nos carcinomas do gene PTK7 ($p < 0,05$) (Figura 24 D). O gene Rho A mostrou-se significativamente mais expresso em carcinomas que em paratireóide normal, não tendo sido observada diferença estatisticamente significativa entre adenomas e carcinomas gene IRF1 não se expressou de forma diferente entre adenomas hiperplasias relacionadas a NEM-1 e carcinomas ($p > 0,05$), entretanto quando comparamos tecido paratireoideano normal com neoplásico constatamos uma evidente menor expressão deste gene nos adenomas hiperplasias relacionadas a NEM-1 e carcinomas ($p < 0,05$) (Figura 24B).

Figura 24. Expressão semiquantitativa do mRNA do TIMP3 (A), IRF1 (B), RhoA (C) e PTK7 (D) em adenomas e hiperplasias relacionadas a NEM-1 e carcinomas de paratireóides. Verifica-se maior expressão do TIMP3 em adenomas que em carcinomas ($p < 0,05$); o inverso ocorreu com o gene PTK7, com maior expressão em carcinomas ($p < 0,05$); o gene IRF1 apresentou menor expressão nas neoplasias que na glândula normal ($p < 0,05$). O gene RhoA mostrou-se significativamente mais expresso em carcinomas que em paratireóide normal, não tendo sido observada diferença estatisticamente significativa entre adenomas e carcinomas. NOR = paratireóide normal; U.A.D.O. = unidades arbitrárias de densidade óptica. ■ tecido normal, ● adenoma, + hiperplasia relacionada a NEM-1, ◇ adenoma atípico e * carcinoma.

O gene RAF1, de forma diferente do RhoA, não mostrou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tecidos de paratireóide estudados ($p > 0,05$) (Figura 25). Assim, apesar de apresentar correlações positivas e negativas significantes ($p < 0,05$) com alguns genes neste estudo, estas não foram valorizadas e não serão mostradas individualmente (Tabela 13).

Encontrou-se correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a expressão do gene PTK7 e a expressão do gene RhoA ($\rho = 0,714$) e entre a expressão do gene PTK-7 e a expressão do gene TIMP-3 ($\rho = -0,767$) (Figura 26).

Figura 25. Expressão semiquantitativa do gene RAF1. Análise comparativa entre adenomas e hiperplasias relacionadas a NEM-1, carcinomas e paratireóides normais. Não há quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. NOR = paratireóide normal. U.A.D.O.= unidades arbitrárias de densidade óptica. • adenoma, + hiperplasia relacionada a NEM-1, ◇ **adenoma atípico** e * carcinoma.

Também foi demonstrada uma correlação positiva estatisticamente significativa entre a expressão do gene IRF1 e a expressão do gene NOTCH2 (Figura 27A) e FGF2 (Figura 27B) ($p < 0,05$). Encontrou-se, ainda, uma correlação positiva estatisticamente significativa entre a expressão do gene IRF1 e a expressão do gene NOTCH2 (Figura 27A) e FGF2 (Figura 27B) ($p < 0,05$).

Figura 26. Correlações entre as expressões semiquantitativas do gene PTK7 e os genes RhoA e TIMP3. Percebe-se nítida correlação positiva da expressão do PTK7 com o RhoA ($\rho = 0,714$) (A) e negativa com o TIMP3 ($\rho = -0,767$) (B). U.A.D.O = unidades arbitrárias de densidade óptica. ■ tecido normal, • adenoma, + hiperplasia relacionada a NEM-1 e * carcinoma.

Figura 27. Nota-se uma correlação positiva entre as expressões semiquantitativas do IRF1 com os genes NOTCH2 ($\rho = 0,673$, $p < 0,05$) (A) e FGF2 ($\rho = 0,696$, $p < 0,05$) (B). U.A.D.O = unidades arbitrárias de densidade óptica. • adenoma e * carcinoma.

Foram determinadas as correlações estatisticamente significante entre os genes estudados.

Tabela 13. Coeficiente de variação de *Spearman* (ρ) e teste t de *Student* (p) das correlações positivas ou negativas estatisticamente significantes entre as expressões semiquantitativas de genes estudados em adenomas e carcinomas de paratireóides e em glândulas normais.

Variável	Variável	Spearman Rho	Prob>Rho
IRF-1	NOTCH-2	0,673	0,012
IRF-1	FGF-2	0,696	0,008
PTK-7	TIMP-3	-0,767	0,016
PTK-7	RHOA	0,714	0,006
RAF1	NOTCH-2	0,900	0,037
RAF1	TIMP-3	-0,900	0,037
RHOA	FGF-2	-0,754	0,012

6. DISCUSSÃO

Os mecanismos moleculares que culminam com o processo de oncogênese nas paratireóides permanecem pouco esclarecidos. Provavelmente, como em outros tecidos, a inativação de genes supressores tumorais ou a ativação de oncogenes após a escassez de material, bem como a dificuldade da manipulação de RNA, dificultaram a execução da PCR de todos os genes em todos os pacientes a ocorrência de mutações sejam eventos envolvidos. A literatura mostra poucos genes diretamente relacionados ao aparecimento de tumores nesta glândula.

Este estudo teve como objetivo central a identificação de genes diferencialmente expressos entre adenoma e carcinoma de paratireóide, buscando identificar possíveis marcadores ou perfis de expressão gênica que pudessem auxiliar no diagnóstico diferencial destas duas condições, uma vez que o exame anátomo-patológico apresenta limitações.

Os genes diferencialmente expressos foram confirmados não apenas em adenomas e carcinomas, mas também em hiperplasias de paratireóide, já que esta é uma condição que também pode oferecer dificuldade no diagnóstico diferencial com os adenomas. Realizou-se, ainda, um levantamento dos resultados do exame anátomo-patológico bem como dos exames clínico-laboratoriais, com o objetivo de relacioná-los aos achados moleculares.

A qualidade do material utilizado foi verificada em cada uma das etapas e as técnicas utilizadas para extração de RNA e síntese de cDNA, marcado ou não, são consagradas e utilizadas em inúmeros trabalhos descritos na literatura. O gene BCR, além de excelente controle interno, auxilia na verificação da qualidade do RNA, já que sua expressão é rapidamente perdida quando este sofre degradação.

Dentre as metodologias existentes para alcançar o objetivo proposto, utilizou-se o RDA e a varredura simultânea de diversos genes agrupados em painéis posteriormente submetidos à hibridização.

O RDA possibilitou isolar clones exclusivos de cada uma das duas populações analisadas (adenoma e carcinoma). Todos os clones foram seqüenciados e tiveram suas seqüências comparadas com seqüências de genes conhecidos existentes no *Gene Bank*. Foi encontrado apenas um gene expresso somente no adenoma (*human DNA sequence from clone RP11-457°1 on chromosome X*) e 22 expressos apenas no carcinoma. A expressão destes genes não foi confirmada por RT-PCR, porém, estudos posteriores serão realizados com esta finalidade.

Utilizando-se as membranas *no match* contendo 768 clones fixados em duplicata, foram isolados 21 clones com diferença de expressão entre adenoma e carcinoma, 7 deles com expressão aumentada no carcinoma e 13 com expressão aumentada no adenoma. À época da montagem das membranas, todos os clones selecionados eram inéditos, atualmente, a maioria dos clones iniciais já têm sua seqüência associada a genes conhecidos. Entre os clones associados a genes descritos, o IRF-1 (OMIN #147575), que aparece com sua expressão aumentada no adenoma, foi selecionado para análise por PCR e será posteriormente discutido.

A classificação hierárquica possibilitou uma primeira análise dos 1366 genes das membranas Atlas. A divisão destes genes em quatro grupos de padrões comportamentais semelhantes evidenciou a presença dos genes RET, PTK7 e Notch-2 com expressão aumentada nos carcinomas, sendo, assim, selecionados para análise por PCR. Embora não sejam empregadas análises estatísticas para tal classificação, a visualização de perfis gênicos diferentes é um primeiro passo na escolha de genes possivelmente envolvidos nas condições analisadas.

O uso de membranas Atlas com esta finalidade vem sendo amplamente difundido com excelentes resultados em análises de tumores de estômago⁴⁵, pâncreas⁴⁶, fígado⁴⁷ e mama⁵². A enorme variedade de membranas, cada uma contendo diferentes categorias de cDNAs fixados, permite seu emprego nos mais diversos tecidos.

Recentemente, um estudo identificou, utilizando membranas Atlas, alguns genes diferencialmente expressos entre hiperplasias e adenomas de paratireóide de pacientes portadores de pHPT⁵³. A membrana por eles utilizada continha apenas genes de proteínas tirosino-cinase. Foram identificados três genes expressos apenas na hiperplasia e dezessete genes expressos apenas no adenoma. Nenhum dos genes identificados neste estudo foi encontrado em nossa prospecção.

Os genes selecionados cuja expressão estava aumentada na membrana Atlas hibridizada com o adenoma foram: B-raf (OMIN #164757), TIMP-3 (OMIN #188826), NOTCH-2 (OMIN #600285) e bFGF (OMIN #134920) e os genes selecionados cuja expressão estava aumentada no carcinoma foram: IGF-1-R, (OMIN #147370), PTK7 (OMIN #601890) e RET (OMIN #188550) foram selecionados para serem confirmados por PCR em tecidos de paratireóide incluindo adenomas, carcinomas e hiperplasias. Além disso, o gene *RhoA* (OMIN #165380), ausente nas membranas, porém integrante da mesma via do *B-raf* também foi estudado.

A seguir, será discutido cada um dos genes que demonstrou expressão diferencial entre o adenoma e o carcinoma nas metodologias que utilizaram hibridização em membrana (Atlas e *no match*).

Nas análises, estatísticas realizadas com os resultados da RT-PCR, não foram evidenciadas diferenças na expressão dos genes selecionados entre os adenomas e as hiperplasias relacionadas à NEM-1, razão pela qual estas duas condições foram agrupadas na comparação com o carcinoma.

IRF-1

Este gene é um fator de transcrição da via de sinalização do interferon gama. A atenção dada a esta família tem aumentado e seus mecanismos de ação e a interação entre seus membros e com outros fatores de transcrição têm sido estudada com a finalidade de esclarecer seu papel na regulação dos mecanismos de defesa, na adaptação da resposta imune e, principalmente, na oncogênese⁵⁴.

O IRF-1 parece ser um regulador crítico de crescimento e morte celular pois sua inativação acelera a transformação celular *in vitro*⁵⁵. Estudos também indicaram ação supressora tumoral deste gene em linhagens de câncer de mama⁵⁶.

O gene do IRF-1 apresentou expressão diminuída na membrana *no match* hibridizada com sonda de carcinoma quando comparada àquela hibridizada com sonda de adenoma. Ao analisar a expressão deste gene em 22 tecidos de paratireóide, incluindo hiperplasias, adenomas e carcinomas, não foi encontrada expressão diferencial estatisticamente significativa. A diferença de expressão entre os dois tumores utilizados na confecção das sondas foi confirmada. Ao comparar a expressão obtida nas amostras de hiperplasia, adenoma e carcinoma com a expressão em tecido paratireoideano normal, verificamos diminuição da expressão das três condições em relação ao tecido normal. Este dado reforça a hipótese deste gene ser um supressor tumoral e sugere que, em paratireóide ele possa estar envolvido nas etapas iniciais da tumorigênese.

RhoA/ ras/ B-raf

Vertebrados superiores albergam três proteínas GTPases da família Rho: RhoA, RhoB e RhoC, que possuem em sua sequência de aminoácidos 85% de similaridade entre si e 50% de homologia com as proteínas ras⁵⁷, embora estas três isoformas tenham perfis diferentes de expressão, dependendo do tipo de tecido⁵⁸.

A função das proteínas Rho reside em integrar sinais extracelulares a seus alvos, regulando assim morfologia, agregação e motilidade celulares⁵⁹. Em humanos, os três genes que codificam as proteínas Rho localizam-se em cromossomos diferentes e possuem características estruturais distintas⁶⁰.

Diferenças funcionais entre estas três proteínas (RhoA, RhoB e RhoC) podem ser vistas em estudos realizados com células em cultura. RhoA e RhoB são capazes de promover transformação de fibroblastos em cultura. O gene RhoA apresenta expressão aumentada em diversas linhagens de células malignas⁶¹. Por outro lado, RhoC não é capaz de transformar fibroblastos em cultura, porém, estudos utilizando *microarrays*, mostraram que ocorre aumento progressivo da expressão do gene RhoC concomitante ao aumento da agressividade tumoral e do potencial metastático⁶².

Desta forma, por apresentar expressão aumentada em linhagens malignas metastáticas, o gene RhoC parece ser mais eficiente na ativação das proteínas cinase ROCK que RhoA, já que a ativação ou inibição destas proteínas estão associadas a promoção ou inibição de motilidade celular, respectivamente^{63,64}.

Estudos recentes associaram o gene RhoB a mecanismos apoptóticos e atividade antineoplásica e, deleções cromossômicas deste gene comprometem a

resposta de fibroblastos de linhagens embrionárias ao estresse⁶⁵. Estes achados sugerem que o gene RhoB atue como moderador negativo da sobrevivência celular⁶⁶.

A família Rho de GTPase, especialmente RhoA, desempenha um papel importante na progressão do ciclo celular, por meio da regulação da expressão do oncogene ciclina D1 e pela regulação dos níveis dos genes supressores tumorais p21 e p27kip1⁶⁷.

A associação entre mecanismos dependentes de Rho e o oncogene *ras* foi demonstrada em diversos estudos de expressão utilizando tumores malignos. O oncogene *ras* apresenta um papel essencial na ativação da Raf-cinase, a qual é diretamente responsável pela ativação da via da MEK-ERK cinase⁶⁸. No entanto, a associação com *ras* não é suficiente para ativar *raf in vitro*, indicando que *ras* deve ativar alguns outros eventos bioquímicos que culminam com a ativação de *raf*⁶⁹. Um mutante dominante negativo de RhoA pode bloquear a ativação do *raf* induzida por *ras*. Acredita-se que *raf* associado à membrana, porém não o citoplasmático possa ser ativado por RhoA.

Os proto-oncogenes *ras* atuam nos mecanismos de sinalização que modulam diversos aspectos celulares que incluem: proliferação, diferenciação, motilidade e morte⁷⁰.

Normalmente, estas proteínas são reguladas por GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), que convertem *ras*-GDP inativo em *ras*-GTP ativo e por proteínas GAP (*GTPase activating proteins*), que catalisam a inativação de *ras*-GTP em *ras*-GDP, atuando como reguladores negativos da função *ras*⁷¹.

As formas mais freqüentes de mutações ativadoras no gene *ras* que levam ao acúmulo de sua forma ligada a GTP ocorrem secundariamente à substituição de

uma única base nitrogenada nos codons 12, 13 ou 61 e bloqueiam a habilidade de GAP em promover a conversão de *ras* para sua forma inativa. Assim, mutações nestes resíduos convertem-nos em oncogenes ativos. Lembramos que já foi descrita ação paradoxal de *ras* e outros oncogenes por induzirem mecanismos sinalizadores tanto apoptóticos como antiapoptóticos⁷².

Em nosso estudo, o gene *RhoA* não apresentou expressão diferencial estatisticamente significativa entre adenomas e hiperplasias relacionadas a NEM-1 e carcinoma de paratireóide. Contudo, a expressão do gene *RhoA* foi significativamente maior nos carcinomas em relação à paratireóide normal. A expressão deste gene nos adenomas e hiperplasias relacionadas a NEM-1 foi bastante heterogênea.

Sabe-se que o oncogene *RhoA* pode também ativar *B-raf* cuja expressão em nosso estudo estava aumentada no adenoma quando comparada às do carcinoma nas membranas Atlas. Esta diferença de expressão, no entanto, não foi confirmada na avaliação de 15 amostras incluindo: hiperplasias, adenomas e carcinomas. Este proto-oncogene é uma cinase que participa da cascata sinalizadora MEK/ ERK MAPK⁷³, seu papel em mecanismos tumorigênicos permanece indefinido, pois, sabe-se que *B-raf* tanto pode suprimir apoptose como inibir PI3-K, favorecendo mecanismos apoptóticos⁷⁴.

Nossos achados sugerem o envolvimento do gene *RhoA* no desenvolvimento dos carcinomas, porém, desvinculado de *B-raf*, que não apresentou expressão diferente nas condições adenoma e carcinoma em relação ao tecido normal. Permanece por ser elucidado se a expressão heterogênea de *RhoA* entre os adenomas teria algum significado biológico.

TIMP-3

TIMPs são proteínas de baixo peso molecular (21 KD) que têm como principal função a inibição das metaloproteinases (MMs)⁷⁵, que são enzimas proteolíticas presentes na matriz extracelular^{76,77}.

Existem inúmeras doenças, como por exemplo a artrite reumatóide, nas quais podem ser observados níveis elevados de MMPs, sem aumento proporcional nos níveis de TIMPs, levando a um desequilíbrio que resulta em destruição tecidual⁷⁸.

Entre as proteínas da família TIMP, TIMP-3 é a única que se liga fortemente à matriz extracelular, inibindo não apenas as MMPs, mas também outras enzimas como as da família ADAM (*adamalysin metalloproteinases*)^{79,80}. Outro efeito interessante das proteínas TIMP-3 é a habilidade de iniciar mecanismos celulares apoptóticos⁸¹. Assim, hiperexpressão de TIMP-3 induz apoptose em diversas linhagens celulares, sendo este gene considerado um supressor tumoral^{82,83}. Níveis diminuídos de TIMP-3 aparecem associados a metástase em meduloblastoma⁸⁴. Em treze de vinte e um tumores do pâncreas endócrino, o gene TIMP-3 aparece hipermetilado, o que pode inibir sua expressão⁸⁵.

No presente estudo, foi observada expressão diminuída do gene TIMP-3 na membrana Atlas hibridizada com sonda de carcinoma de paratireóide em relação àquela hibridizada com sonda de adenoma. Esta expressão diferencial foi confirmada por RT-PCR em 15 tecidos de paratireóide, incluindo 2 carcinomas não metastático, 1 hiperplasia e 12 adenomas.

Nossos dados corroboram aqueles encontrados na literatura onde a menor expressão do gene TIMP-3 cursa com um aumento das MMPs que degradam a matriz extracelular favorecendo, assim, invasão local e metástase à distância⁸⁶. Nenhuma dos dois carcinomas aqui estudados apresentava metástase à distância,

um deles localmente infiltrativo e o outro caracterizado por invasão capsular e vascular.

Notch

A sinalização via Notch parece atuar na regulação do ciclo celular. Há pelo menos 4 genes Notch distintos (Notch 1-4) e alguns ligantes identificados (proteínas DSL, *Delta*, *Serrate* e *Lag-2*) . Após a ligação com o ligante, o receptor Notch ativado promove a transcrição de genes efetores como *HES1* e *HES5*^{87,88}. Contudo, a relação direta do gene Notch em mecanismos relacionados à tumorigênese permanece pouco esclarecida.

Alguns estudos mostram que este gene está envolvido na interpretação dos sinais que levam à ativação do oncogene RAS e medeiam sua ação⁸⁹.

Nossos achados mostraram expressão diminuída do gene NOTCH-2 na membrana Atlas hibridizada com sonda de carcinoma de paratireóide quando comparada àquela hibridizada com sonda de adenoma. Ao estudar a expressão deste gene utilizando 15 amostras de tecido de paratireóide, entre eles: 2 carcinomas, 1 hiperplasia e 12 adenomas, não foi possível confirmar a expressão diferencial, apesar daqueles tumores inicialmente utilizados nas hibridizações apresentarem diferença estatisticamente significativa.

A literatura é controversa quanto à participação deste gene nos processos tumorigênicos, uma vez que Notch pode agir como oncogene em alguns tipos de neoplasia (Notch-1) e como gene supressor em outros (Notch-2)^{90,91}.

FGF

O bFGF desempenha importante papel na proliferação, diferenciação e sobrevivência de células de quase todos os sistemas por meio da regulação da transcrição e da atividade de múltiplos genes^{92,93}. O aumento da expressão do bFGF já foi descrito em vários tipos tumorais e uma correlação positiva entre o aumento da expressão deste gene e o estadiamento tumoral avançado foi observado em tumores de ovário⁹⁴, bexiga⁹⁵, pâncreas⁹⁶, estômago⁹⁷ e sistema nervoso central⁹⁸.

Por outro lado, em tumores pituitários, o aumento da expressão do bFGF foi observado em alta porcentagem de adenomas, sem, no entanto, existirem evidências de correlação com a proliferação celular, razão pela qual se acredita que ele desempenhe outros papéis que não a indução de progressão tumoral nesses adenomas.⁹⁹ Da mesma forma, não se atribuiu ao bFGF um papel importante na tumorigênese de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, pois um estudo utilizando análise imunohistoquímica demonstrou que todos os tumores bem diferenciados exibiam altos níveis de imunorreatividade para o bFGF, enquanto em tumores pouco diferenciados, a imunorreatividade era baixa ou indetectável.¹⁰⁰ Os resultados observados em nossa casuística não confirmaram por RT-PCR a expressão aumentada do gene bFGF em adenomas e hiperplasias em relação aos carcinomas que havia sido observada nas membranas Atlas. Este dado sugere que, diferente do que tem sido descrito para outros tecidos, o bFGF não parece participar da progressão tumoral em paratireóide^{101,102}.

IGF-I-R

O IGF-I e seu receptor são reconhecidos como importantes fatores permissivos de proliferação celular. O IGF-I-R é um heterotetrâmero transmembrânico que consiste em duas subunidades α e duas β . O papel do IGF-I-R na tumorigênese parece não estar relacionado à sua hiperexpressão, porém à sua presença¹⁰³.

Células tumorais com IGF-I-R funcionantes são capazes de estimular seu próprio crescimento por meio da síntese de IGFs endógenos. Este processo de secreção autócrina contribui para a autonomia parcial e crescimento rápido que caracterizam as células malignas¹⁰⁴. Tal fenômeno tem sido estudado especialmente em tumores sólidos comuns, como carcinomas de pulmão, de mama e de intestino. Hiperexpressão do receptor de IGF-I humano normal em células NIH 3T3 leva a alteração na morfologia celular, formação de colônia em ágar e maior capacidade de formação tumoral em ratos¹⁰⁵. Também foi demonstrada expressão aumentada destes receptores em células tumorais comparada à expressão com os tecidos normais correspondentes em, por exemplo, câncer de tireóide¹⁰⁶, hepatoma¹⁰⁷ e carcinoma do endométrio¹⁰⁸.

No presente estudo, foi demonstrada expressão aumentada de IGF-1R na membrana hibridizada com sonda de carcinoma quando comparada àquela hibridizada com sonda de adenoma. Esta expressão diferencial não foi confirmada quando 15 amostras foram analisadas por PCR (1 hiperplasia, 12 adenomas e 2 carcinomas). Este achado sugere que gene IGF-1R não participe nos mecanismos moleculares que levam a tumorigênese das paratireóides.

PTK7

Proteínas tirosino-cinase (PTK) são codificadas por uma grande família de genes e funcionam na transdução de sinais, participando dos mecanismos de crescimento celular, migração, diferenciação e sobrevivência¹⁰⁹¹¹⁰. Há duas classes de PTKs: receptores de membrana e proteínas intracelulares¹¹¹.

A família de receptores tirosino-cinase consiste em 14 subfamílias, e, na maioria delas, quando o ligante se liga ao receptor, ocorre dimerização e autofosforilação destes receptores e as moléculas posteriormente recrutadas dependem dos ligantes.

As PTKs citoplasmáticas podem ser divididas em 9 subfamílias freqüentemente intermediárias na sinalização pós-receptores, incluindo aqueles do tipo tirosino-cinase e outros como receptores associados à proteína G. Algumas destas PTKs citoplasmáticas são substrato ou transdutores de sinalização de outras PTKs, como por exemplo, o receptor do PDGF (*platelet derived growth factor*), do FGF e do NGF (*nerve growth factor*)¹¹².

Muitas PTKs são oncogenes e aberrações nesta família de genes têm sido relacionadas ao aparecimento de diversos tumores malignos¹¹³¹¹⁴¹¹⁵. O defeito mais comumente observado nestes tumores é a hiperexpressão dos genes que codificam estas proteínas, em detrimento do aparecimento de mutações, que ocorrem com menor freqüência¹¹⁶.

A proteína PTK7 pode ser incluída no grupo de receptores de membrana tirosino-cinase¹¹⁷. O gene que codifica esta proteína encontra-se no cromossomo 6 e foi inicialmente isolado a partir de melanócitos normais¹¹⁸. Em paralelo a esta descoberta, a seqüência completa do cDNA do gene CCK4 (*colon carcinoma kinase 4*) que é idêntica à do PTK7, foi obtida a partir de tecido de carcinoma de

cólon¹¹⁹. Assim, PTK7 e CCK4 são o mesmo gene. A família PTK7 é conservada durante a evolução filogenética em diversos grupos¹²⁰.

O polipeptídeo deduzido a partir da sequência de seu cDNA é um receptor semelhante à tirosina-cinase que contém um domínio extracelular com 7 alças semelhante à imunoglobulina e um domínio catalítico PTK inativo¹²¹. A função desta proteína ainda é desconhecida, entretanto postula-se que possa atuar como moduladora de sinais para outras PTKs. Esse sistema de transmissão de sinais está implicado em diversas e importantes funções celulares, tais como diferenciação, mitogênese, sobrevivência, metabolismo, adesão, morfogênese e motilidade¹²²¹²³.

Deleções do cromossomo 6, onde o gene PTK7 está localizado foram descritas em um número importante de tumores malignos, incluindo câncer de mama¹²⁴ e melanomas¹²⁵. Também foi recentemente demonstrado que este gene tem papel importante no fechamento do tubo neural em vertebrados¹²⁶. Estas observações sugerem que o gene PTK7 participe dos mecanismos de sinalização durante o desenvolvimento normal, tumoral e metastático, embora sua função permaneça desconhecida¹²⁷.

Estudos realizados com linhagens de melanoma sugerem relação entre a perda de expressão do gene PTK7 e a agressividade tumoral¹²⁸. Como em carcinoma de cólon a expressão deste gene aparece aumentada¹²⁹, criou-se um paradoxo quanto à função da proteína por ele codificada. Acredita-se que por existirem cinco transcritos alternativos para este gene, a expressão de diferentes transcritos em diferentes populações celulares determine efeitos biológicos distintos.

Nossos achados são semelhantes àqueles encontrados em carcinoma de colon. Este gene apresentou sua expressão aumentada na membrana hibridizada com sonda de carcinoma e sua expressão diferencial foi confirmada por RT-PCR em 22 amostras incluindo três carcinomas, quatro hiperplasias e 15 adenomas de paratireóide. Estes achados sugerem que o gene PTK-7 esteja envolvido na oncogênese da paratireóide e a confirmação desta expressão diferencial em uma casuística maior de adenomas e carcinoma poderá permitir sua utilização no diagnóstico diferencial destas duas condições em casos duvidosos.

RET

O proto-oncogene RET, localizado no cromossomo 10 (10q11.2), codifica uma proteína que é um receptor transmembrana com atividade tirosino-cinase, relacionada ao crescimento. Este proto-oncogene aparece expresso em tecidos e tumores advindos da crista neural¹³⁰ e pode ser ativado por meio de duas vias distintas, quais sejam:

1. Presença de mutações pontuais (*missense*), heterozigotas, do tipo germinativas que aparecem nas NEM-2A e 2B. Nas NEM-2A, mutações nos exons 10 e 11 foram descritas em 98% dos casos¹³¹ e, nas NEM-2B, a principal mutação ocorre no codon 918 do exon 16 em 95% dos casos¹³².
2. Recombinação genética, envolvendo rearranjos intra e intercromossomais (50-53C), que resultam na síntese da proteína RET constitutivamente ativada. Esse é um mecanismo, até o momento, restrito aos carcinomas papilíferos de tireóide (PTC), em que o RET ativado passa a ser chamado de oncogene RET/PTC¹³³.

Apesar do RET proto-oncogene aparecer expresso apenas em células derivadas da crista neural¹³⁴, estudos mostram sua expressão em tecido paratireoideano, entretanto, sem diferença estatisticamente significativa quando comparados tecido normal, neoplásico e associado a NEM-2¹³⁵¹³⁶¹³⁷¹³⁸. Tampouco foi estabelecida relação direta entre mutações neste gene e o aparecimento de pHPT esporádico¹³⁹.

Nossos dados estão de acordo com aqueles encontrados na literatura pois, embora tenha sido observada expressão aumentada deste gene na membrana hibridizada com sonda de carcinoma, a análise por PCR nas demais amostras não mostrou diferença estatisticamente significativa entre hiperplasia, adenoma e carcinoma. Curiosamente, uma das amostras de hiperplasia apresentou expressão do oncogene RET muito aumentada. Esta amostra pertence a um paciente portador de NEM-1 e, embora não haja relatos na literatura estabelecendo ligação entre RET e NEM-1, esta família será posteriormente analisada de forma mais detalhada.

Foram realizadas, ainda, análises para avaliar se os genes estudados apresentavam correlação entre si e com variáveis clínicas, bioquímicas e anátomo-patológicas.

Hipercalcemia e PTH sangüíneo em níveis mais elevados e hipofosfatemia mais pronunciada foi nitidamente relacionada a carcinomas de paratireóides, ao contrário dos adenomas, nos quais tais alterações ocorreram de forma mais atenuada em nosso estudo. Ao contrário do fósforo sérico, com bastante sobreposição de valores entre adenomas e carcinomas, a calcemia e o PTH sangüíneo tiveram valores praticamente discriminatórios entre adenomas e carcinomas de paratireóides (Figura 23). Porém, apenas o cálcio iônico sérico

poderia ser utilizado para tal discriminação de forma segura. Contudo, o número pequeno de pacientes com carcinoma neste estudo ($n = 4$), aliado às exceções encontradas na literatura¹, com hipercalcemias pronunciadas em casos típicos de adenomas e carcinomas com hipercalcemias pouco expressivas, não autoriza o diagnóstico de neoplasia benigna ou maligna de paratireóide baseado apenas em dados bioquímicos ou hormonais.

À luz dos conhecimentos atuais, não é possível interpretar as correlações observadas entre os genes Notch-2 e IRF-1, bFGF e IRF-1, RhoA e PTK7 e TIMP-3 e PTK7. Estudos adicionais serão necessários para determinar se são correlações espúrias ou se, de fato têm algum significado biológico.

Um achado interessante foi o comportamento do paciente LRSK. Ao analisar os valores clínico-laboratoriais, observou-se níveis muito elevados de PTH e cálcio séricos, o que fizeram o médico que o acompanhava suspeitar do diagnóstico de carcinoma de paratireóide. O exame anátomo-patológico revelou tratar-se de adenoma e a revisão da lâmina confirmou este diagnóstico. Achados moleculares deste tumor foram semelhantes aos observados nos outros casos de carcinoma. Assim, a evolução clínica deste paciente deve ser acompanhada, uma vez que seus níveis de PTH não atingiram a normalidade, indicando que não houve cura com a cirurgia.

Outro ponto é a validade do exame anátomo-patológico se consideradas suas limitações e os critérios utilizados na classificação dos tumores paratireoideanos. Sabemos que é muito difícil, e por vezes impossível, a precisa diferenciação entre adenomas e hiperplasias de paratireóide e que o diagnóstico baseia-se na presença da alteração histológica em mais de uma glândula. Também sabemos que na maioria dos casos o diagnóstico intra-operatório é de adenoma,

ocorrendo exérese de apenas uma das glândulas e que cabe ao cirurgião avaliar a morfologia das outras glândulas. Mesmo frente a indícios de que as glândulas remanescentes sejam normais, não se pode afirmar tal fato e no momento que apenas uma das glândulas é analisada, há tendência para diagnóstico de adenoma. Assim, o cirurgião aparece como grande fator determinante do diagnóstico.

Por vezes, a simples manipulação glandular pode prejudicar sua função, fato que limita a obtenção de um fragmento de cada paratireóide para a análise histológica ideal. Novamente, cabe ao cirurgião a correta opção pela manutenção da integridade glandular e, conseqüentemente, manutenção do metabolismo do cálcio via PTH endógeno. Contudo, esta atitude limita o diagnóstico anátomo-patológico e favorece a busca de novas metodologias que possam apresentar maior precisão.

Embora o objetivo primário deste estudo tenha sido a identificação de genes diferencialmente expressos entre adenomas e carcinomas, também foi estudada a expressão dos genes selecionados em amostras de hiperplasia. Nenhum dos genes selecionados pelas três abordagens metodológicas diferentes se mostrou capaz de diferenciar hiperplasia e adenoma.

No caso da diferenciação histopatológica entre adenomas e carcinomas, também há conflitos, pois os critérios de malignidade como invasão vascular e capsular completas e presença de metástase nem sempre estão presentes. Nesta casuística, afastou-se a participação do IGF-1R e do bFGF na tumorigênese da paratireóide. Diferentemente do observado em tumores de vários outros tecidos. Por outro lado, até onde conhecemos, este é o primeiro estudo que demonstra a participação do gene supressor de tumor TIMP-3 na oncogênese da paratireóide.

A teoria mais aceita atualmente para explicar a evolução dos tumores paratireoideanos defende que podem ocorrer alguns caminhos iniciais tendo como ponto de partida a glândula normal.

No primeiro, há formação da hiperplasia policlonal em consequência a fatores externos que gerem hipocalcemia. Esta hiperplasia policlonal conferiria maior susceptibilidade à ocorrência de mutações e possibilidade de progressão para uma hiperplasia ou adenoma monoclonais. O que favoreceria uma ou outra situação seria o tipo de mutação e o gene envolvido. O terceiro caminho seria a evolução direta do tecido normal para carcinoma, em decorrência de mutações.

Os achados deste estudo, não afastam ou corroboram a teoria supracitada devido ao comportamento distinto dos genes que apresentaram expressão diferencial significativa entre as condições estudadas. O IRF-1 está nitidamente diferente entre a glândula normal e a glândula neoplásica, o que sugere que seja um gene supressor de tumor envolvido em uma etapa inicial comum entre a tumorigênese do adenoma e do carcinoma.

A expressão do gene RhoA, um forte candidato a proto-oncogene pela sua ação reguladora do ciclo celular, também sugere uma via comum para o desenvolvimento destes dois processos neoplásicos da paratireóide, visto que existe uma sobreposição da expressão encontrada nas amostras de adenoma e carcinoma. Por outro lado, os níveis de expressão de PTK7 significativamente maiores nos carcinomas do que nos adenomas sugere a hipótese de vias independentes na tumorigênese de adenomas e carcinomas de paratireóide, embora não se possa afastar a participação deste gene apenas em eventos finais de uma via única da tumorigênese, onde sua expressão aumentada seria um fator determinante de malignidade.

7. CONCLUSÕES

1. O gene supressor tumoral IRF-1 apresentou expressão significativamente menor em hiperplasias, adenomas e carcinomas de paratireóide em relação ao tecido paratireoideano normal.
2. O gene PTK7 apresentou expressão significativamente maior nos carcinomas de paratireóide em relação aos adenomas, às hiperplasias e ao tecido paratireoideano normal.
3. O gene TIMP-3 apresentou expressão significativamente menor nos carcinomas de paratireóide em relação aos adenomas.
4. O gene RhoA, apresentou expressão significativamente maior nos carcinomas de paratireóide em relação ao tecido paratireoideano normal.
5. Foram observadas correlações positivas estatisticamente significantes entre a expressão dos genes Notch-2 e IRF-1; bFGF e IRF-1; e RhoA e PTK7.
6. Foi observada correlação negativa estatisticamente significativa entre a expressão dos genes TIMP-3 e PTK7.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Bilezikian JP, Levine MA, Marcus ER. *The Parathyroids – Basic and Clinical Concepts*. Revan Press, Ltd.; New York, 1994.
- ² Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro; 1990.
- ³ Rebollo MA: *Histologia*. Ed. Itermédica S.A.I.C.I., Buenos Aires, Argentina; 1973.
- ⁴ Rebollo MA: *Histologia*. Ed. Itermédica S.A.I.C.I., Buenos Aires, Argentina; 1973.
- ⁵ Degenhardt S, Toell A, Weidemann W, Dotzenrath C, Spindler KD, Grabensee B. Point mutations of the human parathyroid calcium receptor gene are not responsible for non suppressible renal hiperparathyroidism. *Kidney Int*. 1998;53(Suppl 3): 556-61.
- ⁶ Robbins, Stanley, Cutran. *Patologia Básica*, 5ª edição, Ed Ateneu, São Paulo, 1997.
- ⁷ Overholt SM. Primary hyperparathyroidism. *Grand Rounds Archieve*. www.bcm.tmc.edu/oto/grand/12094.html, 1994.
- ⁸ Carling T. Molecular pathology of parathyroid tumors. *Trends Endocrinol Metab*. 2001; 12(Suppl 2):53-7.
- ⁹ Mochly-Rosen D. Localization of proteins kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*. 1995;268:247.
- ¹⁰ Lewin B. Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell*. 1991;64:303-12.
- ¹¹ Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily 1. A conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. 1990;348:125-33.

-
- ¹² Lefkowitz RJ. Clinical implication of basic research: G proteins in medicine. *N Eng J Med*. 1995; 332(Suppl 3):186-7.
- ¹³ Knudson AG. Retinoblastoma: a prototypic hereditary neoplasm. *Semin Oncol*. 1975; 5:57-60.
- ¹⁴ Sheaves, Jenkins, Wass. Clinical Endocrine Oncology, University Street, Carlton. Victoria, Austrália, 1998.
- ¹⁵ Basset JH, Forbes SA, Pannett AA, Lloyds SE, Christie PT, Wooding C, Harding B, Besser GM, Edwards CR, Monson JP, Sampsn J, Wass JA, Wheeler MH, Thakker RV. Characterization of mutations in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Am. J. Hum. Genet*. 1998;62(2):232-44.
- ¹⁶ Calender A. Genetic testing in multiple endocrine neoplasia and related syndromes. *Forum (Genova)*. 1998;8(Suppl 2):146-59.
- ¹⁷ Agarwal SK, Debelenko LV, Kester MB, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Skarulis MC, Heppner C, Crabtree JS, Lubensky IA, Zhuang Z, Kim YS, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Liotta LA, Spiegel AM, Burns AL, Emmert-Buck MR, Marx SJ. Analysis of recurrent germline mutations in the MEN1 gene encountered in apparently unrelated families. *Hum Mutat*. 1998;12(Suppl 2):75-82.
- ¹⁸ Chico A, Gallard L, Mato E, Mayoral C, Martin-Campos JM, Catasus L, Rodriguez-Espinosa J, Matias-Guiu X, Blanco-Vaca F, De Leiva A. A novel germline mutation in exon 5 of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene. *J. Mol. Med*. 1998;76(Suppl 12):837-39.
- ¹⁹ Poncin J, Abs R, Velkeniers B, Bonduelle M, Abramowicz M, Legros JJ, Verloes A, Meurisse M, Van Gaal L, Verellen C, Koulischer L, Beckers A. Mutation analysis of the MEN1 gene in Belgian patients with multiple endocrine neoplasia type 1 and related diseases. *Hum Mutat*. 1999;13(Suppl 1):54-60.

-
- ²⁰ Basset JH, Rashbass P, Forbes SA, Pannett AA, Thakker RV. Studies of the murine homolog of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene, men 1. *J. Bone Miner Res.* 1999;14(Suppl 1):3-10.
- ²¹ Sato K, Yamazaki K, Zhu H, Kanbe M, Iihara M, Wada Y, Tanaka R, Okamoto T, Ito Y, Obara T. Somatic mutations of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene in patients with sporadic, nonfamilial primary hyperparathyroidism. *Surgery.* 2000;127(Suppl 3):377-81.
- ²² Marx SJ, Agarwal SK, Heppner C, Kim YS, Kester MB, Goldsmith PK, Skarulis MC, Spiegel AM, Burns AL, Debelenko LV, Zhuang Z, Lubensky IA, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Guru SC, Manickam P, Crabtree JS, Collins FS, Chandrasekharappa SC. The gene for multiple endocrine neoplasia type 1: recent findings. *Bone.* 1999;25(Suppl 1):119-22.
- ²³ Bartsh D, Kopp I, Bergenfelz A, Rieder H, Munch K, Jager K, Deiss U, Schudy A, Barth P, Arnold R, Rothmund M, Simon B. MEN1 gene mutations families and their associated tumors. *Eur J Endocrinol.* 1998;139(Suppl 4):416-20.
- ²⁴ Pannett AA, Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocr. Relat. Cancer.* 1999;6(Suppl 4):449-73.
- ²⁵ Tahara H, Smith AP, Gaz RD, Zariwalla M, Xiong Y, Arnold A. Parathyroid tumor suppressor on 1p: analysis of the p18 cyclin-dependent kinase inhibitor gene as a candidate. *J. Bone Miner Res.* 1997;12(Suppl 9):1330-34.
- ²⁶ Heppner C, Kester MB, Agarwal SK, Debelenko LV, Emmert-Buck MR, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Skarulis MC, Doppman JL, Alexander RH, Kim YS, Saggar SK, Lubensky IA, Zhuang Z, Liotta LA, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ. Somatic mutations in the MEN1 gene in parathyroid tumors. *Nat Genet.* 1997;16(Suppl 4):375-78.

-
- ²⁷ Chikatsu N, Fukumoto S, Takeuchi Y, Suzawa M, Obara T, Matsumoto T, Fujita T. Cloning and characterization of two promoters for the human calcium-sensing receptor (CaSR) and changes of CaSR expression in parathyroid adenomas. *J Biol Chem*. 2000;275(Suppl 11):7553-57.
- ²⁸ Lambert D, Eaton CL, Harrison BJ. Fibroblast growth factor and their receptors in parathyroid disease. *World J Surg*. 1998;22(Suppl 6):520-25.
- ²⁹ Arnold A *et al*. Molecular cloning and chromosomal mapping of DNA rearranged with the parathyroid hormone gene in parathyroid adenoma. *J Clin Invest*. 1989; 83:2034-40.
- ³⁰ Motokura T *et al*. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature*. 1991;350:512-15.
- ³¹ Hsi ED, Zukerberg LR, Yang WY, Arnold A. Cyclin D₁/PRAD₁ expression in parathyroid adenomas: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(Suppl 5):1736-39.
- ³² Hinds P *et al*. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.* 1994;91:709-13.
- ³³ Willeke F, Hauer M, Buchcik R, Gebert JF, Hahn M, Fitze G, Mechttersheimer G, Moller P, Saeger HD, Herfarth C, Schackert HK. Multiple endocrine neoplasia type 2-associated RET proto-oncogene mutations do not contribute to the pathogenesis of sporadic parathyroid tumors. *Surgery*. 1998;124(Suppl 3):484-90.
- ³⁴ Tahara H, Smith AP, Gaz RD, Cryns VL, Arnold A. Genomic localization of novel candidate tumor suppressor gene loci in human parathyroid adenomas. *Cancer Res*. 1996;56(Suppl 3):599-605.

-
- ³⁵ Tahara H, Smith AP, Gaz RD, Zariwalla M, Xiong Y, Arnold A. Parathyroid tumor suppressor on 1p: analysis of the p18 cyclin-dependent kinase inhibitor gene as a candidate. *J Bone Miner Res.* 1997;12(Suppl 9):1330-34.
- ³⁶ Koea JB, Shaw JH. Parathyroid cancer: biology and management. *Surg Oncol.* 2003;22:516.
- ³⁷ Busaidy N, Jimenez C, Habra MA *et al.* Two decades of experience of parathyroid carcinomas. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2003;22:516.
- ³⁸ Shantz A, Castelman B. Parathyroid carcinoma. A study of 70 cases. *Cancer.* 1966;53:295-316.
- ³⁹ Gary LM, Herman EG, Adel EN, Rena VS. Parathyroid carcinoma: evaluation and interdisciplinary management. *Cancer*, 2004;100:900-5.
- ⁴⁰ Bondeson L, Sandelin K, Grimelius L. Histopathological variables and DNA cytometry in parathyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1993;17: 820-29.
- ⁴¹ Cryns VL, Thor A, Xu HJ. Loss of the retinoblastoma tumor-suppressor gene in parathyroid carcinoma. *N Engl J Med.* 1994;330:757-61.
- ⁴² Szabo J, Heath B, Hill VM, Jackson CE, Zarbo RJ, Mallette LE, Chew SL, Besser GM, Thakker RV, Huff V, Leppert MF, Heath H. Hereditary hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome; the endocrine tumor gene HRPT2 maps to chromosome 1 q21-q31. *Am J Hum Genet.* 1995; 56:944-50.
- ⁴³ Carpten JD, Robbins CM, Villablanca A. HRPT2, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *Nat. Genet.* 2002;32:676-80.
- ⁴⁴ Shattuck TM, Välimäki S, Obara T, Gaz RD, Clark OH, Shoback D, Wierman ME, Tojo K, Robbins CM, Carpten JD, Farnebo LO, Larsson C, Arnold A. Somatic and

germ-line mutations of the HRPT2 gene in sporadic parathyroid carcinoma. *New Eng J Med*. 2003;349:1722-9.

⁴⁵ Howell VM, Haven CJ, Kahnoski K. HRPT2 mutations are associated with malignancy in sporadic parathyroid tumors. *J Med Genet*. 2003;40:657-63.

⁴⁶ His ED, Zukerberg LR, Yang WI, Arnold A. Comparison of methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR. *Diagn Mol Pathol*. 1996;5:220-24.

⁴⁷ Lian-Xin L, Zhi-Hua L, Hong-Chi C, Xin Q, Wei-Hui Z, Lin-Feng W, An-Long Z, Xiu-Qun W, Min W. Profiling of differentially expressed genes in human gastric carcinoma by cDNA expression array. *World Journal of Gastroenterology*. 2002; 8(Suppl 4):580-85.

⁴⁸ Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Capelli P, Blaveri E, Baron A, Terris B, Jones M, Tyson K, Bassi C, Scarpa A, Lemoine NR. Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene*. 2001;20:7437-46.

⁴⁹ Goldemberg D, Ayesh S, Schneider T, Pappo O, Jurim O, Eid A, Fellig Y, Dadon T, Ariel I, de Groot N, Hochberg A, Galun E. Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays. *Molecular Carcinogenesis*. 2002;33(Suppl 2):113-24.

⁵⁰ Storey, J.D. and R. Tibshirani, Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100 (16): p. 9440-5

⁵¹ Doniger, S.W., Salomonis, N., Dahlquist, K.D., Vranizan, K., Lawlor, S.C., and Conklin, B.R. 2003. MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data. *Genome Biology* 4:R7.

-
- ⁵² Kroll T, Odyvanova L, Clement JH, Platzer C, Naumann A, Marr N, Hoffken K, Wolfi S. Molecular characterization of breast cancer cell lines by expression profiling. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2002;128(Suppl 3):125-34.
- ⁵³ Schachter PP, Ayes S, Schneider T, Laster M, Czerniak A, Hochberg A. Expression of kinase genes in primary hyperparathyroidism: adenoma versus hyperplastic parathyroid tissue. *Surgery*. 2002;132(Suppl 6):1094-98.
- ⁵⁴ Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:623-55.
- ⁵⁵ Taniguchi T, Tanaka N, Taki S. Regulation of the interferon system, immune response and oncogenesis by the transcription factor interferon regulatory factor-1. *Eur Cytokine Netw*. 1998;9(3):43-8.
- ⁵⁶ Doherty GM, Boucher L, Sorenson K, Lowney J. Interferon regulatory factor expression in human breast cancer. *Ann Surg*. 2001;233(5):623-9.
- ⁵⁷ A.E. Karnoub, M. Symons, S.L. Campbell, C.J. Der, Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity, *Breast Cancer Res. Treat.* 84 (2004) 61– 71.
- ⁵⁸ G. Fritz, B. Kaina, K. Aktories, The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 25172–25177.
- ⁵⁹ Maekawa M.; Ishizaki T.; Boku S.; Watanabe N.; Fujita A.; Iwamatsu A.; Obinata T.; Ohashi K.; Mizuno K.; Narumiya S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*. 1999;285:895-8.
- ⁶⁰ Cannizzaro LA, Madaule P, Hecht F, Axel R, Croce CM, Huebner K. Chromosome localization of human ARH genes, a ras related gene family, *Genomics*. 1990; 6:197– 203.
- ⁶¹ Ridley AJ. Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;84:13–19.

-
- ⁶² Wu M, Wu ZF, Kumar-Sinha C, Chinnaiyan A, Merajver SD. RhoC induces differential expression of genes involved in invasion and metastasis in MCF10A breast cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;84:3–12.
- ⁶³ Sahai E, Marshall CJ. ROCK and Dia have opposing effects on adherence junctions downstream of Rho. *Nat. Cell Biol.* 2002;4:408–15.
- ⁶⁴ Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4:446–56.
- ⁶⁵ Allal C, Pradines A, Hamilton AD, Sebti SM, Favre G, Farnesylated RhoB prevents cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption caused by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298. *Cell Cycle.* 2002;1:430–7.
- ⁶⁶ Prendergast GC. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis, *Nat Rev Cancer* 2001;1:162–8.
- ⁶⁷ Teramoto H, Malek RL, Behbahani B, Castellone MD, Lee NH, Gutkind JS. Identification of H-Ras, RhoA, Rac1 and Cdc42 responsive genes. *Oncogene.* 2003;22(Suppl 17):2689-97.
- ⁶⁸ Zheng CF, Guan KL. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J.* 1994;13:1123-31.
- ⁶⁹ Howe LR, Leever SJ, Gomez N, Nakielnny S, Cohen P, Marshall CJ. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase Raf. *Cell.* 1992;71:335-42.
- ⁷⁰ Shields JM, Pruitt K, Mc Fall A, Shaub A, Der CJ. Understanding Ras: "it ain't over 'til it's over". *Trends Cell Biol.* 2000;10:147-54.
- ⁷¹ Bourne HR, Sanders DA, Mc Cornick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 1991;349(Suppl 6305):117-27.

-
- ⁷² Haueber AO, Evan GI. Traps to catch unwary oncogenes. *Trends Genet.* 1998;14(Suppl 9):364-7.
- ⁷³ Feig LA, Buchsbaum RJ. Cell signaling: life or death decisions of ras proteins. *Curr Biol.* 2002;12(Suppl 7):259-61.
- ⁷⁴ Erhardt P, Schremser EJ, Cooper GM. B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Cell Biol.* 1999;19:5308-15.
- ⁷⁵ Woessner JF Jr. That impish TIMP: the tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *J Clin Invest.* 2001;108:799-800.
- ⁷⁶ Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274:21491-4.
- ⁷⁷ Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta.* 2000;1477:267-83.
- ⁷⁸ Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological function. *Eur J Cell Biol.* 1997;74:111-22.
- ⁷⁹ Amour A, Knight CG, Webster A, Slocombe PM, Murphy G. The *in vitro* activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett.* 2000;473:275-9.
- ⁸⁰ Loechel F, Fox JN, Murphy G, Albrechtsen R, Wewer UM. ADAM-12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;278(Suppl 3):511-5.

-
- ⁸¹ Ahonen M, Baker AH, Kahari VM. Adenovirus-mediated gene delivery of TIMP-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res.* 1998;58:2310-5.
- ⁸² Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Divergent effects of TIMP-1, 2 or 3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation and death *in vitro*: TIMP-3 provides apoptosis. *J Clin Invest.* 1998;101:1478-87.
- ⁸³ Smith MR, Kung H, Durum SK, Colbum MH, Sun Y. TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine.* 1997;9:770-80.
- ⁸⁴ Ozen O, Krebs B, Hemmlein B, Pekrun A, Kretzschmar H, Herms A. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in medulloblastomas and their prognostic relevance. *Clin Cancer Res.* 2004;10(Suppl 14):4746-53.
- ⁸⁵ Wild A, Ramaswamy A, Langer P, Celik I, Fendrich V, Chaloupka B, Bartich DK. Frequent methylation-associated silencing of the TIMP-3 gene in pancreatic endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(Suppl 3):1367-73.
- ⁸⁶ Ohta S, Lai EW, Pang AL, Browvers FM, Chan WY, Eisenhofer G, de Krijger R, Ksinantova L, Breza J, Blazicek P, Kvetnensky R, Wesley RA, Pacak K. Downregulation of metastasis suppressor gene in malignant pheochromocytoma. *Int J Cancer.* 2004 [Epub ahead of print].
- ⁸⁷ Kageyama R, Nakanishi S. Helix-loop factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev.* 1997;7:659-665.
- ⁸⁸ Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999;284:770-776.

-
- ⁸⁹ Ruiz-Hidalgo MJ, Garces C, Laborda J. Notch-1 expression levels in 3T3-L1 cells influence ras signaling and transforming by oncogenic ras. *Int J Oncol.* 1999;14(Suppl 4):777-83.
- ⁹⁰ Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I, Ni X, Wang Y, Ball D, Brat DJ, Perry A, Eberhart CG. Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res.* 2004;64(21):7787-93.
- ⁹¹ Callahan R, Egan SE. Notch signaling in mammary development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2004;9(2):145-63.
- ⁹² Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science.* 1994;265:966-70.
- ⁹³ Chen CH, Poucher SM, Lu J, Henry PD. Fibroblast growth factor 2: from laboratory evidence to clinical application. *Curr Vasc Pharmacol.* 2004 Jan;2(1):33-43.
- ⁹⁴ Zhang Y, Shang H, Sun LG, Liu N, Yu HY. Expression of aFGF and bFGF in ovarian cancer and their effect on ovarian cancer cell proliferation *Ai Zheng* 2003 Nov;22(11):1162-5.
- ⁹⁵ Gazzaniga P, Gandini O, Gradilone A, Silvestri I, Giuliani L, Magnanti M, Gallucci M, Sacconi G, Frati L, Agliano AM. Detection of basic fibroblast growth factor mRNA in urinary bladder cancer: correlation with local relapses. *Int J Oncol.* 1999 Jun;14(6):1123-7.
- ⁹⁶ Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG, Uchida E, Onda M, Kobrin MS, Korc M. Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res.* 1993 Nov 1;53(21):5289-96.

-
- ⁹⁷ Ueki T, Koji T, Tamiya S, Nakane PK, Tsuneyoshi M. Expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor in advanced gastric carcinoma. *J Pathol.* 1995 Dec;177(4):353-61.
- ⁹⁸ Takahashi JA, Fukumoto M, Igarashi K, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M. Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human gliomas. *J Neurosurg.* 1992 May;76(5):792-8.
- ⁹⁹ Suzui H, Takahashi JA, Fukumoto M, Hashimoto N, Itoh N, Hatanaka M, Kikuchi H. Immunohistochemical study for basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor I in pituitary adenomas. *Neurosci Lett.* 1994 Apr 25;171(1-2):192-6.
- ¹⁰⁰ Janot F, el-Naggar AK, Morrison RS, Liu TJ, Taylor DL, Clayman GL. Expression of basic fibroblast growth factor in squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with degree of histologic differentiation. *Int J Cancer.* 1995 Apr 21;64(2):117-23.
- ¹⁰¹ Vesely D, Astl J, Matucha P, Sterzl I, Betka J. Serum levels of angiogenic growth factors in patients with thyroid gland tumors and parathyroid adenoma. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003;24(Suppl 6):417-9.
- ¹⁰² Friedman E, Bale AE, Marx SJ, Norton JA, Arnold A, Tu T, Aurbach GD, Spiegel AM. Genetic abnormalities in sporadic parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71(2):293-7.
- ¹⁰³ Baserga R. The IGF-IR in Cancer Research. *Experimental Cell Research.* 1999;253:1-6.
- ¹⁰⁴ Sporn MB, Todaro GJ. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med.* 1980;303:8.

-
- ¹⁰⁵ Kaleko M, Rutter WJ, Miller AD. Overexpression of the human insulin-like growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. *Mol Cell Biol.* 1990;10:464.
- ¹⁰⁶ Yashiro T, Ohba Y, Murakami H. Expression of insulin-like growth factor receptors in primary human thyroid neoplasms. *Acta Endocrinol.* 1989;121:112.
- ¹⁰⁷ Hartshorn MA, Scott CD, Baxter RC. Immunofluorescent localisation of type II insulin-like growth factor receptor in rat liver and hepatoma cells. *J Endocrinol.* 1989;121:221.
- ¹⁰⁸ Talavera F, Reynolds RK, Roberts JA, Menon KMJ. Insulin-like growth factor I receptors in normal and neoplastic human endometrium. *Cancer Res.* 1990;50:3019.
- ¹⁰⁹ Barasio GD, Markus A, Hermann R, Ghezzi C, Sampietro A, Wittinghofer A, Silani U. Ras p 21 protein promotes survival and differentiation of human embryonic neural crest-derived cells. *Neuroscience.* 1996;76:1121-7.
- ¹¹⁰ Neet K, Hunter T. Vertebrate non-receptor protein tyrosine kinase families. *Genes Cells.* 1996;74:477-84.
- ¹¹¹ Zhou S, Canthey LC. Recognition and specificity in protein tyrosine-kinase mediated signaling. *Trends Biochem Sci.* 1995;20:470-5.
- ¹¹² Easty DJ, Bennett DC. Protein tyrosine kinases in malignant melanoma. *Melanoma research.* 2000;10:401-11.
- ¹¹³ Schlessinger J, Ulrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinase. *Neuron.* 1992;9:383-91.
- ¹¹⁴ Sudol M. From Src homology domains to other signaling modules: proposal of the protein recognition code. *Oncogene.* 1998;17:1469-74.

-
- ¹¹⁵ Wilks AF. Protein tyrosine kinase growth factor receptors and their ligands in development, differentiation and cancer. *Adv Cancer Res.* 1993;60:43-73.
- ¹¹⁶ Van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein tyrosine kinase and their signal transduction pathways. *Am Rev Cell Biol.* 1994;10:257-337.
- ¹¹⁷ Kroiher M, Miller MA, Steele RE. Deceiving appearances: signaling by “dead” and “fractured” receptor protein tyrosine kinases. *Bio Essays.* 2001;23:69-76.
- ¹¹⁸ Lee ST, Strunk KM, Spritz RA. A survey of protein tyrosine kinase mRNAs expressed in normal human melanocytes. *Oncogene.* 1993;8:3403-10.
- ¹¹⁹ Mossie K, Jallal B, Alxs F, Sures I, Plavman GD, Ulrich A. Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family. *Oncogene.* 1995;11:2179-84.
- ¹²⁰ Pulido D, Campuzano S, Koda T, Modolell J, Barbacid M. Dtrk, a Drosophila gene related to the trk family of neurotrophin receptors, encodes a novel class of neural cells adhesion molecule. *EMBO J.* 1992;11:391-404.
- ¹²¹ Park Z, Lee HS, Lee ST. Characterization of the human full-length PTK7 cDNA encoding a receptor protein tyrosin kinase like molecule closely related to chick KLG. *J Biochem.* 1996;119:235-9.
- ¹²² Park SK, Lee HS, Lee ST. Characterization of the human full-length PTK7 cDNA encoding a receptor protein tyrosine kinase-like molecule closely related to chick KLG. *J Biochem.* 1996;119:235-9.
- ¹²³ Van Der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Ver Cell Bio.* 1994;10:251-337.

-
- ¹²⁴ Piao Z, Lee KS, Kim H, Perucho M, Malkhosyan S. Identification of novel deletion regions on chromosome arms 2q and 6p in breast carcinomas by aneuploidy analysis. *Genes Chromosome Cancer*. 2001;30:113-22.
- ¹²⁵ Baudrier-Regnier A, Bodenant C, Proust F, Delangre T, Hemet J, Laquirriere A. An isochromosome 6p in a primary meningeal malignant melanoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2000; 119:80-2.
- ¹²⁶ Lu X, Borchers AGM, Jolicoeur C, Rayburn H, Baker JC, Tessier-Lavigne M. PTK7/CCK4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature*. 2004;430:93-8.
- ¹²⁷ Jung JW, Shin Ws, Song J, Lee ST. Cloning and characterization of the full-length mouse PTK7 cDNA encoding a defective receptor protein tyrosine kinase. *Gene*. 2004;328:75-84.
- ¹²⁸ Easty DJ, Mitchell PJ, Patel K, Florenes VA, Spritz RA, Bennett DC. Loss of expression of receptor tyrosine kinase family genes PTK7 and SEK in metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 1997;71:1061-5.
- ¹²⁹ Mossie K, Jallal B, Alves F, Sures I, Plowman GD, Ullrich A. Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family. *Oncogene*. 1995;11:2179-84.
- ¹³⁰ Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(Suppl 1):380-93.
- ¹³¹ Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2: International RET mutation Consortium analysis. *JAMA*. 1996;276:1575-9.
- ¹³² Donis-Keller H. The RET proto-oncogene and cancer. *J Intern Med*. 1995;238 (Suppl 4):319-25.

-
- ¹³³ Bongarzone I, Butti Mg, Coronelli S, Borrello Mg, Santoro M, Mondellini P, Pilotti S, Fusco A, Della Porta G, Pierotti Ma. Frequent activation of ret protooncogene by fusion with a new activating gene in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 1994;54(Suppl 11):2979-85.
- ¹³⁴ Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(Suppl 1):380-93.
- ¹³⁵ Pausova Z, Soliman E, Amizuka N, Janicic N, Konrad Em, Arnold A, Goltzman D, Hendy Gn. Role of the RET proto-oncogene in sporadic hyperparathyroidism and in hyperparathyroidism of Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(Suppl 7):2711-18.
- ¹³⁶ Kimura T, Yoshimoto K, Tanaka C, Ohkura T, Iwahana H, Miyauchi A, Sano T, Itakura M. Obvious mRNA and protein expression but absence of mutations of the RET proto-oncogene in parathyroid tumors. *Eur J Endocrinol.* 1996;134:314-19.
- ¹³⁷ Williams G.H., Rooney S, Carss A, Cummins G, Thomas Ga, Williams Ed. Analysis of the RET proto-oncogene in sporadic parathyroid adenomas. *J Pathol.* 1996;180:138-41.
- ¹³⁸ Padberg BC, Schroder S, Jochum W, Kastendieck H, Roth J, Heitz PU, Komminoth P. Absence of RET proto-oncogene point mutations in sporadic hyperplastic and neoplastic lesions of the parathyroid gland. *Am J Pathol.* 1995 Dec;47(Suppl 6):1600-7.
- ¹³⁹ Uchino S, Noguchi S, Nagatomo M, Sato M, Yamashita H, Yamashita H, Watanabe S, Murakami T, Toda M, Wakiya S, Adachi M. Absence of somatic RET gene mutation in sporadic parathyroid tumors and hyperplasia secondary to uremia, and absence of somatic Men1 gene mutation in MEN2A-associated hyperplasia. *Biomed Pharmacother.* 2000;54(1):100-3.