

ANA CAROLINA TRINDADE GUILHEN

**AVALIAÇÃO DA UTILIDADE CLÍNICA
DOS GENES ATM E PTEN EM CÂNCER
BEM DIFERENCIADO DA TIREÓIDE**

CAMPINAS

Unicamp

2009

ANA CAROLINA TRINDADE GUILHEN

**AVALIAÇÃO DA UTILIDADE CLÍNICA
DOS GENES ATM E PTEN EM CÂNCER
BEM DIFERENCIADO DA TIREÓIDE**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Clínica Médica.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. LAURA STERIAN WARD

CAMPINAS

Unicamp

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G945a Guilhen, Ana Carolina Trindade
Avaliação da utilidade clínica dos genes ATM e PTEN em câncer bem diferenciado da tireóide / Ana Carolina Trindade Guilhen. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Laura Sterian Ward
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tireóide - tumores. 2. Câncer. 3. Dano ao DNA. I. Ward, Laura Sterian. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Investigation of clinical utility of ATM and PTEN genes in the differentiated thyroid cancer

Keywords: • Thyroid
• Thyroid, tumors
• Neoplasm
• DNA damage

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

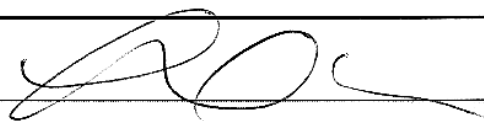
Profa. Dra. Laura Sterian Ward
Profa. Dra. Janete Maria Cerutti
Prof. Dr. Fernando Augusto Soares
Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli
Prof. Dr. José Barreto Carvalheira Campello

Data da defesa: 30-09-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado

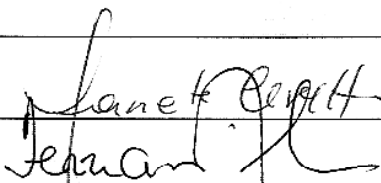
Ana Carolina Trindade Guilhen

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Laura Sterian Ward

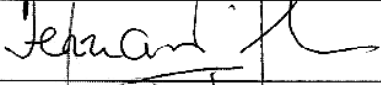


Membros:

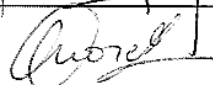
1. Prof^ª. Dr^ª. Janete Maria Cerutti



2. Prof. Dr. Fernando Augusto Soares



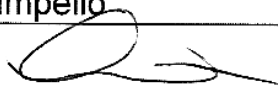
3. Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Vianna Maurer Morelli



4. Prof. Dr. José Barreto Carvalheira Campello



5. Prof^ª. Dr^ª. Laura Sterian Ward



Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/09/2009

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
por me tornarem a pessoa forte e determinada que sou hoje.*

*A minha vó,
pelo carinho e palavras de apoio.*

*Aos meus irmãos,
Willy e Regina por sempre acreditarem no meu potencial
e pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Laura S Ward, pelas oportunidades oferecidas, incentivo, sabedoria e dedicação.

Ao patologista Dr. José Vassalo pelos ensinamentos, ajuda e apoio.

Ao Dr. Fernando Soares, Dr. Alfio Tincani e Dra. Lígia Assumpção, pelo material fornecido e acesso aos dados dos pacientes, sem eles não haveria trabalho.

As minhas companheiras de bancada e de muito trabalho árduo Elaine, Natássia e Janaína, que me ajudaram muito e pela troca de experiências e conhecimentos. Obrigada de coração! Todos os momentos felizes e difíceis serão lembrados pra sempre.

Ao Paulinho pelo apoio na imunoistoquímica, obrigada pela atenção e ajuda!

A Joyce que me ensinou a ler prontuários dos pacientes além de ser uma companhia muito divertida nas viagens! Te adoro!

A Marjory e o Lucas que também me ajudaram e que eu admiro pela força de vontade e dedicação. Obrigada pelas risadas e momentos de descontração.

A todas as estagiárias que em sua fase de aprendizado me ajudaram de alguma forma: Mariana, Raquel, Aline, Mariely, Catarina e Éder. Ao Tiagão pelo apoio no DHPLC.

Aos meus melhores amigos que me ajudaram emocionalmente nesta conquista: Fabio, Mariana Nicolau, Débora, Maurício (Mão), Gerson, Luiza, Alexandre (Gera), Aninha, Mariana Magri, Fernanda Prandi, Bianca e Marlene. AMO VOCÊS DEMAIS!!!

Aos meus tios César e Mércia que sempre acreditaram no meu potencial e pelas palavras de apoio. Vocês foram incríveis, amo vocês!

A meus irmãos Willy e Regina que ajudaram e ainda ajudam a caçulinha aqui nas conquistas sempre desejando o meu melhor. Obrigado por vocês existirem na minha vida!

Aos meus pais pelo incentivo nas viagens ao congresso, obrigada por toda ajuda, espero recompensá-los.

Aos vizinhos de laboratório que diversas vezes eu procurei ajuda e sempre foram solícitos e pacientes na minha luta com western blot: Marciane, Alexandra, Karina, Jose, Fabio, Vinícios, Erika e André. Valeu galera pelo esforço e pelo tempo, tenho consciência do tamanho do problema que eu trouxe pra vocês....

A Cleide e Helymar, os estaticistas que diversas vezes me esclareceram duvidas, obrigado!

As vizinhas Helen, Viviane e Luiza pelos momentos agradáveis na copinha e pelo apoio.

Obrigado Gemocão por tudo!!

PROVÉRBIOS

*Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã,
portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar,
fazer e principalmente viver.*

(Dalai Lama)

*Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente,
mas o que melhor se adapta às mudanças*

(Charles Darwin)

*O homem não se entrega aos anjos, nem se rende inteiramente à morte,
senão pela fraqueza de sua débil vontade.*

(Edgar Allan Poe)

Para investigar a utilidade clínica de dois genes supressores tumorais envolvidos no controle da proliferação e sobrevivência celular, nós estudamos por imunohistoquímica as proteínas ATM e PTEN em 272 pacientes diagnosticados carcinoma diferenciado da tireóide (142 carcinomas papilíferos do tipo clássico, 72 carcinomas papilíferos variante folicular, 17 carcinomas papilíferos de células altas e 41 carcinomas foliculares); 106 amostras de tecido de pacientes diagnosticados com doenças tiroidianas benignas (55 adenomas foliculares e 51 com bócio), 18 tecidos de tireóide normal extraídos de lobo contra-lateral de indivíduos operados por adenoma folicular.

A expressão quantitativa de *ATM* foi avaliada por Real-Time PCR em 87 CP. Ainda, analisamos o perfil genotípico para três polimorfismos de *ATM* (D1853N, S707P e S49C) em 199 pacientes (164 carcinomas papilíferos e 35 carcinomas foliculares) e 219 indivíduos controles.

Os pacientes foram seguidos por $53,8 \pm 41$ meses utilizando-se um protocolo padrão. 179 pacientes foram classificados como livre de doença e 48 pacientes tiveram má evolução (recidivas e 12 mortes).

A análise da regressão logística múltipla ajustada para sexo e faixa etária mostrou que a expressão da proteína ATM foi mais freqüente entre os pacientes que apresentavam tumores menos agressivos (81%) e que evoluíram livres de doença (63%) ($p=0.016$; $p=0.0276$ respectivamente). Maior incidência de casos que expressavam a proteína PTEN também foi observada em pacientes que não tiveram metástase na evolução (75%) ($p= 0.0437$).

O alelo heterozigoto para o polimorfismo D1853N de *ATM* foi mais prevalente entre os controles (64%) do que nos indivíduos com câncer (36%) ($p=0.0364$).

Estes dados indicam que ATM e PTEN podem ser úteis na identificação de agressividade e na classificação de prognóstico do CDT.

In order to investigate the clinical utility of two tumor-suppressing genes involved in the control of cell proliferation and survival, we've studied proteins ATM and PTEN through immunohistochemistry in 272 differentiated thyroid carcinoma diagnosed patients (142 classical papillary thyroid carcinomas type, 72 papillary thyroid carcinomas follicular variant, 17 papillary thyroid carcinomas tall cells variant and 41 follicular carcinomas), 106 tissue samples from patients diagnosed with benign thyroid diseases (55 follicular thyroid adenomas and 51 with goiter), 18 normal thyroid tissue samples extracted from the counter lateral lobe of individuals operated for follicular thyroid adenomas.

The quantitative expression of ATM gene was available for Real-Time PCR in 87 papillary carcinomas. In order to analyze the genotypic profile, we've also studied three *ATM* polymorphisms (D1853N, S707P e S49C) in 199 patients (164 papillary carcinomas and 35 follicular carcinomas) and 219 control individuals.

Patients were accompanied for $53,8 \pm 41$ months, using a standard protocol. 179 patients were tagged as disease-free and 48 patients had bad outcome (12 deaths).

The analysis of multiple logistic regression adjusted for gender and age has showed that the *ATM* protein expression was more frequent among patients that didn't have metastasis when diagnosed (81%) and that were free of disease (63%) ($p=0.016$; $p=0.0276$ respectively). The major incidence of cases who expression PTEN protein, also was observed in patients that didn't have metastasis during follow-up (75%) ($p= 0.0437$).

The heterozygous alleles for D1853N polymorphism was more prevailing among the controls (64%) than in individuals with cancer (36%) ($p=0.0364$).

Nevertheless these results demonstrated that ATM and PTEN protein expression can be useful in identifying patients with aggressiveness and the classification of prognosis in differentiated thyroid carcinoma.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATM	Ataxia Telangiectasia
ATR	ATM-Rad3-related
CDT	câncer diferenciado da tireóide
CF	carcinoma folicular
CP	carcinoma papilífero
CPC	carcinoma papilífero clássico
CPVA	carcinoma papilífero de células altas
CPVF	carcinoma papilífero variante folicular
DGA	fosfolípido diacilglicerol
DNA-PK	DNA dependente de proteína quinase
HR	recombinação homóloga
MRN	complexo MRE11-RAD50-NBS1
NBS	Nijmegen breakage
NHEJ	recombinação não homóloga
PI3K	fosfatidilinositol-3 quinases
PIKKS	fosfatidilinositol-3-OH-quinase
PIP3	fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato
PKC	proteínas quinases C
PTEN	phosphate and tensin homolog deleted on chromosome 10
RTK	transmembrana tirosina kinase
T3	triiodotironina
T4	tiroxina
UV	radiação ultravioleta

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Casuística usada no estudo do gene <i>ATM</i>	40
Tabela 2- Casuística usada no estudo da proteína PTEN.....	41
Tabela 3- Classificação da imunocoloração.....	44
Tabela 4- Score de análise final.....	45
Tabela 5- Seqüência de primers de GAPDH e <i>ATM</i>	46
Tabela 6- Seqüência de primers para os polimorfismos do gene <i>ATM</i>	47
Tabela 7- Condições de temperatura para a reação da PCR dos polimorfismos do gene <i>ATM</i>	48
Tabela 8- Enzimas utilizadas na reação de PCR-RFLP dos respectivos polimorfismos do gene <i>ATM</i>	48
Tabela 9- Análise descritiva dos dados dos pacientes e controles.....	51
Tabela 10- Análise descritiva dos dados dos pacientes segundo AP.....	52
Tabela 11- Análise descritiva dos resultados de imunoistoquímica mostrando a porcentagem de coloração para a proteína <i>ATM</i>	54
Tabela 12- Análise descritiva dos resultados de imunoistoquímica mostrando a intensidade de coloração para a proteína <i>ATM</i>	55
Tabela 13- Análise entre o score de malignos versus benignos para a proteína <i>ATM</i>	57
Tabela 14- Análise entre o score de expressão da proteína <i>ATM</i> dos CP versus CF.....	58
Tabela 15- Análise entre o score de expressão da proteína <i>ATM</i> dos CPC versus CP variantes.....	58

Tabela 16-	Análise descritiva da porcentagem de coloração das células para a proteína PTEN.....	66
Tabela 17-	Análise descritiva da intensidade de coloração para a proteína PTEN.....	67
Tabela 18-	Expressão protéica de PTEN segundo o score, entre malignos versus benignos.....	70
Tabela 19-	Análise do score entre grupos de CP versus CF para a proteína PTEN.....	70
Tabela 20-	Análise do score entre grupos de CPC versus CP variantes para a proteína PTEN.....	71
Tabela 21-	Análise da expressão relativa de mRNA entre os diferentes grupos de carcinoma papilífero para o gene ATM.....	75
Tabela 22-	Análise do polimorfismo D1853N entre os grupos controles e câncer.....	77
Tabela 23-	Análise do polimorfismo S707P entre os grupos controles e câncer.....	78
Tabela 24-	Análise do polimorfismo S49C entre os grupos controles e câncer.....	79

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- <i>ATM</i> possui um papel central na ativação responsável pela checagem do ciclo celular em resposta a quebra de dupla fita.....	23
Figura 2- Esquema representativo dos mecanismos de reparo do DNA.....	25
Figura 3- Esquema representativo da proteína <i>ATM</i>	28
Figura 4- Representação simplificada da via <i>PI3K/AKT</i>	30
Figura 5- Esquema representativo da regulação de <i>PTEN</i> na via <i>PI3K/AKT</i>	32
Figura 6- Estrutura representativa da proteína <i>PTEN</i>	33
Figura 7- Atividade catalítica da proteína <i>PTEN</i>	34
Figura 8- Curvas de expressão dos genes <i>ATM</i> e <i>GAPDH</i>	46
Figura 9- Expressão nuclear da proteína <i>ATM</i>	53
Figura 10- Curva de Kaplan-Meier para a probabilidade livre de doença considerando-se a expressão de e <i>ATM</i>	63
Figura 11- Análise do total (score) da expressão de <i>ATM</i> pelo gráfico de Box plot em relação à dosagem acumulada de radiodo.....	64
Figura 12- Expressão nuclear da proteína <i>PTEN</i>	65
Figura 13- Análise da expressão relativa dos tecidos normais e carcinoma papilífero da tireóide para o gene <i>ATM</i>	74
Figura 14- Análise da expressão de todos os casos de mRNA de <i>ATM</i> em tecido normal e CPC.....	75
Figura 15- Gel de poliacrilamida 12% referente à variante <i>D1853N</i>	76
Figura 16- Gel de agarose 2% referente à variante <i>S707P</i>	77
Figura 17- Gel de poliacrilamida 12% referente à variante <i>S49C</i>	78

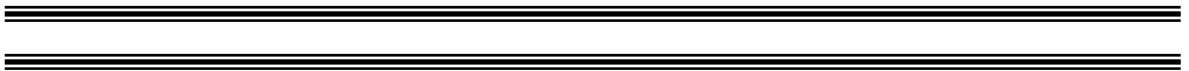
LISTA DE GRÁFICOS

	PÁG.
Gráfico 1- Análise do score de expressão dos tecidos benignos e tecido normal para a proteína ATM.....	56
Gráfico 2- Análise do score de expressão dos tecidos malignos para a proteína ATM.....	57
Gráfico 3- Análise descritiva do score dos pacientes segundo o estadiamento para a proteína ATM.....	59
Gráfico 4- Análise descritiva do score dos pacientes com metástase ao diagnóstico para a proteína ATM.....	60
Gráfico 5- Análise descritiva do score dos pacientes com metástase durante a evolução para a proteína ATM.....	61
Gráfico 6- Análise descritiva do score dos pacientes segundo a conclusão clínica para a proteína ATM.....	62
Gráfico 7- Análise do score da expressão da proteína PTEN em relação aos tecidos benignos e normais.....	68
Gráfico 8- Análise descritiva do score de expressão nos CDTs para a proteína PTEN.....	69
Gráfico 9- Análise descritiva do score de expressão segundo o estadiamento dos pacientes para a proteína PTEN.....	71
Gráfico 10- Análise descritiva do score de expressão referente à metástase ao diagnóstico dos pacientes com CDTs para a proteína PTEN.	72
Gráfico 11- Análise descritiva do score de expressão para a proteína PTEN referente a pacientes que tiveram ou não metástase durante a evolução.....	73
Gráfico 12- Análise do score segundo a conclusão clínica dos pacientes (livre de doença versus má evolução) para a proteína PTEN.....	73

	PÁG.
RESUMO	<i>viii</i>
ABSTRACT	<i>ix</i>
1- INTRODUÇÃO	17
1.1- Câncer de Tireóide versus Nódulo de Tireóide	18
1.2- O Carcinoma Diferenciado da Tiróide	19
1.2.1- Fatores Clínicos e Patológicos de Prognóstico.....	20
1.3- O Gene <i>ATM</i>	21
1.4- O Gene <i>PI3KCA</i>	29
1.5- O Gene <i>PTEN</i>	31
2- OBJETIVOS	36
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS	38
3.1- Casuística	39
3.2- Métodos	43
3.2.1- Imunoistoquímica.....	43
3.2.2- Real Time PCR.....	45
3.2.3- PCR e RFLP.....	47
3.3- Análise Estatística	49
4- RESULTADOS	50
4.1- Resultados de IHQ	51
4.2- Resultados de Real-Time PCR	74
4.3- Resultados dos polimorfismos de <i>ATM</i>	76

5- DISCUSSÃO.....	80
5- CONCLUSÃO.....	85
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8- ANEXOS.....	98

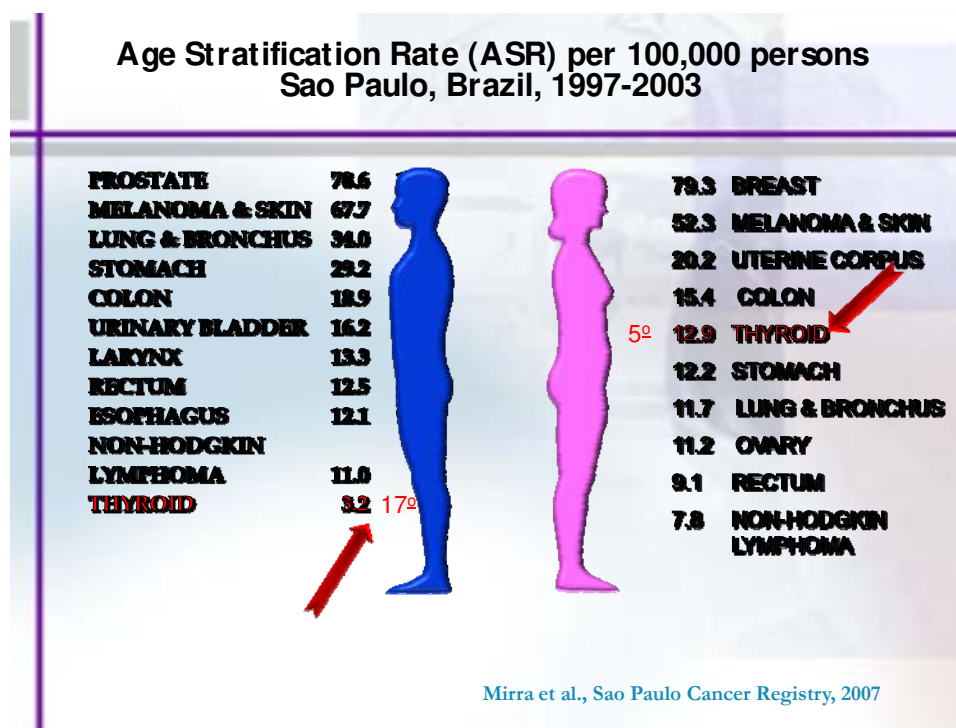
1- INTRODUÇÃO



1.1- Câncer de Tireóide versus Nódulo de Tireóide

A tireóide é uma pequena glândula situada na garganta, abaixo da laringe e é responsável pela produção de dois hormônios: tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), que são fundamentais para a manutenção do equilíbrio metabólico do organismo.

O câncer diferenciado de tireóide (CDT) é responsável por cerca de 3.2/100.000 de habitantes no Brasil, mas sua prevalência apresenta grande variação geográfica. No Japão atinge apenas 1.4/100.000 habitantes e no Kuwait relata-se que acomete 10,5% das mulheres (Costa *et al* 2001).



Embora o câncer seja relativamente raro, nódulos da tireóide são um problema de saúde pública. Estima-se que 10% da população venha a desenvolver um nódulo palpável durante a vida (Ward *et al*, 2000; Costa *et al*, 2001). Considerando-se a presença de áreas de carência de iodo, onde a prevalência de bócio pode atingir mais da metade da população local, estima-se que tenhamos no Brasil uma população de cerca de 10 milhões de portadores de nódulos tireoidianos (Tomimori *et al*, 1995; Ward, 2000). No entanto, apenas uma minoria destes nódulos será maligna. Assim, a identificação correta dos nódulos que merecem investigação laboratorial mais completa e/ou cirurgia, é fundamental

para o estabelecimento de estratégias que representem a melhor relação de custo-benefício não apenas para o paciente, mas também para o sistema de saúde do nosso país onde a alocação de recursos deve ser muito criteriosa.

1.2- O Carcinoma Diferenciado da Tiróide (CDT)

A maior parte dos tumores que se desenvolvem a partir da célula folicular é de tumores bem diferenciados, tão bem diferenciados que geralmente mantêm sua capacidade de captar iodo e de responder a estímulos fisiológicos como o TSH. Seu prognóstico é relativamente muito bom, se bem conduzidos, cerca de 95% dos pacientes com carcinomas papilíferos (CP) e 70 a 85% dos carcinomas foliculares (CF) têm uma sobrevida comparável com a da população normal, sem seqüelas ou grande alteração da sua qualidade de vida (Ward, 2007).

Entretanto, de 5 a 30% dos pacientes evoluem com recorrência e morrem devido ao câncer num período de 20 anos (Haugen, 1999). Na busca de métodos de identificação desses pacientes tem-se trabalhado intensamente em busca de parâmetros que possam ao diagnóstico, indicar uma abordagem cirúrgica mais ou menos agressiva e que permitam estabelecer risco maior ou menor de recorrência ou recidiva para cada indivíduo, o que implicaria em maior atenção e rigor no seguimento de alguns pacientes em relação à grande maioria dos casos (Mazafferri *et al*, 1994; Lin *et al*, 2005; Zidan *et al*, 2000).

Por outro lado, se é de fundamental importância reconhecer o grupo de pacientes com carcinomas diferenciados da tiróide que responderão mal ao tratamento com radioiodo, também nos preocupam os pacientes que, embora inicialmente responsivos, deixam de se beneficiar com o uso de ^{131}I ao apresentar recidivas e/ou metástases (Karavitaki *et al*, 2002). Estes pacientes, que podem chegar a 70% dos casos de recidivas, poderiam se beneficiar de uma série de novas abordagens terapêuticas como o uso de retinóides visando a rediferenciação celular; radiosensibilizadores; terapia gênica com reintrodução de NIS ou bloqueadores de acetilação; etc (Haugen, 1999; Sarlis, 2001).

O avanço nas técnicas de terapêutica gênica trouxe uma nova perspectiva de tratamento para os portadores de tumores de tireóide pouco diferenciados e/ou de má evolução. Uma pesquisa simples no banco de publicações registradas no MEDLINE online¹ mostra que 314 relatos podem ser encontrados a partir de “thyroid cancer genetic therapy”. Torna-se fundamental encontrar meios para distinguir estes casos entre a maioria dos pacientes que evoluem bem (Ringel, 2000).

1.2.1- Fatores Clínicos e Patológicos de Prognóstico, sistemas de estadiamento

Entre os fatores associados à evolução do CDT, alguns são bem reconhecidos (Hovens *et al.*, 2007; Pacini., *et al* 2005; Mazzaferri & Kloos, 2001; Reynolds *et al.*, 2005; Gulcelik *et al.*, 2008):

- Idade
- Sexo

Fatores relacionados ao tumor :

- Fatores histopatológicos
 - grau histopatológico
 - tipos histológicos do tumor
- Tamanho do tumor
- Multifocalidade e bilateralidade
- Extensão extra-tiroidiana
- Comprometimento de linfonodos
- Metástase à distancia

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Entretanto, é difícil avaliar o impacto de todos os fatores clínicos e patológicos que, reconhecidamente, influem na sobrevida livre de doença por causa do diagnóstico precoce e excelente sobrevida da maior parte dos pacientes com CDT.

Muitos sistemas de estadiamento são derivados de análises multivariadas que não consideram o efeito da terapia, algumas delas sem sequer considerar o índice de recorrência. Para complicar ainda mais a interpretação dos dados, existe o fato de que, embora tenham excelente prognóstico, crianças e pacientes jovens apresentam elevada frequência de recorrência (Mazzaferri & Kloos, 2001).

Brierly *et al.*, 1997, comparou os vários sistemas de estadiamento e prognóstico atualmente propostos e concluiu que nenhuma delas mostra qualquer vantagem sobre o clássico sistema TNM proposto pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC) e pela International Union Against Cancer (IUAC). Por outro lado, o uso desses fatores clínicos e patológicos permite definir pacientes de baixo, elevado e intermediário risco (jovens com menos de 45 anos de idade mas com tumores de elevado risco) (Shaha *et al.*, 1998).

Tem-se buscado intensamente parâmetros que possam, com maior segurança do que os clínicos-patológicos, indicar já ao diagnóstico uma abordagem cirúrgica mais ou menos agressiva e que permitam estabelecer riscos maior ou menor de recorrência ou recidiva para cada indivíduo, o que implicaria em maior atenção e rigor no seguimento de alguns pacientes em relação à grande maioria dos casos. O uso desses indicadores clínicos poderia poupar a grande maioria dos pacientes de uma cirurgia mais radical ou dos controles periódicos frequentes de Tg e PCI, mas ainda não se tem segurança no uso dos mesmos, por outro lado, seguramente, eles nos permitem aumentar a vigilância sobre os casos de maior risco.

1.3- O Gene *ATM*

Em estudos feitos a partir de pacientes que apresentavam a doença autossômica recessiva, ataxia-telangiectasia, descobriu-se o gene *ATM* (MIM#607585), de A-T mutado (MIM# 208900) (Savitsky *et al.*, 1995). A síndrome da AT é caracterizada pela progressiva

disfunção neuromotora, hipersensibilidade a radiação e agentes indutores a quebra da dupla fita, imunodeficiência, atrofia das gônadas e timo, instabilidade genômica e suscetibilidade ao câncer, principalmente em linfomas malignos (Shiloh, 2003).

O gene *ATM* localiza-se no cromossomo 11q22-23, possuindo 66 éxons (com apenas 62 realmente codificantes), e é responsável pela formação de 3056 aminoácidos ocupando 150kb de DNA. Pertencente à família fosfatidilinositol-3 quinases (PI3K) que responde aos danos de DNA fosforilando substratos chaves envolvidos no reparo e/ou no controle do ciclo celular (Platzer *et al*, 1997; Savitsky *et al*, 1995).

A resposta aos danos no DNA ocorre pela ativação de complexas vias de reparo que incluem a checagem do ciclo celular, a ativação de genes que estão associados ao reparo de DNA e, em algumas circunstâncias, a apoptose celular. Caso ocorra algum erro ou mau funcionamento destas vias de reparo, a instabilidade genômica resultará em células carcinogênicas (figura 1) (Shiloh, 2003; Lavin, 2004 e 2008).

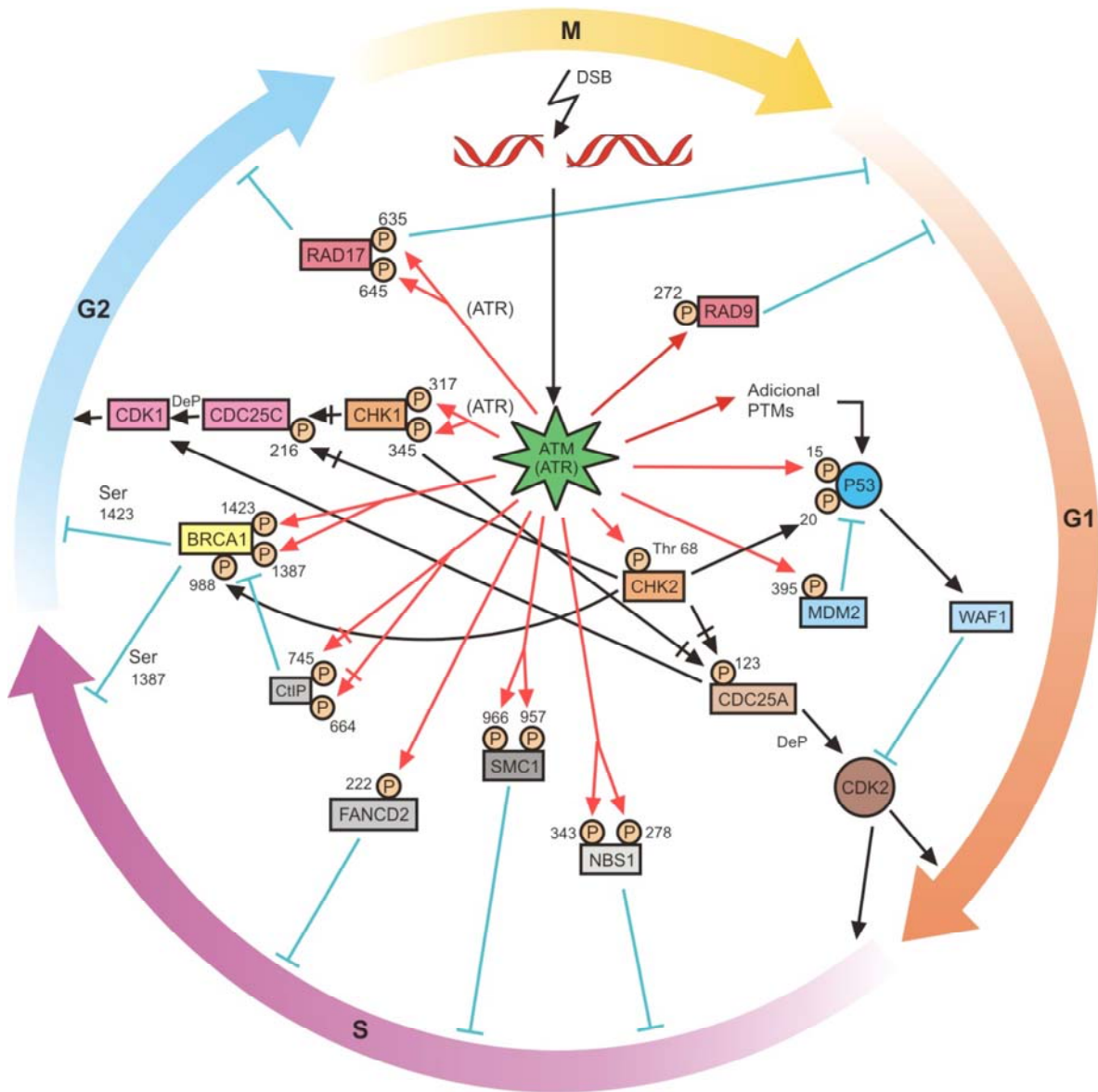


Figura 1- *ATM* possui um papel central na ativação responsável pela checagem do ciclo celular em resposta a quebra de dupla fita. As indicações em azul mostram em que determinada fase do ciclo celular ocorre à checagem; os sítios de fosforilação estão marcados com um P e os de desfosforilação com um DEP; os seus respectivos resíduos estão marcados por números. Em geral, a maior parte das respostas ao dano celular consiste de 2 importantes vias paralelas compostas por sensores, transdutores e efetores. Nestes casos 2 fosfotidilinositol-3 quinases; *ATM* e *ATR* (*ATM-Rad3-related*) que estão localizadas no topo desta cascata de sinalização, cujo papel é fosforilar e ativar diversas moléculas que executam a reparo ao dano celular (Shiloy, 2003).

A quebra de dupla fita resultante da irradiação iônica e/ou da ação de algumas drogas quimioterápicas ativa a via de checagem do ciclo celular. Esta quebra primeiramente é detectada por proteínas sensoras que reconhecem as regiões lesionadas do DNA ou uma possível alteração cromossomal (Shiloy, 2003). Estas quebras são reparadas nas células dos mamíferos por 2 mecanismos (Czornak, 2008) (Figura 2):

- o primeiro é a recombinação homóloga (*homologous recombination- HR*), que ocorre entre duas moléculas de DNA quebradas e correspondentes seqüências das cromátides irmãs (*crossing over*) durante a fase S e G2 do ciclo celular. A maquinaria de reparo consiste de várias proteínas como RAD51, RAD52, RAD54, MRE11, BRCA1 e BRCA2.
- o segundo é a recombinação não homóloga (*nonhomologous and joining- NHE*) que rapidamente para a extensão da fita, no local da quebra da fita, criando um local de microdeleção que será reparado por um processo de alta fidelidade baseado na recombinação homóloga (HR).

Estes processos dão início à ativação do reparo de muitos complexos protéicos sendo que a primeira proteína traduzida neste caso será *ATM* (Shiloy, 2003; Czornak, 2008). Os reparos são feitos durante todas as fases e envolvem proteínas como *Ku70* e *Ku80*, *DNA PKcs*, *DNA ligIV*, *XLFI*, *XRCC4* e *PNK* como representado na figura 2.

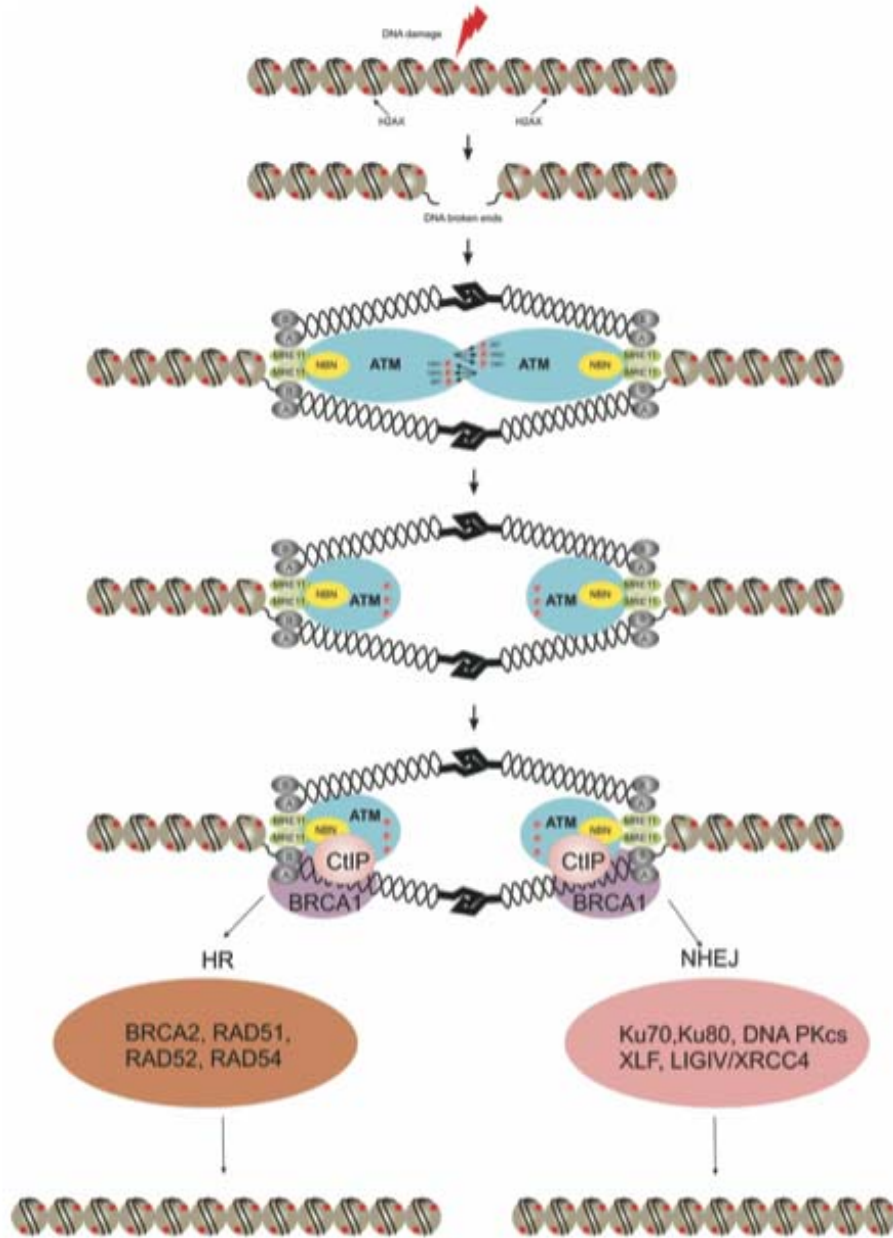


Figura 2- Esquema representativo dos mecanismos de reparo do DNA: *ATM* se autofosforila no resíduo Ser 1981 induzida pela quebra de dupla fita causada principalmente pela radiação ionizante. O complexo *MRN* (*MRE11-RAD50-NBS1*) então interage com a proteína *ATM* que passa de sua forma inativa dimérica para sua forma ativa monômera. *ATM* fosforila os demais substratos envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA de 2 formas: pela recombinação homologa (HR) e recombinação não homologa (NHEJ) (Czornak K, 2008).

ATM e *DNA-PK* (DNA dependente de proteína quinase) são os genes que respondem primeiramente à quebra de dupla fita, *ATR* e *ATX* ambos respondem aos danos causados pela radiação ultravioleta (UV) e na quebra de dupla fita, sendo que o primeiro age bloqueando a forquilha de replicação (Proud, 2002; Dennis & Thomas, 2002).

Zhang *et al*, 2004 estudaram linhagens celulares de tumores gástricos humanos depois da exposição a radiação iônica e detectaram expressão de *ATM* variável, mostrando que o dano no DNA causado pela radiação iônica resultou em uma acumulação e estabilização de *p53*, indicando portanto que *ATM* possui um papel importante na fosforilação desta via. Outros autores confirmaram que *ATM* possui um papel central na sinalização ao dano do DNA, na ativação da checagem do ciclo celular e indução a apoptose (Offer, 2002; Siciliano, 1997). Alguns estudos sugerem que *ATM* também está implicado no sinal de transdução mitogenética, condensação cromossômica, recombinação cromossômica e que a mutação em *ATM* acarreta um defeito na manutenção do telomero (Pandita, 2000; Smilenov, 1997).

1.3.1- Polimorfismos do gene *ATM*

Os polimorfismos do gene *ATM* podem levar a uma mudança na conformação protéica, inativação do domínio quinase ou mesmo alterar a sua estabilidade molecular gerando diversas conseqüências fenotípicas.

A grande maioria das alterações do gene *ATM*, cerca de 80% causam truncamento da proteína, e cerca de 15% delas são do tipo missense (Lavin, 2004). Contudo 3 alterações de seqüência do tipo missense são mais importantes e tem sido correlacionadas com o suscetibilidade a diferentes tipos de câncer (National Cancer Institute online²):

1) *ATM* D1853N (rs1801516) - troca de um ácido aspartâmico por uma asparagina (G>A), no nucleotídeo 5557 do éxon 39. Esta troca pode alterar a conformação protéica e esta região (1853) da proteína, parece interagir com a proteína *Rad 3*, porem pouco estudada (Kristensen *et al*, 2004). Alguns estudos mostram à correlação desta

² http://snp500cancer.nci.nih.gov/snplist.cfm?gene_id=ATM

variante a suscetibilidade ao câncer de mama, tireóide e bexiga (Wu *et al*, 2006; Schrauder *et al*, 2008; Akulevich *et al*, 2009; Thorstenson, 2001).

2) *ATM* Ser49Cys (rs1800054) – troca de uma serina por uma cisteína (C>A) no nucleotídeo 146 do éxon 5. Esta região (49) da proteína está envolvida na ligação da cromatina e upregulation de *p53* e, contudo esta mutação pode alterar os alvos específicos de reparo ao dano no DNA. Observou-se que portadores do alelo heterozigoto possuem um risco maior para o câncer de melanoma, mama, próstata e cavidade oral (Hannan , 2002; Oakley , 2001; Dombernowsky *et al*, 2008).

3) *ATM* Ser707Pro (rs4986761), troca de uma serina por uma prolina (T>C) no nucleotídeo 2119 do éxon 15. Esta mutação parece interferir na estrutura secundária e terciária da proteína removendo o grupo hidroxil que participa da ligação de hidrôgenos. Portadores heterozigotos para esta mutação segundo alguns estudos, possuem um risco maior na incidência de câncer de mama, útero e tireóide (Dombernowsky *et al*, 2008).

O gene *ATM* mutado levará a defeitos nos mecanismos de checagem do ciclo celular, afetando principalmente as fases G1/S e G2/M, a um defeito na inibição da replicação e defeito na “upregulation” de *p53* (Gueven *et al*, 2006). Com isso, ocorrerá instabilidade genômica e uma maior suscetibilidade ao câncer (Khanna & Jackson, 2001)

Devido ao importante papel do gene *ATM* no controle da integridade genômica, seu funcionamento errôneo levam a um grande risco para o desenvolvimento do câncer. Recentes estudos mostram evidências que alguns tipos de cânceres estão correlacionados a variantes de *ATM*, incluindo o câncer de mama, leucemia, linfoma e câncer de cólon. De qualquer modo, há poucas informações e estudos em alterações do gene *ATM* em outros tumores sólidos humanos, principalmente tireóide (Gatti & Tward , 1999; Ejima, 2000).

Os indivíduos portadores dos alelos heterozigotos do gene *ATM* mostraram ter riscos ainda maiores na predisposição ao câncer (Gatti, 1999). Já os indivíduos portadores dos alelos homozigotos mostraram ter instabilidade cromossômica e a presença de “gaps”, quebras, translocações envolvendo receptores de células T, telômeros anormais e um aumento da taxa de recombinações cromossômicas, chegando a ter 100 vezes mais o risco de desenvolver câncer (Smilenov, 1997; Morrell, 1986).

1.3.2- A Proteína ATM

A proteína ATM serina/treonina quinase possui 350kDa, é membro da família fosfotilinositol 3-quinase (PI3-kinase), incluso no subgrupo de quinases que tem como característica o domínio PI3K na sua porção carboxi terminal. A região C-terminal possui os domínios FATC (1966-2566) e FAT que simultaneamente ativam o sitio PI3K e 3 sítios de ligação, o ATP (resíduos 2716 -2730) e dois substratos (Lavin *et al*, 2004, 2004) (figura 3).

Em sua parte N-terminal encontra-se um zíper de leucina (resíduos1218-1238) e uma região rica em prolina (resíduos 1373-1382).

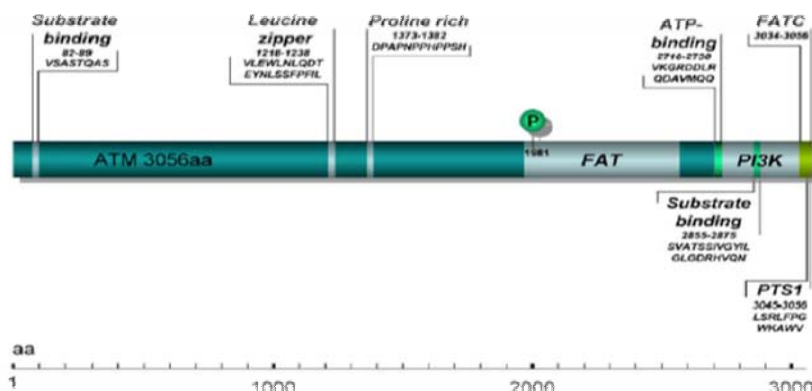


Figura 3- Esquema representativo da proteína ATM. Estão indicados os 3056 aminoácidos incluindo a porção N-terminal, um substrato de ligação, um zíper de leucina (1218-1238) e uma região rica em prolina (1373-1382). Em sua porção C-terminal, ATM apresenta dois domínios FAT (1966-2566) e FATC (3834-3056), PI3K e o sítio de autofosforilação, marcado com um P, no resíduo serina 1981 (Lavin *et al*, 2004, 2004).

A proteína ATM é predominantemente nuclear, porém pode ser encontrada no citoplasma (~10-20%) (Lavin, 2008). No núcleo, esta proteína interage com o complexo MRN, recrutando as demais vias de reparo e checagem do ciclo celular. No citoplasma, ela interage com os peroxissomos (organelas envolvidas na oxidação β e detoxificação) e endossomos (responsável pela endocitose), porém pouco se sabe sobre a sua importância (Lavin, 2008).

1.4- O Gene PI3KCA

As fosfatidilinositol 3- quinases (PI3Ks) são agrupadas em 3 classes enzimáticas: I, II e III, dependendo da sua unidade estrutural, sua regulação e seu substrato (Kong D, 2008):

- Classe I - contém um grupo de proteínas heterodímeras que são constituídas de uma subunidade catalítica e regulatória. *In vitro*, esta classe fosforila fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol 4-trifosfato (PIP), e fosfatidilinositol 4,5-trifosfato (PIP₂), sendo *in vivo*, (em mamíferos) preferencialmente PIP₂ gerando o PIP₃.
- Classe II- consiste de 3 membros, PI3KC2 α , PI3KC2 β e PI3KC2 γ e *in vitro* esta classe fosforila PI e PIP.
- Classe III- consiste de apenas um membro, Vps34, que fosforila apenas PI e desempenha um importante papel na endocitose e tráfego das vesículas.

A via PTEN/PI3K/AKT constitui uma importante cascata de sinalização na carcinogênese da tireóide (Bruni, 2000; Weng, 2001; Dahia,1997; Halachmi, 1998; Gimm, 2000). A proteína PI3KCA (classe I_A PI3K) é ativada pelo receptor de transmembrana tirosina kinase (RTK) formando heterodímeros que consistem de uma subunidade regulatória p85 e uma subunidade catalítica p110 α . Dependendo da fosforilação no sítio carboidrato, as PIKs são classificadas em 3 famílias: fosfatidilinositol 3' kinase (PI3Ks), fosfatidilinositol 4' kinase (PPI4Ks) e fosfatidilinositol 5' kinase (PPI5Ks) (Samuels, 2006).

PIP₃ que é fosforilada pela proteína PI3K, ativa outro receptor homólogo de serina/tirosina proteína kinase, PDK1 e AKT, que estão localizados na membrana. Uma vez na membrana, AKT é ativada em parte pela fosforilação de PDK1; este, por sua vez, é capaz de fosforilar inúmeros alvos *downstream*, genes responsáveis pela proliferação e sobrevivência celular (Figura 4) (Sansal, 2004; Cantley, 1999; Frisk *et al*, 2002; Ringel, 2001; Vasko, 2004).

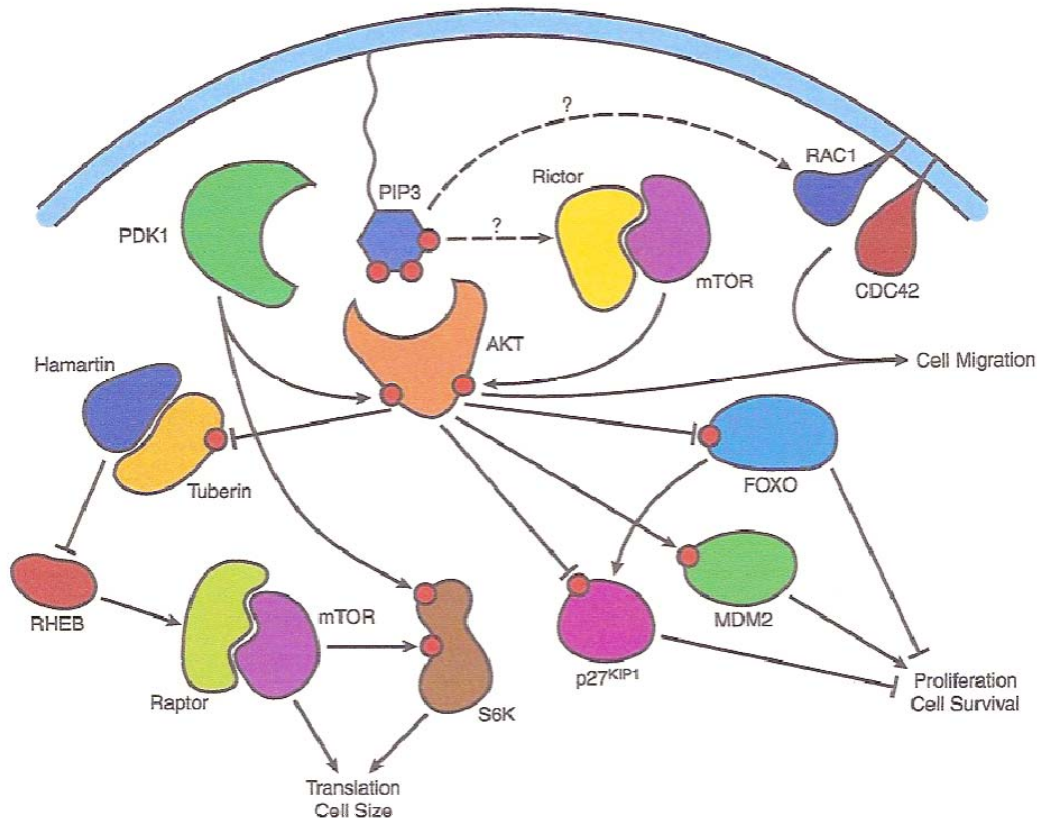


Figura 4- Representação simplificada da via PI3K/AKT. PIP3 intervêm no recrutamento da família quinase *AKT* pela membrana desencadeando a ativação das demais quinases, PDK1/PDK2 e do complexo mTOR. Depois de ativado, *AKT* pode fosforilar e regular múltiplos alvos dentro deste contexto dependente, levando a diversos resultados celulares como crescimento, proliferação, sobrevivência e migração celular e tradução protéica (Chow, 2006).

A localização de *AKT* na membrana, e, conseqüentemente, sua ativação, resulta em graves problemas como na supressão da apoptose induzida por inúmeras estimulações como a retirada de fatores de crescimento, separação da matriz extracelular, irradiação UV, desordem do ciclo celular e ativação da sinalização (Hay, 2005) Sua hiperexpressão também promove um crescimento celular descontrolado, possivelmente pela *down-regulation* da quinase dependente de ciclina *p27* assim como a *up-regulation* e estabilização da ciclina *D* (Kandel,1999; Downward, 2004; Vivanco, 2002; Blume –Jensen, 2001).

1.5- O Gene *PTEN*

O gene *PTEN* (*phosphate and tensin homolog deleted on chromosome 10*), também conhecido como *MMAC1* (*mutated in multiple advanced cancers*), foi identificado em 1997 por dois diferentes grupos (Li *et al.* 1997; Steck *et al.* 1997). Localizado na sub-banda cromossômica 10q23.3, é um gene supressor tumoral (Steck, P *et al.*, 1997; Myers MP *et al.*,1997).

Mutações germinativas no gene *PTEN* foram descobertas a partir de uma doença autossômica dominante, a síndrome de Cowden (SC,# MIM 158350), que tem como característica clínica múltiplos hamatomas, lesões mucocutâneas e uma predisposição ao desenvolvimento de cânceres como, mama, útero, próstata e principalmente tireóide (Zedenius, 1996; Liaw *et al.* ,1997, Marsh *et al.*, 1997; Halachmi *et al.*, 1998; Kwabi-Addo *et al.*, 2001). Outra síndrome, a Bannayan-Zonana (BZS), possui características clínicas muito semelhantes à SC, porém não há predisposição ao câncer (Eng, 2003).

PTEN regula negativamente a via PI3K/AKT, altos níveis protéicos de *PTEN* levam a baixos níveis de Akt fosforilado, o que induz a célula a apoptose. Ao contrário, a inativação de *PTEN* leva ao aumento da atividade de Akt e, conseqüentemente, à sobrevivência celular (figura 5) (Myers *et al.*, 1998, Stambolic *et al.* 1998, Haas-Kogan *et al.*, 1998, Dahia *et al.*,1999). O gene *PTEN* também pode afetar outras vias de sinalização, como as vias de adesão focal e a ativação da proteína quinase mitogénica (Tamura *et al.* 1998, Gu,1998).

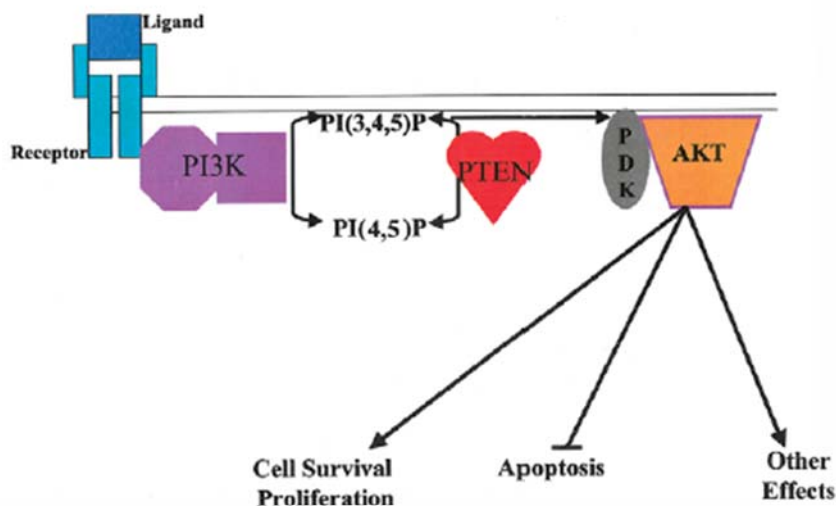


Figura 5- Esquema representativo da regulação de PTEN na via PI3K/AKT. Ligações no receptor de membrana (representado em azul) ativam a PI3K e conseqüentemente a PIP3 que por sua vez recruta a PDK1 na membrana celular. PDK1 fosforila AKT ativando-a, que por sua vez será responsável pela regulação de uma variedade de processos celulares (apoptose e proliferação celular). PTEN desfosforila o PI3P baixando seus níveis celulares e resultando na *dow-regulation* de AKT (Waite, 2002).

1.5.1- A proteína PTEN

O gene *PTEN* codifica um polipeptídeo de 403 amino ácidos, tendo em sua parte amino terminal um domínio fosfatase e outro domínio C2 que medeia à sinalização com demais proteínas de membrana. Em sua parte carboxi terminal aonde ocorre $\geq 43\%$ das mutações, encontra-se uma seqüência PEST responsável pela regulação da estabilidade protéica e um domínio PDZ (figura 6)

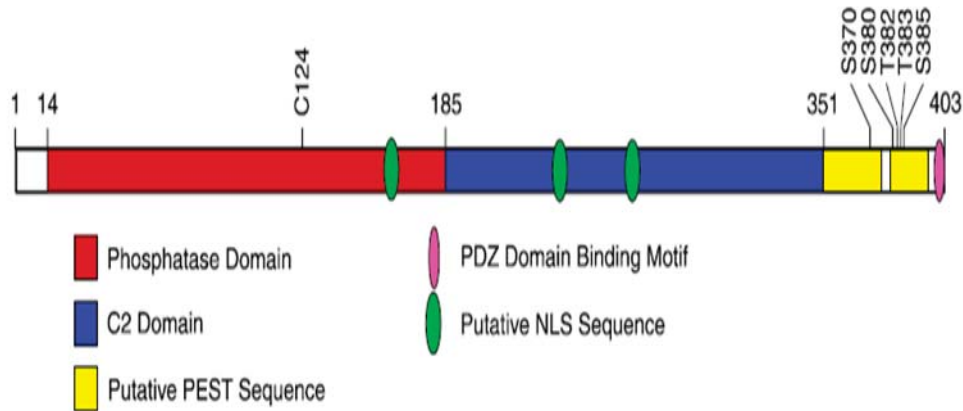


Figura 6- Estrutura representativa da proteína PTEN. A parte amino terminal é composta pelo domínio fosfatase, com um resíduo cisteína na posição 124 seguido de um domínio C2. Parte carboxi terminal é caracterizada por uma sequência de domínio PEST de resíduos serina (S) e treonina (T) que é fosforilada tanto *in vivo* como *in vitro*, e uma sequência PDZ. As sequências NLS são alvos de interação com demais proteínas que medeiam o transporte desta proteína para o núcleo (Chow, 2006)

O maior substrato para PTEN é o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), um produto direto da atividade da fosfadiinositol-3-quinase (PI3K) (Gimm *et al*, 2000). A atividade intrínseca da extremidade tirosina fosfatase é responsável pela função supressora tumoral da proteína codificada por PTEN (Li *et al*, 1997). No entanto, a proteína PTEN também pode induzir a morte celular independentemente de sua atividade fosfatase (Weng *et al*, 2001). O PIP3 intervém na à ativação do fator de crescimento induzido na via de sinalização intracelular, principalmente através da serina-treonina quinase Akt, que é conhecida por promover o crescimento e a sobrevivência celular (figura 7).

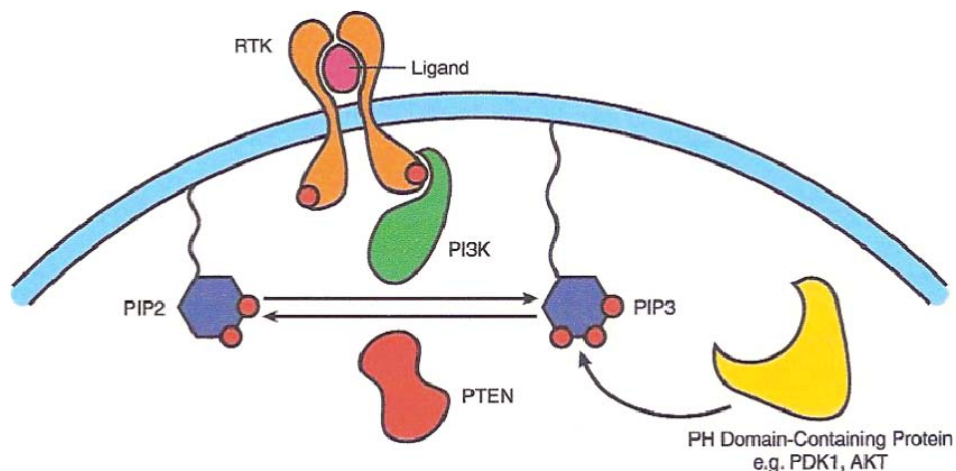


Figura 7- Atividade catalítica da proteína PTEN. PTEN catalisa a desfosforilação do fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) na posição D3 resultando em fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2). Por este motivo, PTEN contrapõe receptores de tirosina quinase (*RTK*) estimulando atividade fosfatidilinositol 3 quinase, que cataliza a produção de PIP3. Este fosfolípido medeia o recrutamento de moléculas sinalizando a membrana através do domínio homólogo pleckstrin (PH), como as fosfatidilinositol-dependentes quinases (PDK1) e membros da família AKT (Chow *et al*, 2006).

1.5.2- Relação de PTEN com o câncer de tireóide

Ainda não se conhecem todos os mecanismos envolvidos da via PI3K/AKT na tumorigênese tireoidiana, sabe-se que sua ativação inibe a apoptose celular e induz diversos fatores a sobrevivência celular (Bruni *et al*, 2000; Downward *et al*, 1998).

Estudos analisando a expressão protéica de PTEN realizada a partir da técnica de imunistoquímica em diferentes tecidos malignos e normais demonstraram que a proteína localiza-se tanto no citoplasma como no núcleo. Sabe-se que sua localização nuclear estaria envolvida na fase G1 do ciclo celular, responsável pelo crescimento celular, e no citoplasma na fase S, responsável pela replicação celular (Chow, 2006; Chung, 2005;

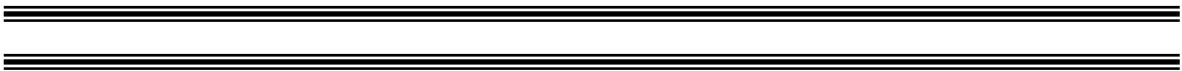
Ginn-Pease, 2003). A proteína responsável que medeia o transporte de PTEN é a MVP (major vault protein) (Chung, 2005).

Estudos do gene *PTEN* em tumores tiroidianos humanos primários demonstraram mutação estrutural monoalélica, deleção heterozigótica ou mutação somática intragênica de ponto (Gimm *et al*, 2000).

Um estudo feito em camundongos knock-out heterozigotos para o gene *PTEN* (*PTEN*^{+/-}) mostrou que estes desenvolveram carcinomas tiroidianos papilíferos como resultado a esta haploinsuficiência (Di Cristofano, *et al*, 1998; Podsypanina, *et al*, 1999). Outro estudo sugere que a haploinsuficiência e a inativação de PTEN são eventos tardios na progressão tumoral, podendo emergir como uma população clonal até mesmo em carcinomas avançados. Mutações somáticas do gene *PTEN* em neoplasmas esporádicos também podem ocorrer tardiamente (Halachmi *et al*, 1998).

Estudos *in vitro* demonstraram que a indução da expressão do gene *PTEN* em células tiroidianas suprime o crescimento e a formação de colônias. Entretanto, re-expressão do gene *PTEN* não induz a apoptose, mas bloqueia a progressão tumoral impedindo a entrada do ciclo celular na fase S. (Bruni *et al*, 2000, Weng *et al*. 2001). Há evidências que p27^{kip1} medeia, ao menos em parte, os efeitos do gene *PTEN* na progressão do ciclo celular. A expressão constitutiva do gene *PTEN* induz a *up-regulation* de p27^{kip1} em células tiroidianas cancerígenas (Bruni *et al*, 2000).

2- OBJETIVOS



- Investigar o papel:
 - Dos polimorfismos do gene *ATM*
 - Da expressão protéica de *ATM* e *PTEN*
 - Da expressão quantitativa de mRNA do gene *ATM*

Correlacionar todos os achados com os aspectos clínicos, anatomo-patológicos e de evolução dos pacientes com tumores da tireóide.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS



Este trabalho que foi realizado no Laboratório de Genética Molecular do Câncer (GEMOCA) em parceria com:

- O Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, sob coordenação do Prof. Dr. Fernando A. Soares que nos forneceu os casos de tissue microarray utilizados na reação de imunohistoquímica e amostras de RNA para quantificação relativa de mRNA por Real-Time PCR;
- O Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Unicamp, sob coordenação do Prof. Dr. José Vassallo que foi responsável pela revisão das lâminas utilizadas neste trabalho;
- O Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP liderado pela Dra. Ligia V. M Assumpção, a qual nos forneceu sangue periférico de pacientes atendidos neste ambulatório.
- O grupo de cirurgiões do Departamento de Cabeça e Pescoço do Hospital Centro Médico sob a coordenação do Dr. Alfio Tincani, que nos forneceu tecidos tiroidianos normais adjacentes de tecidos benignos assim como acesso aos dados dos pacientes para realização da quantificação de mRNA pela técnica de Real-Time – PCR.

3.1- CASUÍSTICA

Todos os pacientes e indivíduos que participaram deste trabalho concordaram em participar deste estudo e assinaram o termo de consentimento informado, conforme as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp e do Hospital AC Camargo.

Foram utilizadas amostras de tecido tiroidiano de 272 pacientes diagnosticados carcinomas diferenciados da tireóide (CDT) (142 carcinomas papilíferos do tipo clássico (CPC), 72 carcinomas papilíferos variante folicular (CPVF), 17 carcinomas papilíferos variante de células altas (CPVA) e 41 carcinomas foliculares (CF)); 106 amostras de tecido de pacientes diagnosticados com doenças tiroidianas benignas (55 adenomas foliculares

(AF) e 51 com bócio), 27 tecidos de tiróide normal extraídos de lobo contra-lateral de indivíduos operados por AF (tabela 1).

Nas amostras provenientes de sangue periférico utilizamos um total de 199 pacientes com CDT (164 CP e 35 CF) e 219 indivíduos controles diagnosticados como saudáveis e sem qualquer alteração na tireóide (sendo 3 mulheres para cada 2 homens, para que o grupo seja comparável com o da neoplasia tireoidiana).

Na casuística de tecido tireoidiano para a realização da extração de mRNA, utilizamos 87 CP clássico e 27 tecidos normais, coletados a partir dos tecidos adjacentes dos adenomas foliculares. Todos os tecidos da tiróide utilizados neste trabalho foram avaliados por patologistas.

Tabela 1- Casuística usada no estudo do gene *ATM*.

Pacientes	Anátomo Patológico	IHQ (n)	Polimorfismos (n)	qRT-PCR (n)
Carcinomas	CPC	142	103	87
	CPVF	72	40	0
	CPVA	17	14	0
	CP outros	0	28	0
	CF	41	9	0
	Total	272	195	0
	Benignos	Bócio	51	0
AF		55	0	0
Total		106	0	0
Normais	Controles	18	219	27

Tabela 2- Casuística usada no estudo da proteína PTEN.

Pacientes	Anátomo Patológico	IHQ (n)
Carcinomas	CP clássico	118
	CP Var Folicular	62
	CP Cels Altas	14
	CF	41
	Total	235
Benignos	Bócio	60
	Adeno Folic	56
	Total	134
Normais	Controles	18

Os pacientes foram seguidos numa média de 53.8 (\pm 41 meses) e os prontuários foram obtidos pelos serviços (HC-Unicamp, AC Camargo e Centro Médico), dados que incluíram:

- identificação: a idade ao diagnóstico, sexo; cor; dados clínicos pré-cirúrgicos, tabagismo, histórico de câncer na família; histórico de segundo câncer ou de câncer prévio.
- exames realizados: ultra-sonografia, citologia obtida através da biópsia aspirativa.
- dados referentes à cirurgia e ao exame anátomo-patológico: tamanho do tumor, tipo histológico; grau de diferenciação, presença ou não de cápsula, presença ou não de múltiplos focos, presença ou não de invasão (peritumoral, capsular, vascular, extra tireoidiana), presença ou não de tireoidite (peritumoral ou no restante da glândula), presença de linfonodos acometidos pelo tumor.

Os pacientes incluídos neste estudo não apresentavam histórico de exposição acidental ou médica à radiação ionizante e foram, todos eles, submetidos à tireoidectomia total ou quase total.

Depois de quatro a seis semanas da cirurgia e sem reposição de levotiroxina, os pacientes foram submetidos à pesquisa de corpo inteiro (PCI) com 5 mCi ^{131}I , para a detecção de restos ou de metástase do carcinoma e dosagem de tireoglobulina (Tg). Todos os pacientes receberam dose ablativa de 100 mCi de ^{131}I , após a qual foi realizada nova PCI. Um total de 99 pacientes teve necessidade de novas doses de radiodo, uma média de doses acumuladas de 193 mCi chegando ao máximo de 780 mCi.

Estabelecido o resultado da PCI, foram prescritas doses supressivas de levotiroxina. Os pacientes foram seguidos com exames periódicos para a detecção precoce de metástase, TSH sérico e Tg de acordo com um protocolo que inclui raios-X, ultra-sonografia, tomografia computadorizada e outros eventuais métodos de imagem para a detecção de metástase à distância (vide tabela 4).

Definiu-se a evolução como livre de doença naqueles indivíduos que mantiveram os níveis de Tg estáveis ou em decréscimo e abaixo de 2 ng/dL, e que não possuíam qualquer evidência de recorrência (clínica ou por método de imagem), enquanto os pacientes com recorrência foram divididos naqueles com recorrência local (quando detectada recidiva no leito tireoidiano ou em linfonodos cervicais) e/ou com a presença de metástases à distância.

Para fins de análise estatística, os pacientes que evoluíram com recidiva local, à distância ou que morreram durante o acompanhamento, e decorrência da doença, foram classificados como de má evolução.

O sistema TNM foi utilizado para se classificar cada paciente enquanto que o estágio utilizado foi o do consenso brasileiro de nódulos e câncer diferenciado de tireóide publicado em 2007 (Maia, *et al*, 2007).

3.2- Métodos

3.2.1- Imunoistoquímica

Regiões representativas de 235 tumores foram identificadas e marcadas nas lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina e respectivamente identificadas nos blocos correspondentes. Estes tecidos foram examinados por patologistas que selecionaram áreas representativas de cada tumor, cortando em formato de cilindro com 1 µm de diâmetro tecidos que foram então agrupados em lâminas de tissue micro array (TMA).

As lâminas de TMA foram desparafinadas em banho de xilol a 110°C e subseqüentes banhos de xilol à temperatura ambiente. Logo após este processo, as lâminas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100, 80 e 50% e lavadas em água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada após 3 lavagens de H₂O₂ e posteriormente lavada em solução PBS (sol. Salina tamponada com fosfato ph 7.4 a 7.6).

Para a recuperação antigênica as lâminas foram submersas em um tampão de citrato de sódio a 95°C por 30 min. Após a lavagem em água corrente as lâminas foram incubadas nos seus respectivos anticorpos primários em câmara úmida a 4°C overnight.

Os anticorpos primários utilizados foram: PTEN (anticorpo anti-PTEN, monoclonal Novocastra, vide anexo 1) e ATM (anticorpo monoclonal anti-ATM, Epitomics, vide anexo 2), nas diluições: 1:200 e 1:250 respectivamente. As diluições dos anticorpos foram realizadas com soro de albumina bovina (BSA) e utilizamos como controle das reações câncer de mama para a proteína ATM e tonsila para a proteína PTEN. Para o controle negativo foram utilizadas as mesmas lâminas usadas para o controle positivo sem a adição do anticorpo primário.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas em tampão PBS e incubadas no anticorpo secundário Novolink Max Polymers® (Novocastra Laboratories LTD, New Castle, UK), por 1 hora. As lâminas foram novamente lavadas em solução PBS e posteriormente reveladas com substrato cromógeno DAB® (3-3'-diaminobenzidine

tetrahydrochloride, SIGMA) diluído em uma solução com 1500µl de H₂O₂ (10 vol) e 1 µl DMSO (dimethylsofoxide) a 37°C por 5 min.

Os cortes foram desidratados em soluções de álcool etílico em concentrações crescentes e diafanizadas em três soluções de xilol e finalmente montadas com lamínulas com resina Entellan® (Merk).

3.2.1.1- Leitura dos resultados

A leitura dos resultados foi realizada em microscópico ótico comum, no aumento de 40 vezes e revista por um médico patologista (Dr. José Vassallo), de modo semi-objetivo, examinando-se todos os campos os fragmentos de tumor. Foram fotografados os campos das lâminas onde se observou maior porcentagem de coloração, “hot spot” (4 fotos de cada caso) com auxílio de uma câmera motic modelo 2300 / série: S001792M. O microscópio utilizado foi o modelo Axiophot da marca Zeiss em um aumento de 40X (objetiva).

A localização celular da imunocoloração e a porcentagem de células coradas assim como sua intensidade (fraca, moderada e intensa) foram classificadas como:

Tabela 3- Classificação da imunocoloração.

% de coloração	Classificação	Intensidade	Classificação
negativo	0	Negativo	0
1-25	1	Fraco	1
25-50	2	Moderado	2
50-75	3	Intenso	3
75-100	4	Muito intenso	4

Para análise destes resultados de imunoistoquímica, utilizamos um score que se baseia na somatória da porcentagem de células coradas (positividade) com a intensidade de coloração como acima descrito. Assim sendo, todas as reações de imunoistoquímica foram classificadas de acordo com este score final, como exemplifica a tabela 6.

Tabela 4- Score de análise final.

Exemplo	% de coloração	Intensidade de coloração	Total	Score
A	0	0	0	0
B	1	1	2	2
C	2	1	3	3
D	3	3	6	6
E	4	3	7	7

Determinou-se que os valores de score 0 e 2 seriam considerados como negativos e os valores 3 a 7 como positivos.

Observamos que a imunocoloração tanto para o anticorpo de ATM quanto para o anticorpo de PTEN evidenciava núcleos (figuras 8 e 9).

3.2.2- Real-Time PCR

Primeiramente as amostras de tecido tiroidiano armazenadas em freezer -80°C foram maceradas e extraímos RNA em sucessivas etapas com o reagente Trizol® (Invitrogen), clorofórmio e álcool isopropílico. Após a extração, quantificamos a absorbância das nossas amostras usando o aparelho Gene Quant (Amersham Biosciences) e produzimos cDNA usando a transcriptase reverse cDNA Super Script III® (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a construção do cDNA utilizamos o fluoróforo SYBR® Green qPCR Super Mix (Invitrogen) para a reação da QPCR, para ambos os genes alvo (ATM) e um controle endógeno da reação (o gene GAPDH).

O fluoróforo intercala entre as fitas de DNA e emite um sinal de fluorescência que é captado pelo aparelho em tempo real formando assim curvas de expressão, como exemplifica a figura 8.

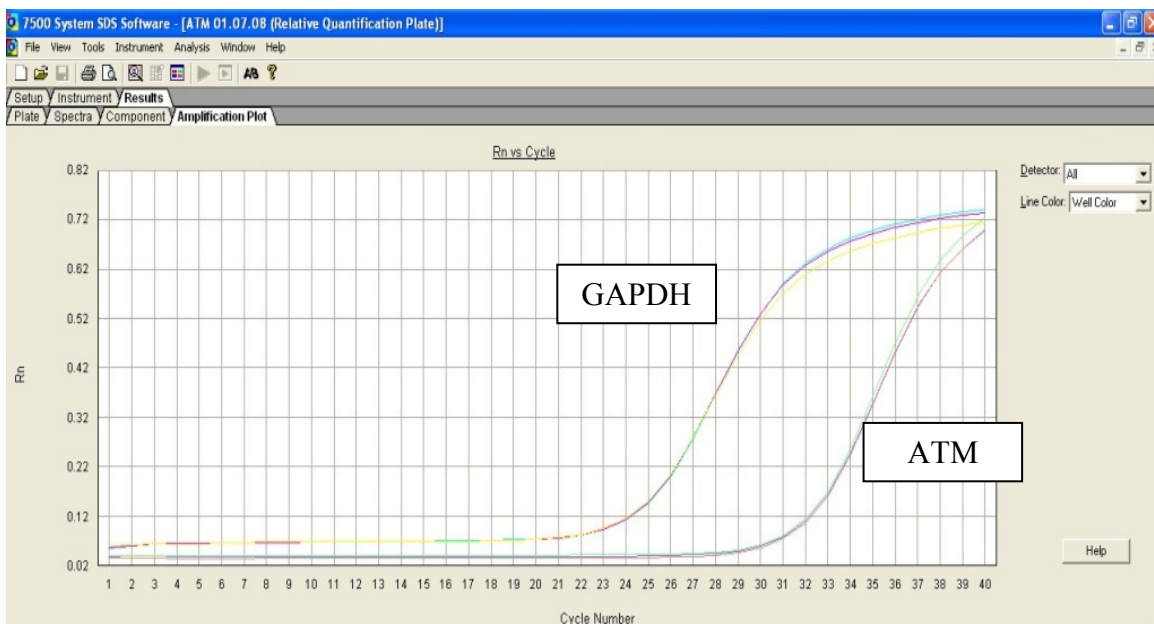


Figura 8- Curvas de expressão dos genes ATM e GAPDH.

Para a reação de qPCR, foram utilizadas 30ng de cDNA, 12.5µl de Platinum SYBR Green® qPCR Super Mix e 10µl dos respectivos pares de primer, para uma solução final de 25µl.

Os primers (MWG Oligo Synthesis Report, Miami, USA) utilizados para a análise foram desenhados pelo programa Primer Express (Applied Biosystems), baseados em sequências dos genes de interesse, disponíveis no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Utilizamos as seguintes seqüências de primers:

Tabela 5- Seqüência de primers de GAPDH e ATM.

Primer	Seqüências
GAPDH	Sense: 5' ACA ATT GAC TCT GGC CTT CC 3'
	Anti-sense: 5' CAG GTT ATA TCG AGA GGC TGC T 3'
ATM	Sense: 5' CCG ACG GGC CGA ATG T 3'
	Anti-sense: 5' AGC CGC AGA GCA CGG 3'

Os ciclos da reação da qPCR foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 min e anelamento e extensão final de 60°C por 1 min.

O aparelho usado para a reação foi Applied Biosystems 7500 qPCR System (Applied Biosystems Lincoln Centre Drive, Foster City, USA) e os resultados analisados pelo programa 7500 System SDS Software que baseia-se no número de ciclos necessários (*Cross Threshold-Threshold cycle*) para que a fluorescência emitida atinja a fase exponencial. Os valores de RQ foram calculados ($2^{-\Delta\Delta CT}$) tendo como base uma amostra que foi utilizada como calibrador da nossa reação, neste caso um tecido normal da tiróide, demonstrado graficamente na placa de análise o quanto aquela amostra é mais ou menos expressa em relação ao calibrador.

3.2.3- PCR e RFLP

Foram extraídas DNA de sangue periférico de 199 casos e 219 controles a partir do kit de extração DNA Isolation Kit for Mammalian Blood® (Roche Applied Science, USA) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram então identificadas e armazenadas no freezer a -20°C.

Para a análise das alterações de seqüência do gene *ATM* utilizamos os seguintes pares de primers:

Tabela 6- Seqüência de primers para os polimorfismos do gene *ATM*.

Primer		Seqüência
ATM D1853N (rs1801516)	sense	5'-GAT TCA TGA TAT TTT ACT CTA A -3'
	anti-sense	5'-AAG ACA GCT GGT GAA AAA TC -3'
ATM S707P (rs1800054)	sense	5'-GCCTGATTCGAGATCCTGAAACAAT-3
	anti-sense	5'-GAATACCTAAAAACAGCATCCCAATTCAA-3
ATM S49C rs4986761	sense	5'-TAAGGCAAAGCATTAGGTACTTG-3
	anti-sense	5'-TTTCTCCTTCCTAACAGTTTACC-3

O mix inicial para a reação da PCR foi composto de 100ng de DNA, 10µM de cada primer, 10mM Tris-HCL (ph 8.0), 20 mM de MgCl₂, 0.1 mM de dNTPs e 0.5U Taq DNA polimerase num volume final de 25µl. As condições da PCR para a amplificação dos fragmentos de interesse foram:

Tabela 7- Condições de temperatura para a reação da PCR dos polimorfismos do gene *ATM*.

Polimorfismos	Temp Inicial	Extensão e Anelamento	Número de ciclos	Temp Final
D1853N	94°C/5min	94°C/45seg 56°C/45seg 72°C/45seg	35	72°C/10min 4°C ∞
S49C	94°C/5min	94°C/45seg 64.3°C/45seg 72°C/45seg	35	72°C/10min 4°C ∞
S707P	94°C/5min	94°C/45seg 59.4°C/45seg 72°C/45seg	35	72°C/10min 4°C ∞

Usando o produto da PCR, as amostras foram misturadas com azul de bromofenol, os fragmentos menores (97 e 98 pb) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 3% e os fragmentos maiores (351pb) em gel de 2%. Coramos com brometo de etídeo e analisamos o resultado através da luz UV. Em seguida, as amostras contendo a seqüência amplificada foram submetidas a restrição enzimática.

Tabela 8- Enzimas utilizadas na reação de PCR-RFLP dos respectivos polimorfismos do gene *ATM*.

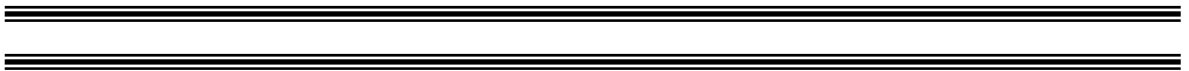
Polimorfismos	Enzima	Sítio de restrição	Temperatura	Fragmento
S49C Ser→Cys	Hpych4v New England	TG/CA	37°C	97pb 52 e 45 pb
S707P Ser→Pro	BSU New England	CC/TN	37°C	351pb 277 e 74pb
D1853N Asp→Asn	DdeI Invitrogen	C/TNAG	37°C	88pb 69 e 19pb

3.3- Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilhas para análise descritiva em tabelas de frequências para variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas. Para verificar associação ou comparar proporções foi usado o teste X^2 ou teste exato de Fisher, quando necessário. Para identificar possíveis riscos para a conclusão clínica, invasão e tireoidite foram utilizadas a análise de regressão logística múltipla. A evolução do tempo livre de doença foi estimada pela curva de Kaplan-Meier e as comparações pelos testes de Breslow ou Long Rank, quando necessários. Para a comparação de medidas contínuas ou ordenáveis entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney e entre três ou mais grupos o teste de Kruskal-Wallis. Para verificar associação linear entre as variáveis foi utilizado o coeficiente de Spearman.

O nível de significância adotado para todos os testes estatísticos foi de 5%.

4- RESULTADOS



4.1- Resultados de IHQ

Os pacientes foram seguidos por $53,8 \pm 41$ meses (mediana de 45 meses), variando de um mínimo de 12 meses até 298 meses (25 anos). Durante o período de seguimento, 12 pacientes morreram de câncer de tireóide, sendo 12 metástases à distância. Entre os indivíduos de estágio I, 64% evoluíram bem, ao passo que 32% dos indivíduos de estágio IV evoluíram mal (X^2 ; $p=0.0022$). Os pacientes que tiveram metástase ao diagnóstico evoluíram mal em 73% dos casos, enquanto os pacientes que não tiveram metástase ao diagnóstico tiveram uma boa evolução em 69% (X^2 ; $p<0.0001$).

A tabela 9 demonstra os dados clínicos dos pacientes utilizados no estudo de ambos os genes *ATM* e *PTEN* e os indivíduos controle. A tabela 10 resume os achados anátomo-patológicos dos pacientes estudados.

Tabela 9- Análise descritiva dos dados dos pacientes e controles.

Dados		Pacientes (n)	Controles (n)
Sexo	F	232 (80.84%)	127 (58%)
	M	55 (19.16%)	92 (42%)
Etnia	B	151 (87.28%)	152 (85%)
	NB	22 (12.72%)	26 (15%)
Faixa	<45	145 (50.52%)	91 (41%)
	>45	142 (49.48%)	128 (59%)
Tabagismo	F	99 (66.89%)	56 (35%)
	NF	49 (33.11%)	102 (65%)

Tabela 10- Análise descritiva dos dados dos pacientes segundo AP.

Dados		Pacientes (n)	Dados		Pacientes (n)
Multifocal	Sim	69 (39.66%)	Estadiamento	I	124 (61.39%)
				II	20 (9.90%)
	III	26 (12.87%)			
	IV	32 (15.84%)			
Encapsulado	Sim	69 (39.66%)	Metástase ao Diagnóstico	Sim	96 (63.16%)
				Não	56 (36.84%)
Invasão Extra tireoidiana	Presente	57 (38.26%)	Metástase na Evolução	Sim	48 (21.15%)
				Ausente	179 (78.85%)
Tiroidite	Presente	51 (33.77%)	Conclusão Clínica	Livre de doença	179 (78.85%)
				Ausente	48 (21.15%)
		100 (66.23%)			

4.1.1- Imunoistoquímica para a proteína ATM

Houve clara distinção entre positividade para ATM (Figuras 8. C e F) e ausência da proteína (Figura 9 B e D). A expressão de ATM foi identificada em 186/272 (68,4 %) dos pacientes com CDTs e foi negativa em 86/272 (34,6 %) dos casos, como mostra a Tabela 11.

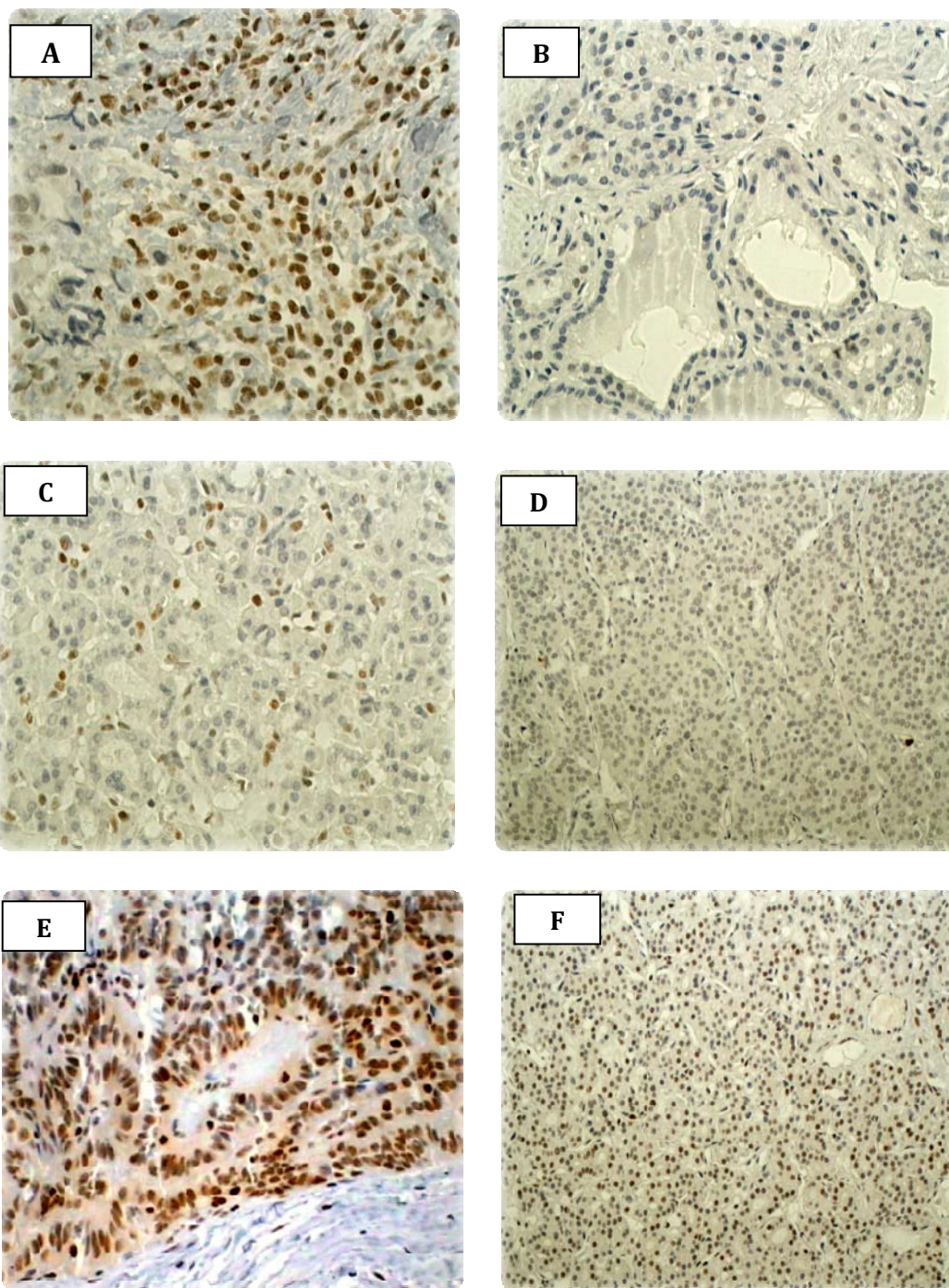


Figura 9- Expressão nuclear da proteína ATM: A. carcinoma da mama (controle positivo); B. tecido normal negativo (-); C. adenoma folicular positivo (+); D. carcinoma folicular negativo (-); E. carcinoma papilífero positivo (+) e F. carcinoma folicular positivo (+) (figuras A,B, C e E aumento de 200X; D e F aumento de 100X).

4.1.2- Tecidos normais e tumores benignos

Observamos a ausência de expressão em 23/55 (42%) dos AF, 28/51 (55%) dos bócios e 14/18 (78%) nos tecidos normais (tabela 11). Em relação à intensidade observamos uma prevalência de fracos entre: 4/18 (22,2%) nos tecidos normais, 16/32 (50%) nos AF e 17/23 (74%) nos bócios.

A soma da positividade com a intensidade de coloração onde atribuímos o score, destacou-se os tecidos normais em que há ausência de expressão em 100% dos tecidos em relação ao grupo de benignos (p=0.0019) (gráfico 1).

Tabela 11- Análise descritiva dos resultados de imunistoquímica mostrando a porcentagem de coloração para a proteína ATM.

AP	0	1-25%	25-50%	50-75%	75-100%	Total
Tec Normal	14 (77.78%)	4 (22.23%)	0	0	0	18
AF	23 (41.81%)	8 (14.54%)	10 (18.18%)	6 (10.90%)	8 (14.54%)	55
Bócio	28 (54.90%)	6 (11.76%)	9 (17.64%)	6 (11.76%)	2 (3.92%)	51
CPC	32 (22.54%)	23 (16.20%)	25 (17.61%)	21 (14.79%)	41 (28.87%)	142
CPVF	24 (33.33%)	8 (11.11%)	8 (11.11%)	16 (22.22%)	16 (22.22%)	72
CPVA	4 (23.53%)	4 (23.53%)	1 (5.88%)	3 (17.65%)	5 (29.41%)	17
CF	26 (63.41%)	2 (4.88%)	5 (12.20%)	2 (4.88%)	6 (14.63%)	41

A prevalência de porcentagem de coloração foi distribuída nos diferentes tecidos da seguinte forma: 14/18 (77,78%) nos tecidos normais, 23/55 (41,9%) nos AF, 28/51 (55%) dos bócios, 24/72 (33,3%) nos CVPF e 26/41 (63,4%) nos CF, não tinham expressão da proteína ATM. Em 41/142 (28,9%) dos CPC, assim como 5/17 (29,4%) dos CPVA tinham maior porcentagem de coloração entre 75-100% das células.

Tabela 12- Análise descritiva dos resultados de imunoistoquímica mostrando a intensidade de coloração para a proteína ATM.

AP	Fraco	Moderado	Intenso	Total
Tec Normal	4 (100%)	0	0	4
AF	16 (50%)	6 (18.75%)	10 (31.25%)	32
Bócio	17 (73.91%)	6 (26.08%)	0	23
CPC	49 (44.54%)	50 (45.45%)	11 (10%)	110
CPVF	25 (52.08%)	18 (37.5%)	5 (10.41%)	48
CPVA	7 (53.84%)	2 (15.38%)	4 (30.76%)	13
CF	11 (73.4%)	1 (6.7%)	3 (20%)	15

A intensidade de coloração demonstrou ser fraca na maioria dos tecidos sendo: 4/4 (100%) nos tecidos normais, 16/32 (59%) nos AF, 17/23 (74%) nos bócio, 25/48 (52,1%) nos CPVF, 7/13 (53,4%) nos CPVA e 11/15 (73,4%) nos CF. Apenas nos 50/110 (45,4%) dos CPC pudemos observar por uma diferença muito pequena a intensidade moderada.

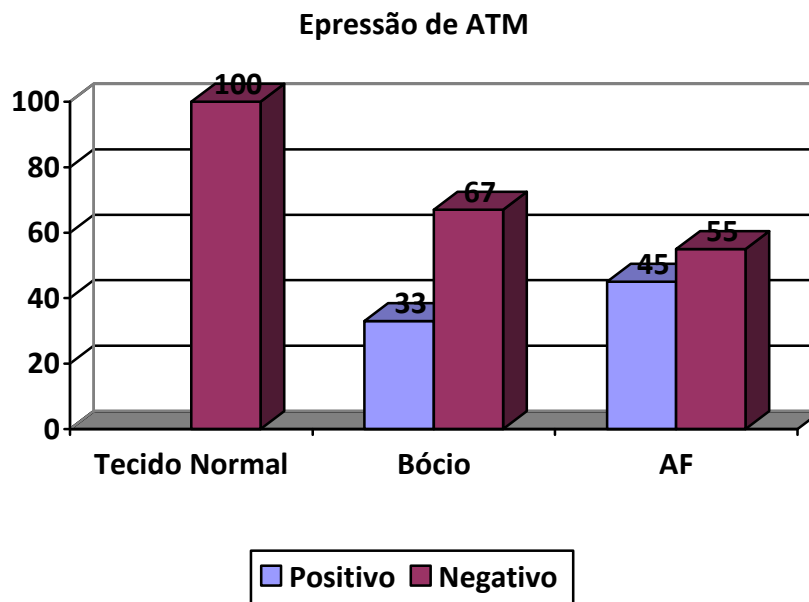


Gráfico 1- Análise do score de expressão dos tecidos benignos e tecido normal para a proteína ATM.

4.1.3- Tumores malignos

Apresentaram expressão da proteína ATM: 110/142 (77,5 %) dos CPC; 48/72 (66,7 %) dos CPVF; 13/17 (76,5 %) dos CPVA e 15/41 CF (36,6 %), porém a maioria dos CF não mostrou expressão de ATM 26/41 (63,4%) (tabela 11). A intensidade da coloração mostrou que 50/110 CPC (45,4%) eram moderados e 25/48 CPVF (52,1%), 7/13 CPVA (53,8%) e 11/15 (73,4%) eram em sua maioria fracos (tabela 12).

Analisando o score (positividade + intensidade) observamos que nos diferentes grupos são em sua maioria positivos: CPC com 63%; CPVF com 57% e CPVA com 53%. A ausência de expressão é significativa nos carcinomas foliculares (69%) em relação às demais variáveis de carcinomas ($p=0.0030$) (gráfico 2).

Expressão de ATM

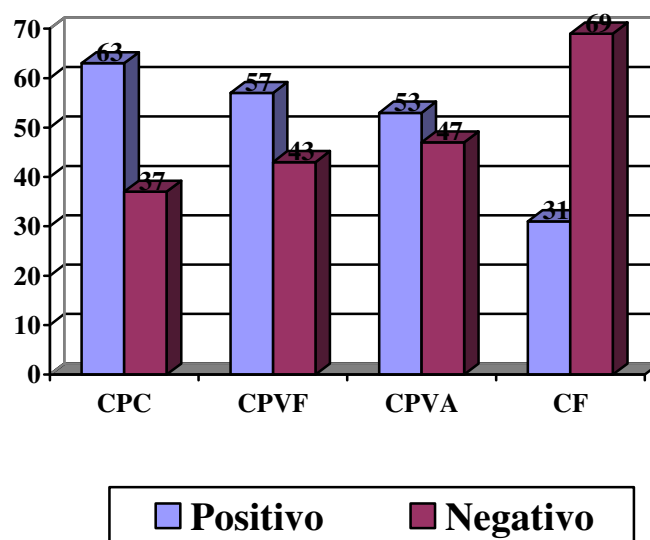


Gráfico 2- Análise do score de expressão dos tecidos malignos para a proteína ATM.

Tabela 13- Análise entre o score de malignos versus benignos para a proteína ATM.

AP	Positivo (3-7)	Negativo (0-2)	Total
Maligno	153 (56%)	120 (44%)	273
Benigno	64 (60%)	42 (40%)	106

Não há diferença significativa entre a expressão da proteína ATM entre tecidos malignos (56%) e os benignos (60%) ($p=0.4883$).

Tabela 14- Análise entre o score de expressão da proteína ATM dos CP versus CF.

AP	Positivo (3-7)	Negativo (0-2)	Total
CP	140 (61%)	91 (39%)	231
CF	13 (31%)	29 (70%)	42

Observamos que a expressão protéica de ATM é mais freqüente entre os CP (61%) do que nos CF (31%) ($p=0.0006$; $OR=3.432$; 95% CI: 1.695-6.950).

Tabela 15- Análise entre o score de expressão da proteína ATM dos CPC versus CP variantes.

AP	Positivo (3-7)	Negativo (0-2)	Total
CPC	90 (63%)	52 (37%)	142
CP Variantes	50 (56%)	39 (44%)	89

A expressão foi observada em ambos os grupos, 63% dos CPC e 56% dos CP variantes, não havendo, portanto diferença significativa ($p=0.3329$).

Embora pacientes classificados como no estadio II sejam positivos para ATM em 71% dos casos, não encontramos diferença entre diferentes estadios em relação à positividade para ATM ($p=0.5002$) como mostra o gráfico3.

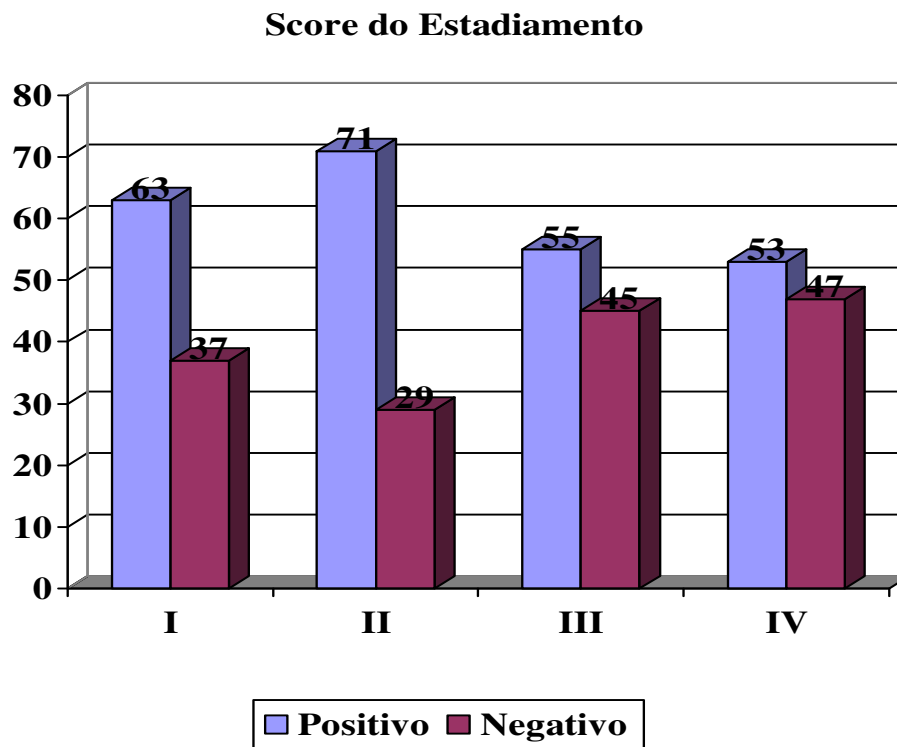


Gráfico 3- Análise descritiva do score dos pacientes segundo o estadiamento para a proteína ATM.

A análise da regressão logística múltipla ajustada para sexo e faixa etária demonstrou que a expressão da proteína ATM foi mais frequente entre os pacientes que não tinham metástase ao diagnóstico (81%) quando comparado com a com os pacientes que tiveram metástase ao diagnóstico (55%) ($p=0.016$; $OR=2.904$; $95\%IC= 1.219-6.919$) como mostra o gráfico 4.

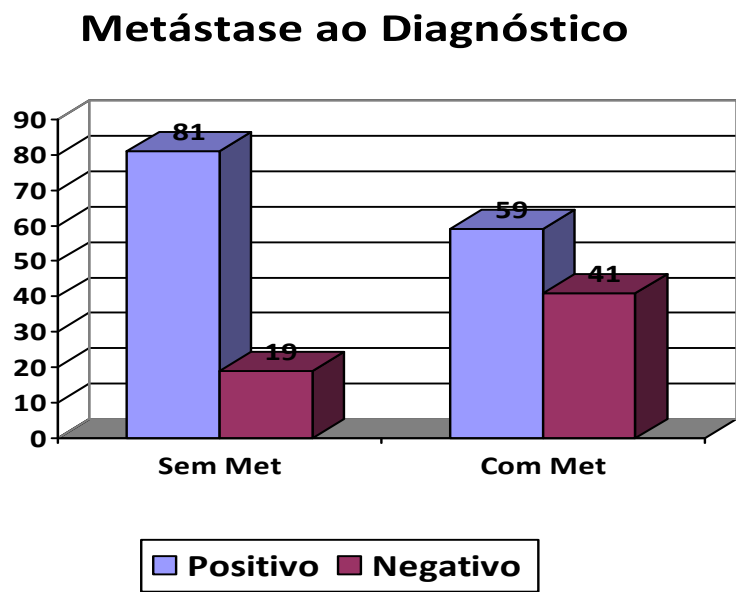


Gráfico 4- Análise descritiva do score dos pacientes com metástase ao diagnóstico para a proteína ATM.

Da mesma forma, análise de regressão logística múltipla ajustada para sexo e faixa etária mostrou que a expressão da proteína ATM foi mais freqüente entre os pacientes que não tinham metástase na evolução (63%) do que nos pacientes que tiveram metástase na evolução (46%) ($p=0.0276$; $OR=2.936$; $95\%IC\ 1.126-7.657$) como mostra o gráfico 5.

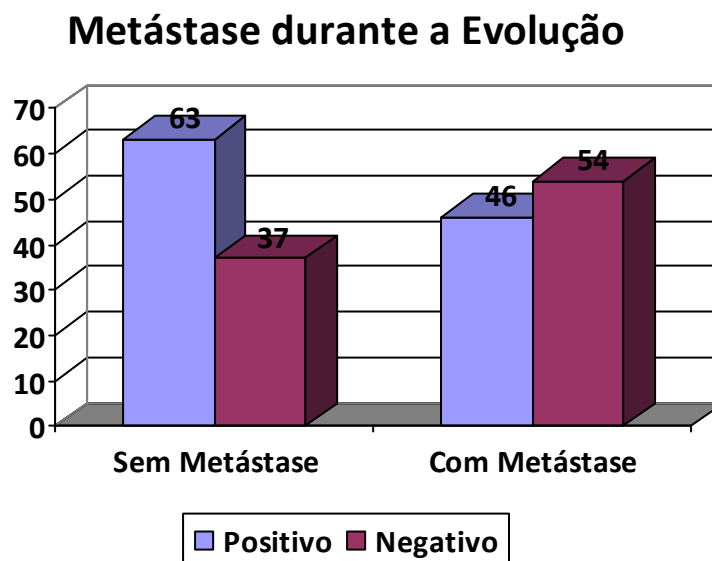


Gráfico 5- Análise descritiva do score dos pacientes com metástase durante a evolução para a proteína ATM.

Obviamente, também observamos uma maior frequência de expressão da proteína ATM nos pacientes que evoluíram livres de doença (63%) quando comparados com os pacientes que tiveram pior evolução (46%), segundo regressão logística múltipla ajustada para sexo e faixa etária ($p=0.0276$; $OR=2.936$; $95\% \text{ IC } 1.126-7.657$) como mostra o gráfico 6.

Conclusão Clínica

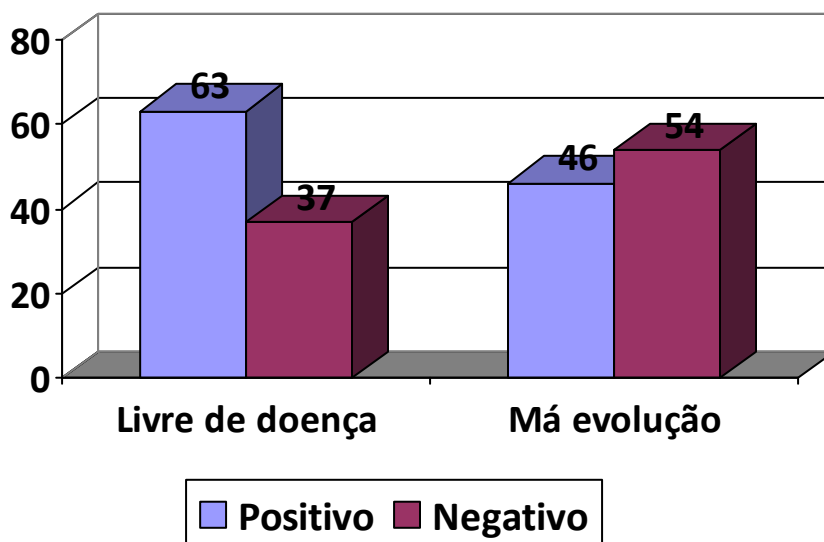


Gráfico 6- Análise descritiva do score dos pacientes segundo a conclusão clínica para a proteína ATM.

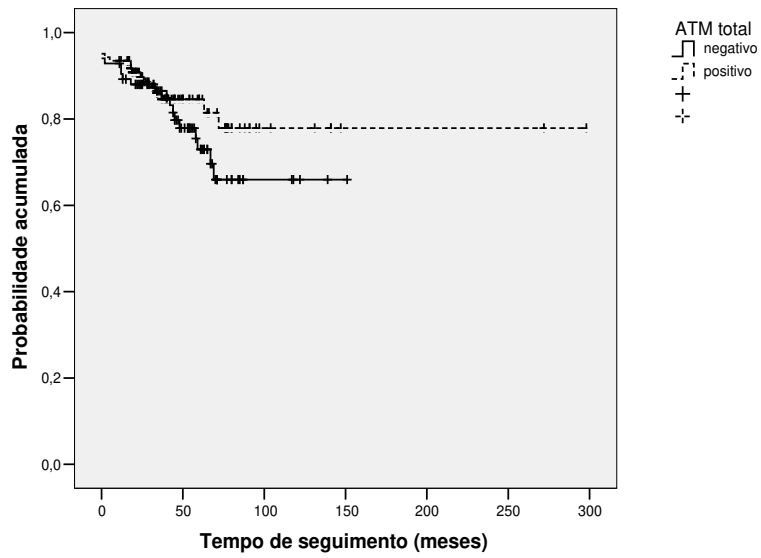


Figura 10- Curva de Kaplan-Meier para a probabilidade livre de doença considerando-se a expressão de e ATM (score positivo ou negativo).

A expressão de ATM não se correlaciona com a probabilidade livre de doença como mostra a curva de Kaplan-Meier (teste de Breslow, $p=0.587$).

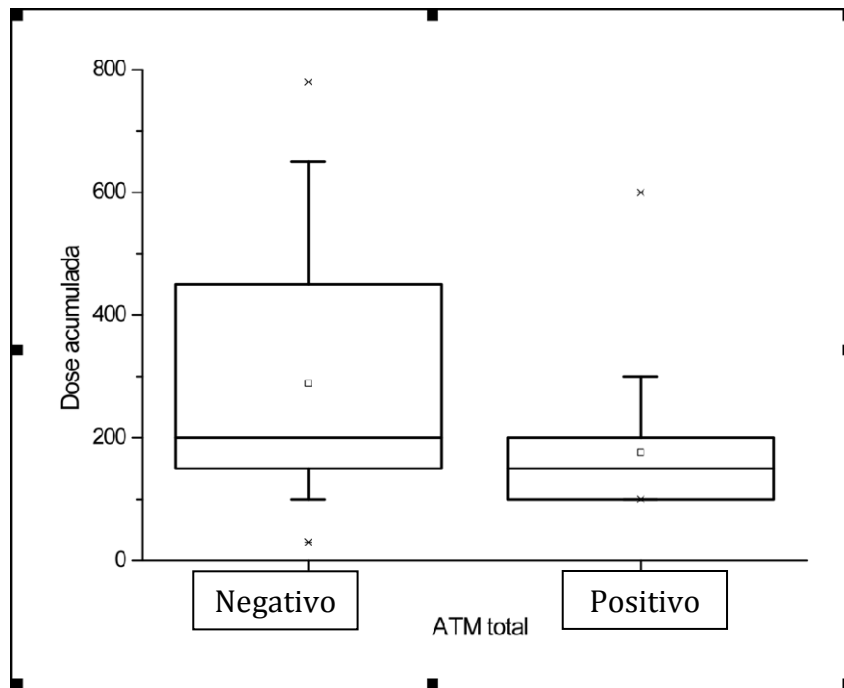


Figura 11- Análise do total (score) da expressão de ATM pelo gráfico de Box plot em relação à dosagem acumulada de radiodo.

Os pacientes que tomavam sucessivas doses de radiodo mais frequentemente não expressavam a proteína ATM ($p=0.0453$).

4.1.4- Imunoistoquímica para a proteína PTEN

Houve clara distinção entre positividade para PTEN (Figuras 12. B e C) e ausência da proteína (Figura 12. D). A expressão de PTEN foi identificada em 185/235 (78,7%) dos pacientes com CDTs e foi negativa em 50/235 (21,3 %) dos casos, como mostra a Tabela 16.

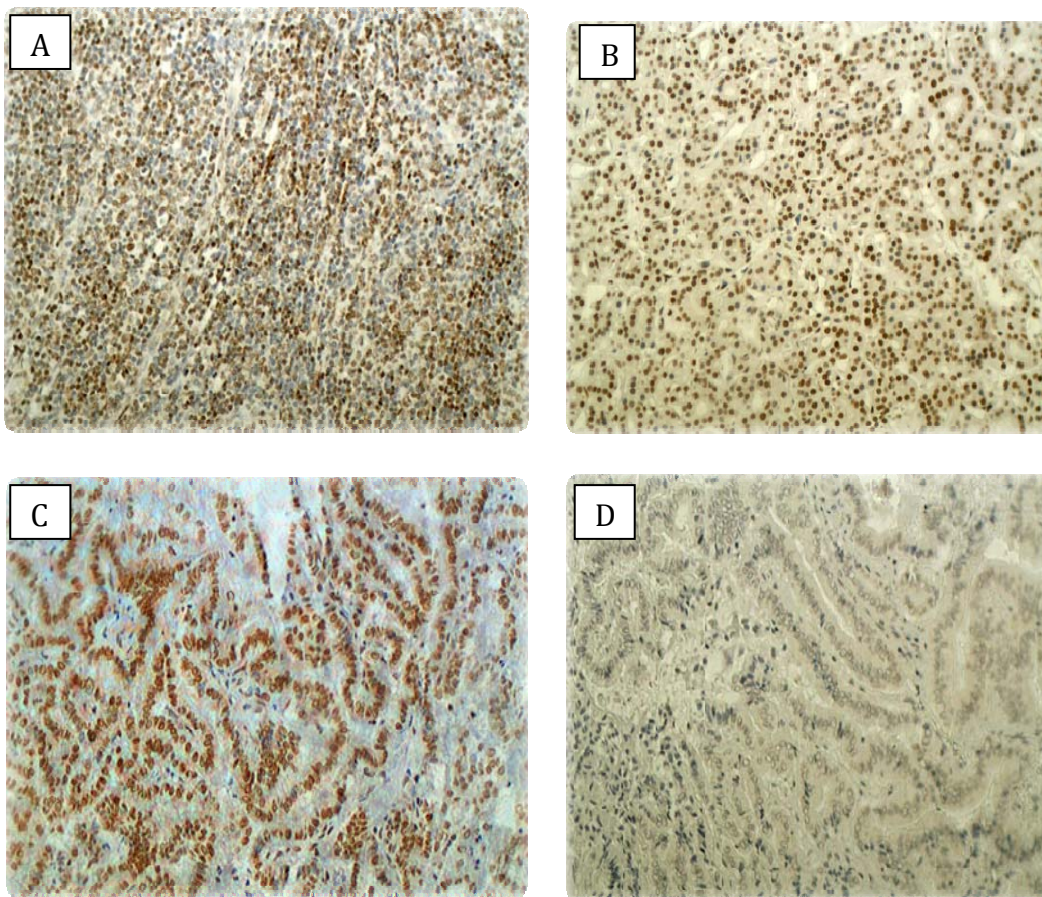


Figura 12- Expressão nuclear da proteína PTEN em: A. tonsila (controle positivo); B. carcinoma folicular positivo (+); C. carcinoma papilífero positivo (+); D. carcinoma papilífero negativo (-) (figura A, aumento de 400X; B,C e D aumento de 200X).

4.1.5- Tecidos normais e tecidos benignos

A expressão de PTEN foi identificada em 14/18 (77,8%) dos tecidos normais, 39/56 (69,6%) dos AF e 49/60 (81,7%) dos bócios como mostra na tabela 16. Já em relação a intensidade, 6/14 (42,8%) dos tecidos normais e 16/39 (41%) dos AF eram intensos e 20/49 (40,8%) dos bócios eram fracos (tabela 17).

Tabela 16- Análise descritiva da porcentagem de coloração das células para a proteína PTEN.

AP	0	1-25%	25-50%	50-75%	75-100%	Total
Tecido normal	4 (22.23%)	11 (61.12%)	2 (11.12%)	1 (5.56%)	0	18
AF	17 (30.35%)	9 (16.07%)	9 (16.07%)	10 (17.85%)	11 (19.64%)	56
Bócio	11 (18.34%)	20 (33.34%)	17 (28.34%)	9 (15%)	3 (5%)	60
CPC	26 (22.03%)	10 (8.47%)	14 (11.86%)	16 (13.56%)	52 (44.07%)	118
CPVF	16 (25.81%)	5 (8.06%)	11 (17.74%)	8 (12.90%)	22 (35.48%)	62
CPVA	2 (14.29%)	0	3 (21.43%)	4 (28.57%)	5 (35.71%)	14
CF	6 (14.63%)	3 (7.32%)	4 (9.76%)	8 (19.51%)	20 (48.78%)	41

A prevalência de porcentagem de coloração foi distribuída nos diferentes tecidos da seguinte forma: 11/18 (61%) dos tecidos normais e 20/60 (33.3%) dos bócios eram em sua maioria (1-25%) das células coradas; 17/56 (30.35%) dos AF eram negativos; 52/118 (44%) dos CPC, 22/62 (35.5%) dos CPVF, 5/14 (35.7%) dos CPVA e 20/41 (48.8%) eram em sua maioria (75-100%) das células coradas.

Tabela 17- Análise descritiva da intensidade de coloração para a proteína PTEN.

AP	Fraco	Moderado	Intenso	Total
Tecido normal	5 (27.78%)	3 (16.67%)	6 (33.34%)	18
AF	5 (8.92%)	18 (32.14%)	16 (28.57%)	56
Bócio	20 (33.34%)	15 (25%)	14 (23.34%)	60
CPC	22 (18.64%)	20 (16.95%)	50 (42.37%)	118
CPVF	10 (16.13%)	12 (19.35%)	24 (38.71%)	62
CPVA	4 (28.57%)	2 (14.29%)	6 (42.86%)	14
CF	7 (17.07%)	13 (31.71%)	15 (36.59%)	41

Observamos a prevalência da intensidade intensa em todas as variáveis sendo: (33,3%) dos tecidos normais, (28,6%) nos AF, (23,3%) nos bóciolos, (42,4%) nos CPC, (38,7%) nos CPVF, (42,9%) nos CPVA e (36,6%) nos CF.

A soma da positividade com a intensidade de coloração onde atribuímos o score (p=0.2308), encontramos que os tecidos normais distribuíram-se de forma similar, enquanto que 66% dos AF e 52% dos bócios foram positivos, como mostra o gráfico 7.

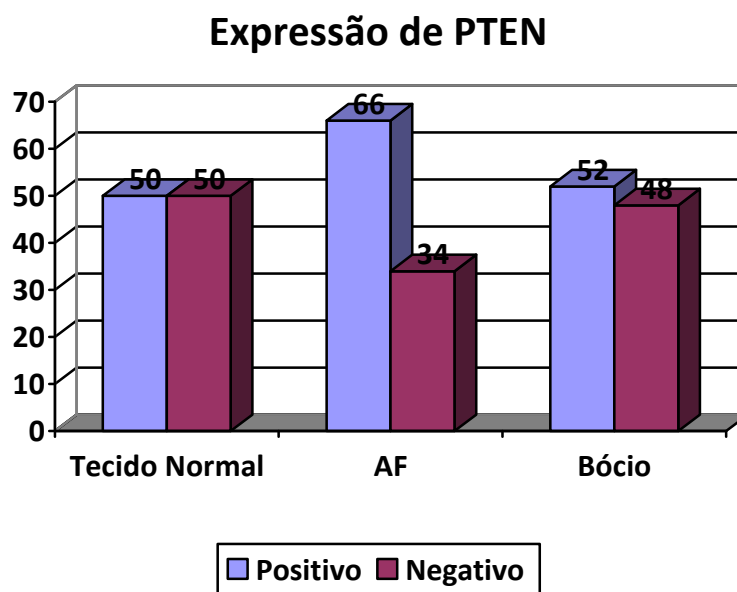


Gráfico 7- Análise do score da expressão da proteína PTEN em relação aos tecidos benignos e normais.

4.1.6- Tumores malignos

Apresentaram expressão da proteína PTEN: 92/118 (78%) dos CPC; 46/62 (74,2 %) dos CPVF; 12/14 (85,7 %) dos CPVA e 35/41 CF (85,4%) como mostra a tabela 16. A intensidade da coloração mostrou que 50/92 CPC (54,3%), 24/46 CPVF (52,2%), e 6/12 CPVA (50%) e 15/35 CF (42,8%) eram em sua maioria intensos (tabela 17).

O score atribuído para estas variáveis (positividade e intensidade) nos tecidos malignos mostra que em sua maioria são positivos: 69% dos CPC; 69% dos CPVF, 86% dos CPVA e 83% dos CF como está representada no gráfico 8.

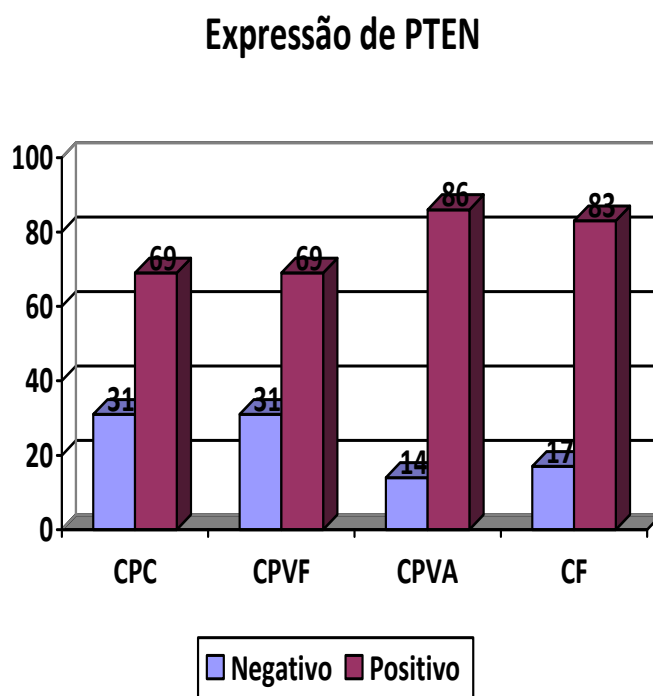


Gráfico 8- Análise descritiva do score de expressão nos CDTs para a proteína PTEN.

A comparação entre diferentes subtipos histológicos do CP mostra número de células coradas similar ($p=0.7392$; tabela 16) e coloração de intensidade similar ($p=0.6646$; tabela 17). O score confirma que a expressão de PTEN não distingue as diferentes variantes do CP nem o CP do CF (gráfico 8).

Tabela 18- Expressão protéica de PTEN segundo o score, entre malignos versus benignos.

AP	Positivo (3-7)	Negativo (0-2)	Total
Maligno	171 (73%)	64 (27%)	235
Benigno	40 (51%)	38 (49%)	78
Total	211 (67%)	102 (33%)	313

Comparando a expressão da proteína PTEN nos malignos versus benignos, encontramos significância na positividade em 73% nos malignos ($p=0.007$; OR= 2.538; 95% CI: 1.496-4.308).

Tabela 19- Análise do score entre grupos de CP versus CF para a proteína PTEN.

AP	Positivo (3-7)	Negativo (0-2)	Total
CP	137 (71%)	57 (29%)	194 (83%)
CF	34 (83%)	7 (17%)	41 (21%)

Não houve diferença significativa na expressão de PTEN nos CP (71% positivo) e CF (83% positivo) ($p=0.1248$).

Tabela 20- Análise do score entre grupos de CPC versus CP variantes para a proteína PTEN.

AP	Positivo (3-7)	Negativo (0-2)	Total
CPC	82 (69%)	36 (31%)	118 (61%)
CP Variantes	55 (72%)	21 (28%)	76 (39%)

Também não houve diferença significativa entre os CPC (69% positivo) e CP de formas histológicas variantes (72% positivo) ($p=0.7475$).

A expressão de PTEN ocorre de forma similar em todos os estadios dos pacientes com CDTs: I com 72%, II com 83%, III com 71% e IV com 66% ($p=0.6031$) como mostra o gráfico 9.

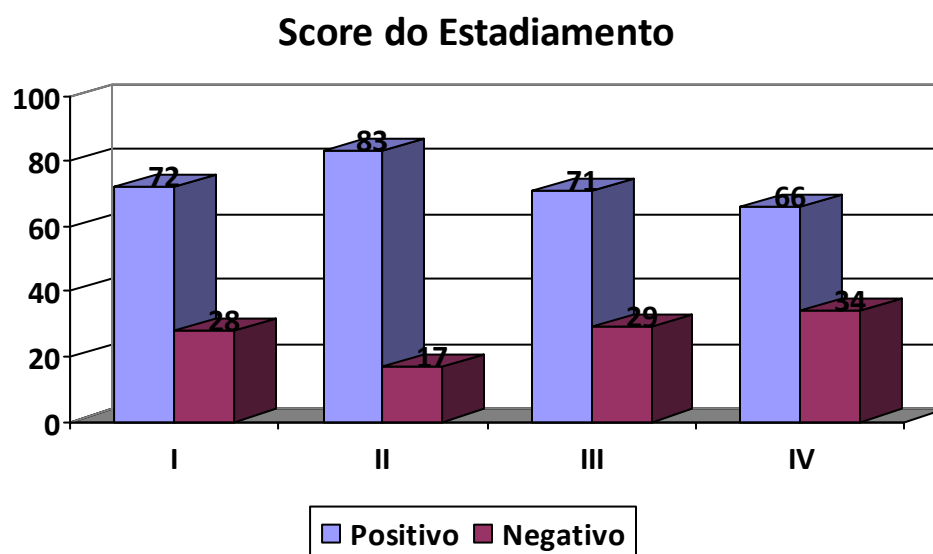


Gráfico 9- Análise descritiva do score de expressão segundo o estadiamento dos pacientes para a proteína PTEN.

A expressão de PTEN também foi similar em pacientes de tumores mais ou menos agressivos ao diagnóstico, como mostra o gráfico 10 ($p= 0.2779$).

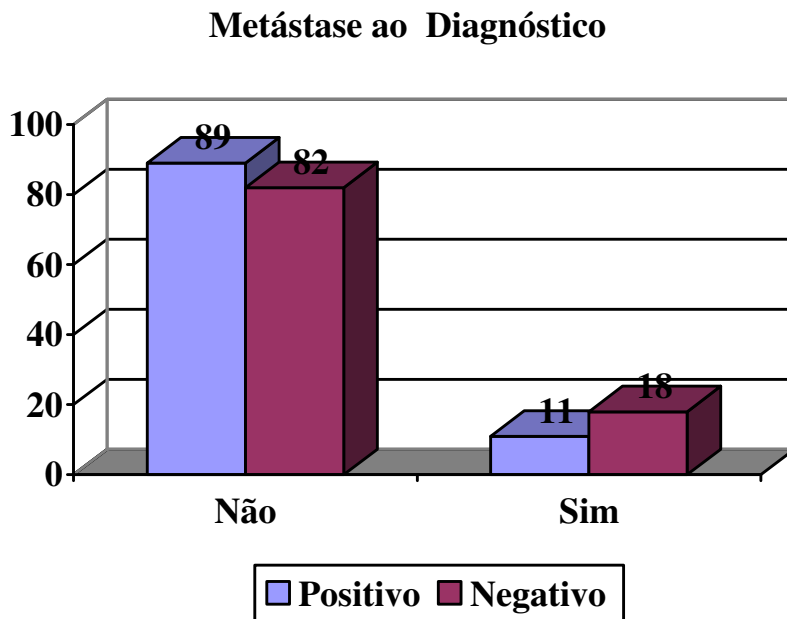


Gráfico 10- Análise descritiva do score de expressão referente à metástase ao diagnóstico dos pacientes com CDTs para a proteína PTEN.

Quando comparamos a expressão de PTEN tampouco distinguiu os pacientes que não tiveram metástase durante a evolução dos que tiveram ($p=0.1101$), como mostra o gráfico 11. No entanto, a regressão logística múltipla mostra maior expressão de PTEN nos pacientes que não tiveram metástase durante a evolução ($p=0.0437$). Por conseguinte, a expressão de PTEN é significativamente maior entre os pacientes livres de doença ($p= 0.0437$ regressão logística múltipla), como mostra o gráfico 12.

Metástase durante a Evolução

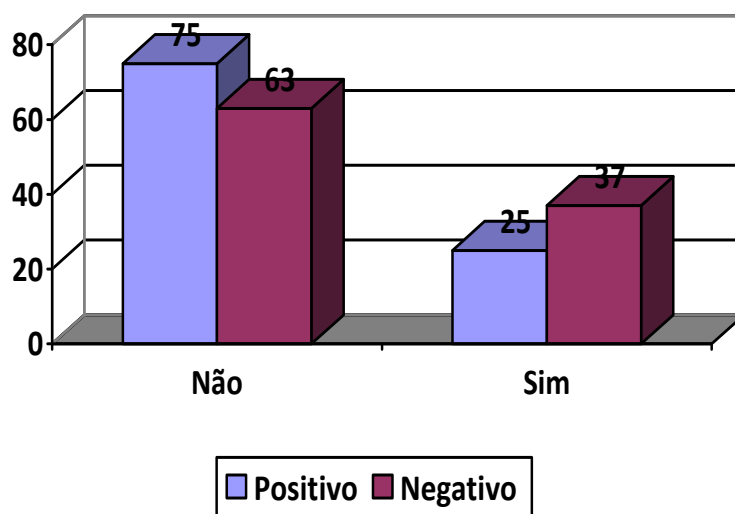


Gráfico 11- Análise descritiva do score de expressão para a proteína PTEN referente a pacientes que tiveram ou não metástase durante a evolução.

Conclusão Clínica

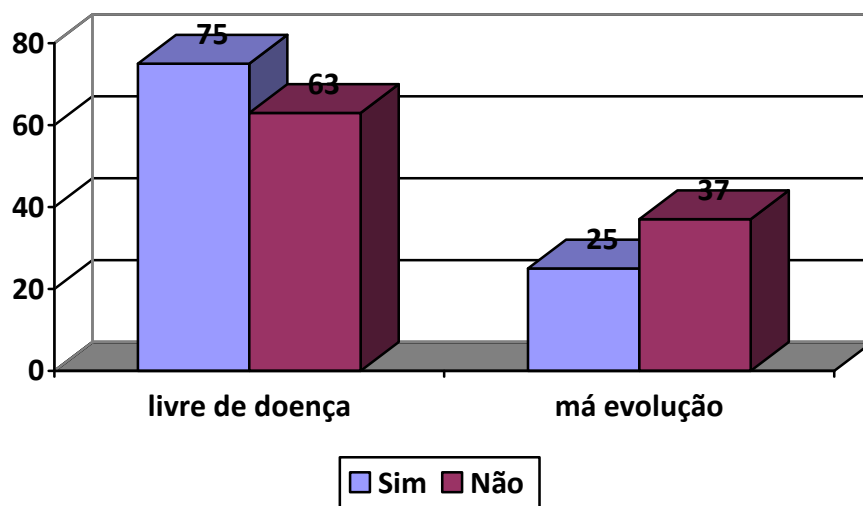


Gráfico 12- Análise do score segundo a conclusão clínica dos pacientes (livre de doença versus má evolução) para a proteína PTEN.

4.2- Resultados de Real-Time PCR

Dos 87 casos de CP clássicos estudados, 80 deles foram os mesmos casos estudados em IHQ e os restantes provenientes do centro médico. A média de tempo de seguimento foi de 21,96 meses ($\pm 11,69$). Havia 77 (88,5%) do sexo feminino e 10 (11,5%) do sexo masculino, sendo a média de idade de 43,88 anos ($\pm 12,96$)

Destas amostras houve apenas 1 caso de óbito causada por metástase de linfonodo.

4.2.1- Análise dos resultados de quantificação relativa de mRNA para o gene ATM

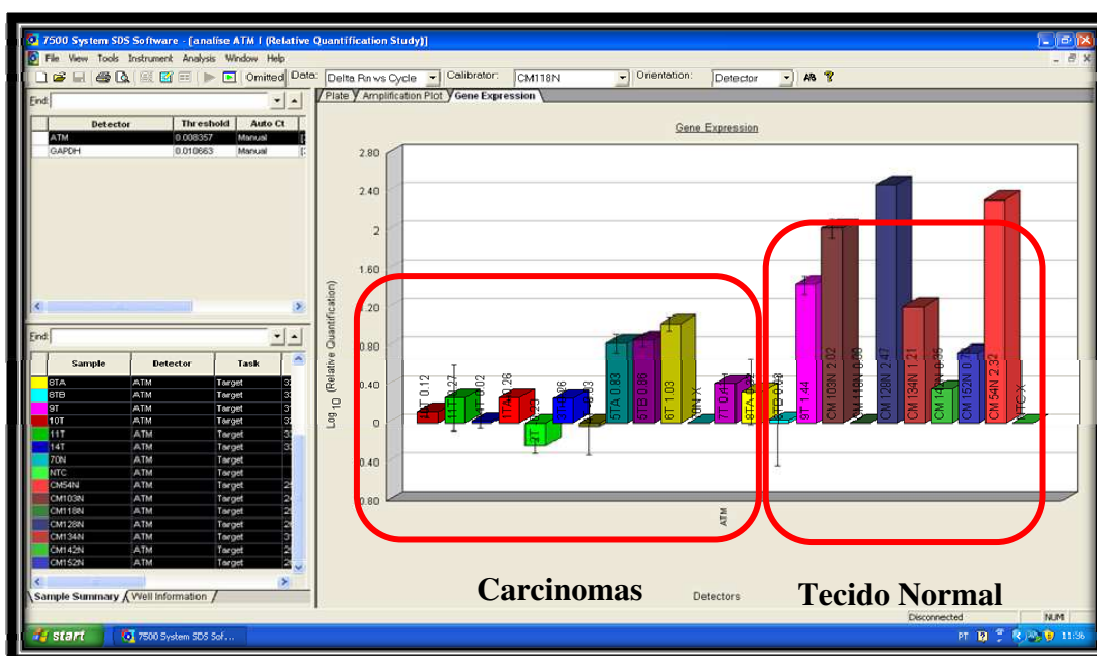


Figura 13- Análise da expressão relativa dos tecidos normais e carcinoma papilífero da tireóide para o gene ATM.

Observamos uma alta expressão de mRNA do gene ATM nos tecidos normais em relação aos carcinomas como exemplifica a *figura 16* que mostra resultados de uma placa de análise do programa 7500 System SDS software.

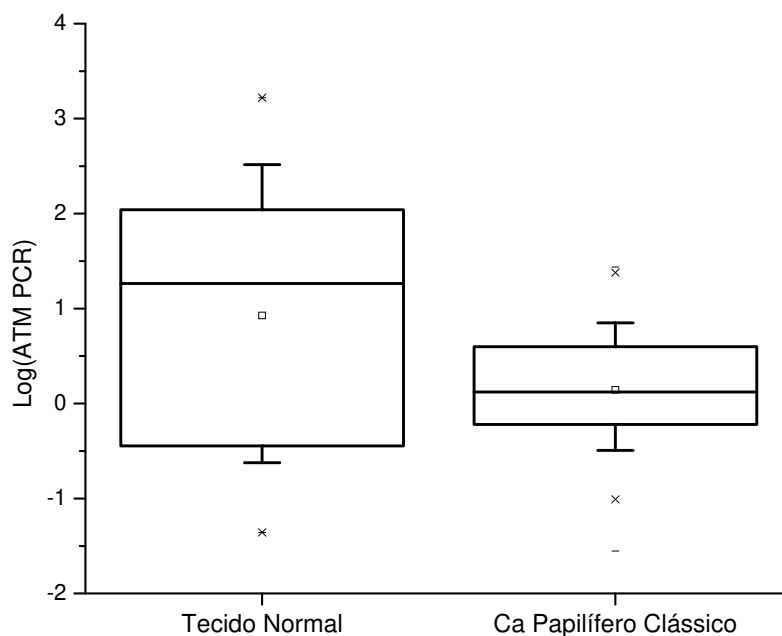


Figura 14- Análise da expressão de todos os casos de mRNA de ATM em tecido normal e CPC.

Os valores em log mostram que tanto a média (1.3) quanto a máxima (2.0) da expressão relativa de mRNA é maior nos tecidos normais em relação aos CPC (0.1 e 0.5 respectivamente).

Tabela 21- Análise da expressão relativa de mRNA entre os diferentes grupos de carcinoma papilífero para o gene ATM.

AP	N	Média	Máxima	p-valor
CPC	51	0.8	27.3	0.0091
CPVF	20	2.1	21.9	
CPVA	1	0.8	0.8	

Observamos que a média de expressão de ATM no grupo dos CPVF é mais elevada em relação aos demais tipos histológicos ($p=0.0091$ Mann-Whitney).

4.3- Resultados dos polimorfismos estudados de ATM

Nos 199 pacientes com câncer estudados, 166 (83.4%) eram do sexo feminino e 33 (16,6%) do sexo masculino, sendo 162 (81,4%) de etnia branca e 37 (18,6%) não branco. A média de idade foi de 41,74 ($\pm 15,5$) anos e a média do tempo de seguimentos dos pacientes foi de 80,6 ($\pm 63,5$) meses.

4.3.1- Polimorfismo D1853N

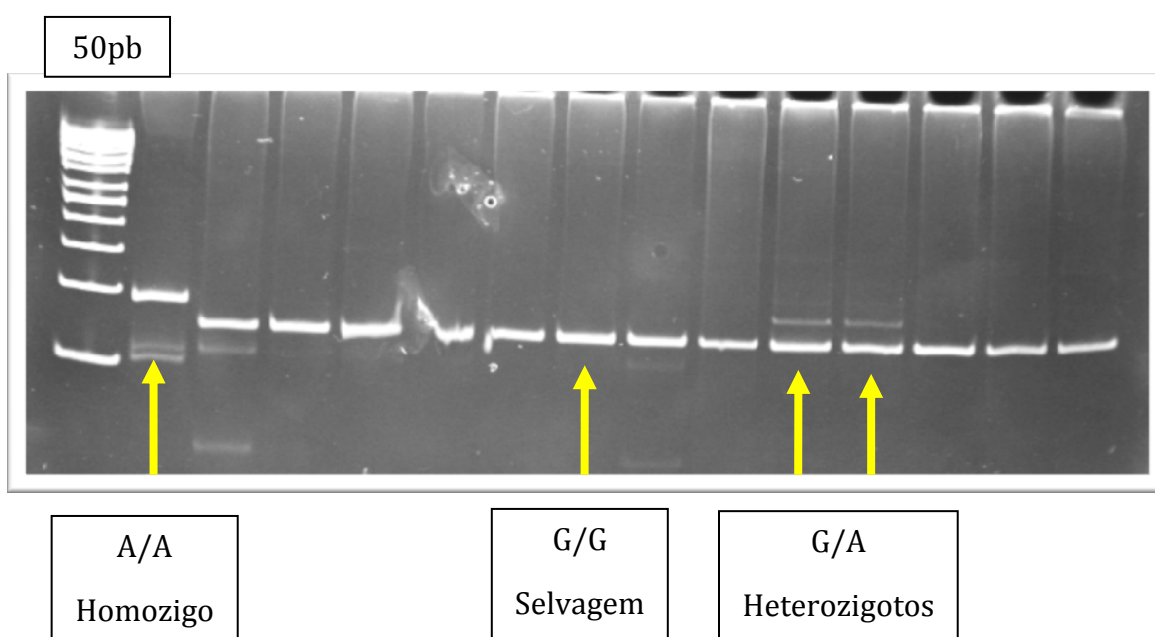


Figura 15- Gel de poliacrilamida 12% referente à variante D1853N demonstrando indivíduos: selvagens (69 e 19pb), heretozigotos (88, 69 e 19pb) e homozigotos (88pb). Neste caso a enzima usada somente cliva os alelos selvagens

Tabela 22- Análise do polimorfismo D1853N entre os grupos controles e câncer.

D1853N	Controles	Câncer	Total
Selvagem G/G	163 (49%)	173 (51%)	336 (84%)
Heterozigoto G/A	37 (64%)	21 (36%)	58 (14%)
Homozigoto A/A	1 (50%)	1 (50%)	2 (2%)
Total	201	195	396

O alelo heterozigoto é mais prevalente entre os controles (64%) do que nos indivíduos com câncer (36%) ($p=0.0364$; $OR=0.5455$, 95% $CI:0.3094-0.9618$), o que demonstra ser um polimorfismo de proteção dentro da população por nós estudada.

4.3.2- Polimorfismo S707P

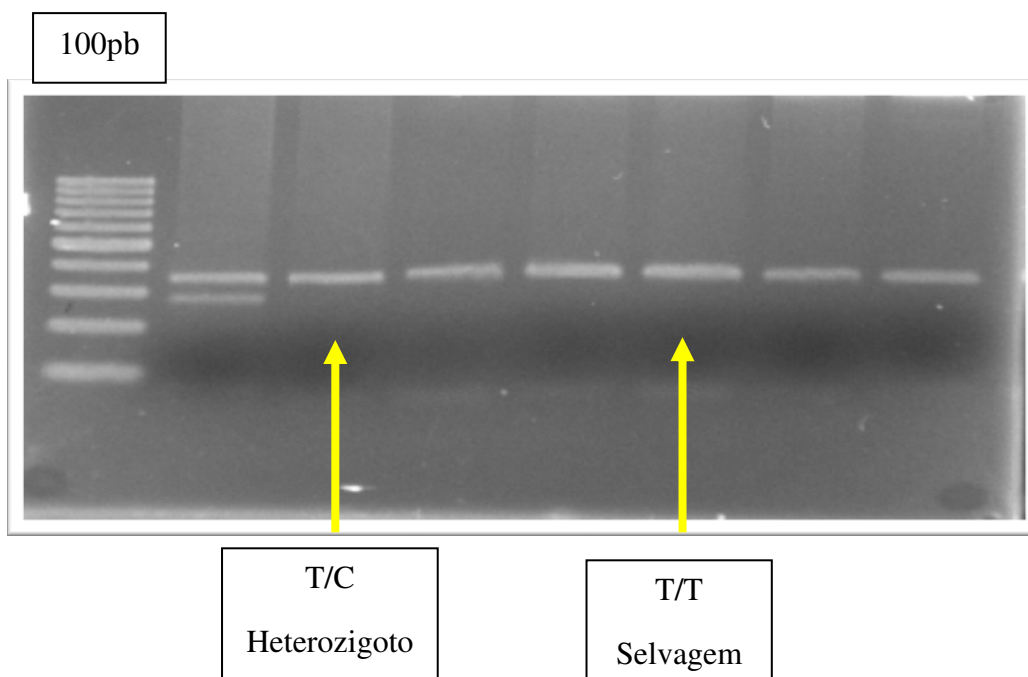


Figura 16- Gel de agarose 2% referente à variante S707P demonstrando indivíduos selvagens (351pb) e heterozigotos (351, 277 e 74pb) tendo como referencia o ladder de 100pb.

Tabela 23- Análise do polimorfismo S707P entre os grupos controles e câncer.

S707P	Controles	Câncer	Total
Selvagem	207	179	386
T/T	(54%)	(46%)	(97%)
Heterozigoto	4	7	11
T/C	(36%)	(64%)	(2%)
Homozigoto	0	0	0
C/C			
Total	211	186	397

Não encontramos diferença significativa dos alelos alterados no grupo controle e câncer ($p=0.258$). Não encontramos em nossas amostras nenhum indivíduo portador do alelo homozigoto e apenas 11 indivíduos portadores do alelo heterozigoto sendo 4/211 (36%) nos controles e 7/186 (64%) nos cânceres.

4.3.3- Polimorfismo S49C

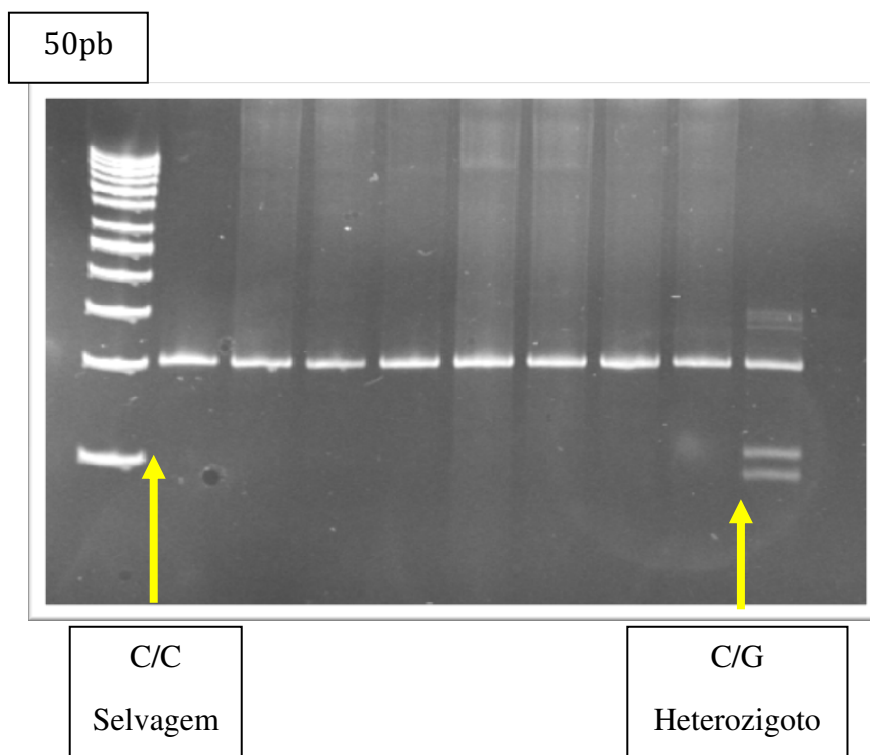


Figura 17- Gel de poliacrilamida 12% referente à variante S49C demonstrando indivíduos selvagens (97pb) e heretozigotos (97, 52 e 45pb), tendo como referencia o ladder de 50pb.

Tabela 24- Análise do polimorfismo S49C entre os grupos controles e câncer.

S49C	Controles	Câncer	Total
Selvagem	216	195	411
C/C	(52%)	(47%)	(98%)
Heterozigoto	3	4	7
C/G	(43%)	(57%)	(2%)
Homozigoto	0	0	0
G/G			
Total	219	199	418

Não encontramos diferença significativa dos alelos alterados no grupo controle e câncer ($p=0.7132$). Não encontramos em nossas amostras nenhum indivíduo portador do alelo homozigoto e apenas 7 indivíduos portadores do alelo heterozigoto sendo 3/219 (43%) nos controles e 4/199 (57%) nos cânceres.

Todas as outras variáveis clínicas e anátomopatológicas (multifocalidade, tireoidite, invasão, estadiamento, metástase a distância, metástase tardia, dose ablativa e conclusão clínica) analisadas não mostraram correlação com os polimorfismos estudados para o gene ATM.

5- DISCUSSÃO



Nenhum grupo de fatores clínicos, cirúrgicos ou anatômicos é capaz de detectar com exatidão, em um determinado indivíduo, se este terá pior evolução, de forma que as classificações de prognóstico têm sido pouco usadas na prática clínica. Tem-se buscado intensamente marcadores moleculares que possam, ao lado dos clássicos parâmetros clínicos e anatomopatológicos, distinguir pacientes com tumores que poderiam evoluir de forma desfavorável daqueles com melhor prognóstico, e assim determinar um tratamento mais apropriado para cada indivíduo, minimizando os riscos cirúrgicos e o custo efetivo de cada tratamento (Ward & Assumpção, 2004). Pacientes de alto risco poderiam ser alvo de uma abordagem cirúrgica mais agressiva e de um seguimento mais próximo, em oposição à grande maioria de casos de bom prognóstico, ou baixo risco, que poderiam ser poupados de tais medidas (Mazzaferri & Jhiang, 1994; Zidan, 2000; Ward *et al.*, 2003).

Os danos causados pela quebra de dupla fita de DNA são os danos mais citotóxicos que uma célula humana pode sofrer, podendo desencadear o processo de tumorigênese quando não identificados e reparados corretamente. Genes envolvidos nos reparos aos danos no DNA, checagem do ciclo celular, responsáveis pela proliferação e sobrevivência celular e que, portanto desempenham importantes papéis na manutenção da estabilidade genômica são amplamente estudados em diferentes tipos de câncer. Para elucidar a importância das proteínas quinases ATM e PTEN nos carcinomas diferenciados da tireóide estudamos a expressão protéica de ambas, assim como a análise da frequência de três polimorfismos do gene *ATM* e sua expressão relativa de mRNA nos tumores.

Nossos achados inéditos em câncer de tireóide demonstram que a ausência de expressão protéica de ATM foi mais frequente nos CF em 70% (29/42) e que nos CP houve uma maior expressão em 61% (140/231) ($p=0.0006$; tabela 14). Apesar da diferença na expressão dos diferentes carcinomas, não houve diferença entre os tecidos benignos e malignos assim como nos, CP clássicos e variantes (tabela 13 e 15).

Em relação aos dados clínicos, observou-se uma positividade da proteína ATM no estágio II (71%) e ausência de expressão nos estádios III e IV (45 e 47% respectivamente) assim como em pacientes com maior agressividade e pior prognóstico, como metástase ao diagnóstico ($p=0.016$) e metástase durante a evolução ($p=0.0276$) (gráficos 3, 4 e 5). Outros estudos também demonstram esta correlação da baixa expressão

de ATM a piores prognóstico, porém em outros tipos de tumores como: em câncer gástrico de pior diferenciação, metástase de linfonodos e baixa sobrevida ($p < 0.05$) (Kang *et al.*, 2008), infiltração de ducto de mama e diferenciação celular (Cuatrecasas, *et al* 2006), TNM mais avançados em câncer de próstata, pulmão e bexiga (Fan *et al*, 2006) e expressão reduzida ou ausente na maioria dos cânceres de mama com metástase (10/14) (Angelè S *et al.*, 2000).

Como o gene ATM está no topo da cascata de ativação das demais vias que são recrutadas para reparar o dano ao DNA, sua inativação influencia, portanto na progressão tumoral e sobrevivência celular. Sua ativação mediante a indução da quebra de dupla fita causada pela radiação ionizante também demonstrou ter correlação com os nossos achados entre o grupo dos pacientes que tinham a expressão protéica de ATM foram tratadas com menos doses acumulativas de radiodo, já que este estando ativo teoricamente repararia os danos celulares e, contudo responderia melhor ao tratamento com radiodo.

A expressão relativa de mRNA do gene ATM foi menor em carcinomas em relação aos tecidos normais o que não é observado na expressão protéica. Esta diferença pode estar associada a mecanismos pós-transcricionais ou mesmo na sua localização celular. Kang *et al*, 2008, estudou a expressão de mRNA, proteína e fosforilação de ATM em tumores gástricos e observou uma baixa expressão de mRNA em tumores (30/40) e alta expressão protéica em tecidos normais (13/20). A imunocoloração encontrada, foi citoplasmática e nuclear que como sabemos, dependendo da sua localização sua atividade funcional é distinta. No citoplasma a proteína ATM interage com os peroxissomos, mas sua importância ainda é desconhecida, já no núcleo sua interação com o complexo MRN promove a checagem do ciclo celular e reparo ao dano no DNA (Lavin *et al*, 2008). Em nosso estudo observamos apenas localização nuclear da proteína ATM em todos os tecidos analisados. A média na expressão de mRNA nos diferentes carcinomas papilíferos (CPC, CPVF e CPVA) foi maior entre as variantes foliculares (média de 2.1) ($p = 0.0091$, tabela 21).

Na análise dos polimorfismos estudados, todos do tipo missense, encontramos uma frequência maior do genótipo heterozigoto na variante D1853N em controles (37/201) (tabela 22). A troca do aminoácido ácido aspartâmico por asparagina (SNP 557 G/A) desta

variante afeta sua conformação protéica e sua interação com a proteína Rad 3. Ainda não se sabe ao certo os mecanismos envolvidos desta interação e sua importância, havendo a necessidade de mais estudos para correlacionar o nosso achado que sugere ser uma variante de proteção ao câncer de tireóide ($p=0.0364$; $OR=0.544$).

Nos demais polimorfismos Ser49Cys e Ser707Pro encontramos poucos genótipos heterozigotos tanto nos controles (3/219 e 4/211 respectivamente) como nos indivíduos com câncer (4/199 e 7/186 respectivamente) e nenhum genótipo homozigoto, não apresentando, portanto significância nenhuma com nossos dados clínicos ou anatomo-patológico. Contudo, mais de 300 alterações na sequência no gene *ATM* foram descritas a partir de estudos feitos em pacientes portadores de A-T (Team Medicine online³). Estima-se que 70% resultam em truncamento da proteína e 30% são do tipo missense tendo correlação com o risco de desenvolvimento de câncer (Khanna, 2000; Telatar *et al*, 1998; Mitui *et al*, 2009 e Thompson *et al*, 2005).

Apesar de não encontrarmos uma frequência significativa nos demais polimorfismos, outros estudos mostraram que o genótipo heterozigoto para o polimorfismo Ser49Cys foi mais frequente em pacientes com câncer de mama (5/75, $p=0.006$) (Buchholz *et al*, 2004), assim como o genótipo heterozigoto para o polimorfismo Ser707Pro foi mais frequente em pacientes com câncer de tireóide (1/5, $p=0.01$) (Dombernowsky *et al*, 2008).

O gene supressor tumoral PTEN, quando não funcional ou de maneira errônea (mutações e deleções) predispõe ao risco no desenvolvimento de câncer de mama e tireóide (Bruni *et al*, 2000 e Di Cristofano *et al*, 1998). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o gene PTEN pode tanto induzir a célula a apoptose celular como a sobrevivência celular (Furnari *et al*, 1997 e Cheney *et al*, 1999).

A expressão protéica de PTEN foi mais prevalente entre os tecidos malignos (171/235) do que em benignos (40/78) ($p=0.007$, tabela 18). Não houve diferença significativa entre os CP e CF assim como entre os CP clássico e CP variantes (tabela 19 e tabela 20). Através da análise de regressão logística múltipla, encontramos correlação da

³ <http://www.vmmc.org/vmrc/atm.htm>

expressão de PTEN em pacientes que não tiveram metástase durante a evolução e que estavam livres de doença (115/153, gráfico 11 e 12).

A correlação da expressão protéica de PTEN em diferentes tipos de câncer é bastante contraditória em virtude da análise dos resultados, número insuficiente de amostras, anticorpo inespecífico e localização celular distinta da proteína. Mutter *et al*, 2000 analisou apenas a intensidade de coloração da proteína em câncer endometrial que localizava-se tanto em citoplasma como no núcleo e observou ausência de expressão em 61% dos indivíduos com câncer. Já outro estudo feito em câncer de tireóide que também analisou apenas a intensidade de coloração, mas que considerou em sua análise a localização celular citoplasmática e nuclear da proteína PTEN, demonstrou haver diferença na interpretação de seus resultados visto que no núcleo a intensidade é mais fraca em CP (78%) em relação ao citoplasma (33%) (Gimm *et al*, 2000).

Outro estudo que adotou o mesmo parâmetro de análise que o nosso, porcentagem de coloração e intensidade das células coradas, em tumores de tireóide, mostrou que a localização da proteína PTEN é em sua maioria citoplasmática (Di Loreto *et al*, 2004). Chung et al, 2005 tentando compreender a diferença na localização celular da proteína PTEN, descobriu em seu estudo que uma outra proteína, a Major Vault Protein (MVP), é responsável pelo transporte da proteína PTEN para o núcleo. A partir de sua descoberta ele também pode confirmar que sua localização nuclear é responsável pelo crescimento celular, já no citoplasma, a proteína é responsável pela replicação celular.

Em nossos achados a proteína PTEN foi predominantemente nuclear e sua positividade maior entre os tecidos malignos em relação aos benignos, assim como em pacientes que não tinham metástase ao diagnóstico sugere que sua atividade funcional esteja combatendo a proliferação e sobrevivência celular, ou seja, o processo de tumorigênese das células tireoidianas.

6- CONCLUSÃO

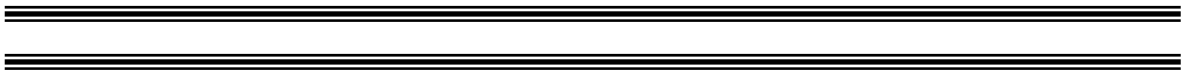


Demonstramos em nossos achados que:

- a baixa expressão da proteína ATM é prevalente no grupo de carcinomas foliculares assim como em pacientes com pior prognósticos como metástase ao diagnóstico e na evolução;
- pacientes com alta expressão da proteína ATM necessitaram de menores doses acumulativas de radiodo;
- a expressão quantitativa do gene *ATM* foi menor entre os carcinomas papilíferos em relação aos tecidos normais e a média da expressão entre os carcinomas foi maior no grupo dos carcinomas papilíferos variante folicular;
- o genótipo heterozigoto do polimorfismo D1853N foi mais prevalente entre os controles;
- alta expressão da proteína PTEN foi observada entre os tecidos malignos;
- baixa expressão da proteína PTEN foi observada em pacientes com pior prognóstico como metástase durante a evolução.

Contudo sugerimos que estudos imunocitoquímicos das proteínas ATM e PTEN possam auxiliar na avaliação clínica em pacientes com CDT, no entanto através da curva de Kaplan-Meier não foi possível determinar a probabilidade de pacientes livres da doença necessitando de um maior tempo de seguimento deste pacientes para atingir esta correlação. A busca de marcadores moleculares de prognóstico visa traçar um perfil de pacientes que tenham maior ou menor risco de cura e uma análise mais abrangente envolvendo outros genes supressores tumorais ainda é necessária para atingir resultados mais significativos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Angèle S, Treilleux I, Tanière P, Martel-Planche G, Vuillaume M, Bailly C, et al. Abnormal expression of the ATM and TP53 genes in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000 Sep;6(9):3536-44.

Akulevich NM, Saenko VA, Rogounovitch TI, Drozd VM, Lushnikov EF, Ivanov VK, et al. Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2009 Jun;16(2):491-503.

Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):355-65.

Brierley JD, Panzarella T, Tsang RW, Gospodarowicz MK, O'Sullivan B. A comparison of different staging systems predictability of patient outcome. Thyroid carcinoma as an example. *Cancer.* 1997 Jun 15;79(12):2414-23.

Bruni P, Boccia A, Baldassarre G, Trapasso F, Santoro M, Chiappetta G, et al. PTEN expression is reduced in a subset of sporadic thyroid carcinomas: evidence that PTEN-growth suppressing activity in thyroid cancer cells mediated by p27kip1. *Oncogene.* 2000 Jun 29;19(28):3146-55.

Buchholz TA, Weil MM, Ashorn CL, Strom EA, Sigurdson A, Bondy M, et al. A Ser49Cys variant in the ataxia telangiectasia, mutated, gene that is more common in patients with breast carcinoma compared with population controls. *Cancer.* 2004 Apr 1;100(7):1345-51.

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem.* 1982 Jul 10;257(13):7847-51.

Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Curr Opin Oncol.* 2006 Jan;18(1):77-82.

Costa SC, Nascimento LS, Ferreira FJ, Mattos PS, Camara-Lopes LH, Ward LS. Lack of mutations of exon 2 of the MEN1 gene in endocrine and nonendocrine sporadic tumors. *Braz J Med Biol Res.* 2001 Jul;34(7):861-5.

Cuatrecasas M, Santamaria G, Velasco M, Camacho E, Hernandez L, Sanchez M, *et al.* ATM gene expression is associated with differentiation and angiogenesis in infiltrating breast carcinomas. *Histol Histopathol.* 2006 Feb;21(2):149-56.

Cheney IW, Neuteboom ST, Vaillancourt MT, Ramachandra M, Bookstein R. Adenovirus-mediated gene transfer of MMAC1/PTEN to glioblastoma cells inhibits S phase entry by the recruitment of p27Kip1 into cyclin E/CDK2 complexes. *Cancer Res.* 1999 May 15;59(10):2318-23.

Chow LM, Baker SJ. PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Lett.* 2006 Sep 28;241(2):184-96

Chung JH, Ginn-Pease ME, Eng C. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):4108-16.

Czornak K, Chughtai S, Chrzanowska KH. Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J Appl Genet.* 2008;49(4):383-96.

Dahia PL, Aguiar RC, Alberta J, Kum JB, Caron S. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum. Mol. Genet.* 1999;8:185-193.

Dahia PL, Marsh DJ, Zheng Z, Zedenius J, Komminoth P, *et al.* Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. *Cancer Res.* 1997 Nov 1;57(21):4710-3.

Dennis, P. B & Thomas, G. Quick guide : target of rapamycin. *Curr Biol.* 2002 Apr 16;12(8):R269.

Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nature Genetics* (1998) 19, 348-357.

Dombernowsky SL, Weischer M, Allin KH, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Risk of cancer by ATM missense mutations in the general population. *J Clin Oncol.* 2008 Jun 20;26(18):3057-62.

Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1998; 10, 262-267.

Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol.* 2004 Apr;15(2): 177-82.

Ejima Y, Yang L, Sasaki MS. Aberrant splicing of the ATM gene associated with shortening of the intronic mononucleotide tract in human colon tumor cell lines: a novel mutation target of microsatellite instability. *Int J Cancer.* 2000 Apr 15;86(2):262-8.

Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat.* 2003 Sep;22(3):183-98.

Fan C, Quan R, Feng X, Gillis A, He L, Matsumoto ED, et al. ATM activation is accompanied with earlier stages of prostate tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Oct;1763(10):1090-7.

Frisk T, Foukakis T, Dwight T, Lundberg J, Hoog A, et al. Silencing of the PTEN tumor-suppressor gene in anaplastic thyroid cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002 Sep;35(1):74-80.

Furnari FB, Lin H, Huang HS, Cavenee WK. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov 11;94(23):12479-84.

Gatti RA, Tward P, Concannon, Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutation. *Mol. Genet. Metab.* 1999; **68** 419-423.

Gimm O, Perren A, Liang-Ping W, Marsh DJ, Yeh JJ, *et al.* Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *American Journal of Pathology* N°5 vol, May 2000:156: 1693-1700.

Ginn-Pease ME, Eng C. Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Res.* 2003 Jan 15;63(2):282-6.

Gu J, Tamura M, Yamada KM; Tumor supressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated ptoein (MAP) kinase signaling pathways. *J. Cell. Biol.*,1998; 143:1375-1383.

Gueven N, Becherel OJ, Birrell G, Chen P, DelSal G, Carney JP, Grattan-Smith P, Lavin MF. Defective p53 response and apoptosis associated with an ataxia-telangiectasia-like phenotype. *Cancer Res.* 2006 Mar 15;66(6):2907-12.

Gulcelik NE, Gulcelik MA, Kuru B. Risk of malignancy in patients with follicular neoplasm: predictive value of clinical and ultrasonographic features. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008 Dec;134(12):1312-5.

Haas-Kogan D, Shalev N, Wong M, Mills G, Yount G, Stokoe D. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor supressor PTEN/MMAC. *Curr. Biol.*,1998;8:1195-1198.

Halachmi N, Halachmi S, Evron E, Cairns P, Okami K, et al. Somatic mutations of the PTEN tumor suppressor gene in sporadic follicular thyroid tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998 Nov;23(3):239-43.

Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell.* 2005 Sep;8(3):179-83.

Haugen BR, Pacini F, Reiners C, Schlumberger M, Ladenson PW, et al. A comparison of recombinant human thyrotropin and thyroid hormone withdrawal for the detection of thyroid remnant or cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Nov;84(11):3877-85.

Hannan MA, Hellani A, Al-Khodairy FM, Kunhi M, Siddiqui Y, et al. Deficiency in the repair of UV-induced DNA damage in human skin fibroblasts compromised for the ATM gene. *Carcinogenesis.* 2002 Oct;23(10):1617-24.

Hovens GC, Stokkel MP, Kievit J, Corssmit EP, Pereira AM, Romijn JA, Smit JW. Associations of serum thyrotropin concentrations with recurrence and death in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jul;92(7):2610-5.

Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res.* 1999 Nov 25;253(1):210-29.

Kang B, Guo RF, Tan XH, Zhao M, Tang ZB, Lu YY. Expression status of ataxia-telangiectasia-mutated gene correlated with prognosis in advanced gastric cancer. *Mutat Res*. 2008 Feb 1;638(1-2):17-25.

Karavitaki N, Vlassopoulou V, Tzanela M, Tzavara I, Thalassinou N. Recurrent and/or metastatic thyroid cancer: therapeutic options. *Expert Opin Pharmacother*. 2002 Jul;3(7):939-47.

Kristensen AT, Bjørheim J, Wiig J, Giercksky KE, Ekstrøm PO. DNA variants in the ATM gene are not associated with sporadic rectal cancer in a Norwegian population-based study. *Int J Colorectal Dis*. 2004 Jan;19(1):49-54

Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, Podsypanina K, Parsons R, et al. Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11563-8.

Khanna KK. Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. *J Natl Cancer Inst*. 2000 May 17;92(10):795-802.

Khanna K.K & Jackson S.P , DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*. 2001; 3, 247-254.

Kong D, Yamori T. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy. *Cancer Sci*. 2008 Sep;99(9):1734-40.

Lavin MF. The Mre11 complex and ATM: a two-way functional interaction in recognising and signaling DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 2004 Nov 2;3(11):1515-20.

Lavin MF, Scott S, Gueven N, Kozlov S, Peng C, Chen P. Functional consequences of sequence alterations in the ATM gene. *DNA Repair (Amst)*. 2004 Aug-Sep;3(8-9): 1197-205.

Lavin MF, Scott SP, Kozlov S, Gueven N. Analyzing the regulation and function of ATM *Methods Mol Biol*. 2004;281:163-78.

Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Oct;9(10):759-69.

Li DM, Sun H. TEPP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor β . *Cancer Res.* 1997; 57: 2124-2129.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science.* 1997; 275:1943-1947.

Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PLM, Wang SI, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet.* 1997;16:64-67.

Lin JD, Chao TC, Huang BY, Chen ST, Chang HY, Hsueh C. Thyroid cancer in the thyroid nodules evaluated by ultrasonography and fine-needle aspiration cytology. *Thyroid.* 2005 Jul;15(7):708-17.

Lu Y, Wang H, Mills GB. Targeting PI3K-AKT pathway for cancer therapy. *Rev Clin Exp Hematol.* 2003 Jun;7(2):205-28

Maia AL, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RM, Maciel LM, *et al.* Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: Brazilian consensus. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Jul;51(5):867-93

Marsh DJ, Zheng Z, Zedenius J, Kremer H, Padberg GW, et al. Differential loss of heterozygosity in the region of the Cowden locus within 10q22-23 in follicular thyroid adenomas and carcinomas. *Cancer Res.* 1997;57:500-503.

Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med.* 1994 Nov;97(5):418-28.

Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Apr;86(4):1447-63.

Myers MP, Pass I, Batty IH, Van Der Kaay J, Stolarov JP, *et al.* The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95:13513-13518.

Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, *et al.* PTEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94:9052-9057.

- Morrell D, Cromartie E, Swift M. Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia-telangiectasia. *J Natl Cancer Inst.* 1986 Jul;77(1):89-92.
- Mitui M, Nahas SA, Du LT, Yang Z, Lai CH, Nakamura K et al. Functional and computational assessment of missense variants in the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) gene: mutations with increased cancer risk. *Hum Mutat.* 2009 Jan;30(1):12-21.
- Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, Weng LP, Eng C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jun 7;92(11):924-30.
- Oakley GG, Loberg LI, Yao J, Risinger MA, Yunker RL, et al. UV-induced hyperphosphorylation of replication protein a depends on DNA replication and expression of ATM protein. *Mol Biol Cell.* 2001 May;12(5):1199-213.
- Offer H, Erez N, Zurer I, Tang X, Milyavsky M, et al. The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damage DNA, *Carcinogenesis.* 2002; 6,1025-1032.
- Pacini F, Schlumberger M, Harmer C, Berg GG, Cohen O, Duntas L., et al. Post-surgical use of radioiodine (131I) in patients with papillary and follicular thyroid cancer and the issue of remnant ablation: a consensus report. *Eur J Endocrinol.* 2005 Nov;153(5):651-9.
- Pandita T K & Dhar S. Influence of ATM function on interactions between telomeres and nuclear matrix, *Res Radiat.* 2000;(2) 133-139.
- Platzer M., Rotman G., Bauer D., Uziel T., Savitsky K et al. Ataxia- Telangiectasia Locus: Sequence Analysis of 184 kb of Human Genomic DNA Containing the Entire ATM Gene. *Genome Research.* 1997; 7 , 592-605.
- Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, Gu J, Tamura M, Yamada KM, Cordon-Cardo C, Cattoretti G, Fisher PE, Parsons R. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 16;96(4):1563-8.
- Proud CG. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur. J. Biochem.* 2002; 269, 5338-5349.

Reynolds RM, Weir J, Stockton DL, Brewster DH, Sandeep TC, Strachan MW. Changing trends in incidence and mortality of thyroid cancer in Scotland. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 Feb;62(2):156-62.

Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, et al. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):6105-11.

Ringel MD. Molecular diagnostic tests in the diagnosis and management of thyroid carcinoma. *Rev Endocr Metab Disord*. 2000 Apr;1(3):173-81.

Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol*. 2006 Jan;18(1):77-82.

Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle*. 2004 Oct;3(10):1221-4.

Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol*. 2004 Jul 15;22(14):2954-63.

Sarlis NJ. Metastatic thyroid cancer unresponsive to conventional therapies: novel management approaches through translational clinical research. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2001 Aug;1(2):103-15.

Shaha AR. Thyroid carcinoma: implications of prognostic factors. *Cancer*. 1998 Aug 1;83(3):401-2

Savitsky K, Bar-shira A, Gilad S, Rotman G, et al., A Single Ataxia Telangiectasia Gene with a Product Similar to PI-3 Kinase. *Science*. 1995, 268: 1749-1753.

Schrauder M, Frank S, Strissel PL, Lux MP, Bani MR, Rauh C, et al. Single nucleotide polymorphism D1853N of the ATM gene may alter the risk for breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Aug;134(8):873-82.

Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*. 2003 Mar;3(3):155-68.

Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53, *Genes Dev*. 1997; 24, 3471-3481.

Smilenov L B, Morgan SE, Mellado W, Sawant SG, Kastan MB, Pandita TK. Influence of ATM function on telomere metabolism, *Oncogene*. 1997; 22, 2659-2665.

Stambolic V, Suzuki A, De La Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 1998, 95:29-39.

Steck PA, Perouse MA, Jasser AS, Alfred Young WK, Lin H, et al. Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet*. 1997, 15:356-362.

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor gene PTEN. *Science*. 1998, 280:1614-1617.

Telatar M, Teraoka S, Wang Z, Chun HH, Liang T, *et al*. Ataxia-telangiectasia: identification and detection of founder-effect mutations in the ATM gene in ethnic populations. *Am J Hum Genet*. 1998 Jan;62(1):86-97.

Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, *et al*. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jun 1;97(11):813-22.

Thorstenson YR, Shen P, Tusher VG, Wayne TL, Davis RW, *et al*. Global analysis of ATM polymorphism reveals significant functional constraint. *Am J Hum Genet*. 2001 Aug;69(2):396-412.

Tomimori E, Pedrinola F, Cavaliere H, Knobel M, Medeiros-Neto G. Prevalence of incidental thyroid disease in a relatively low iodine intake area. *Thyroid*. 1995 Aug;5(4):273-6.

Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, *et al*. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet*. 2004 Mar;41(3):161-70.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jul;2(7):489-501.

Ward LS, Kunii IS, De Barros Maciel RM. Thyroid stimulating hormone levels in cord blood are not influenced by non-thyroidal mothers' diseases. Sao Paulo Med J. 2000 Sep 7;118(5):144-7.

Ward LS, Santarosa PL, Granja F, da Assumpção LV, Savoldi M, Goldman GH. Low expression of sodium iodide symporter identifies aggressive thyroid tumors. Cancer Lett. 2003 Oct 8;200(1):85-91.

Ward LS, Assumpção LV. Thyroid cancer: prognostic factors and treatment. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004 Feb;48(1):126-36.

Ward LS, Morari EC, Leite JL, Bufalo NE, Guilhen AC, Araujo PP, Tincani AJ, Assumpção LV, Matos PS. Identifying a risk profile for thyroid cancer. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007 Jul;51(5):713-22.

Waite KA, Eng C. Protean PTEN: form and function. Am J Hum Genet. 2002 Apr;70(4):829-44.

Weng LP, Gimm O, Kum JB, Smith WM, Zhou XP, et al. Transient ectopic expression of PTEN in thyroid cancer cell lines induces cell cycle arrest and cell type-dependent cell death. Hum Mol Genet. 2001 Feb 1;10(3):251-8.

Webb, B. L. J., Hirst, S. J. and Giembycz, M. A. Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. Br. J. Pharmacol. 2000; 130, 1433-1452.

Wu X, Gu J, Grossman HB, Amos CI, Etzel C, Huang M, Zhang Q, et al. Bladder cancer predisposition: a multigenic approach to DNA-repair and cell-cycle-control genes. Am J Hum Genet. 2006 Mar;78(3):464-79.

Zhang L, Jia G, Li WM, Guo RF, Cui JT, Yang L, Lu YY. Alteration of the ATM gene occurs in gastric cancer cell lines and primary tumors associated with cellular response to DNA damage. Mutation R. 2004; 557, 41-51.

Zedenius J, Wallin G, Svensson A, Bovee J, Hoog A, et al. Deletions at the long arm of chromosome 10 in progression of follicular thyroid tumors. Hum. Genet. 1996, 97:299-303.

Zidan J, Kassem S, Kuten A. Follicular carcinoma of the thyroid gland: prognostic factors, treatment, and survival. Am J Clin Oncol. 2000 Feb;23(1):1-5

8- ANEXOS



ANEXO 1



Order: 877-772-2622
Support: support@epitomics.com
Web: www.epitomics.com

ATM Rabbit Monoclonal Antibody Product Data Sheet

Catalog # 1549-1

Clone ID: Y170 Lot #: please refer to vial
Quantity: 100 µl
Type: Rabbit Monoclonal IgG
Species Cross-reactivity: Human Mouse Rat
Applications: WB IHC ICC Flow Cytometry IP
Molecular Wt.: 370 kDa
UniProt ID: Q13315

Background: ATM is a nuclear phosphoprotein involved in Ataxia-telangiectasia (A-T) an autosomal recessive disorder characterized by cerebellar ataxia, immune deficiencies, increased cancer predisposition, chromosomal instability and radiation sensitivity (1-2). This large protein (370 kDa) is involved in genome stability, cellular responses to DNA damage and cell cycle control. More than 100 mutations have been identified so far and are expected to inactivate the ATM protein by truncation or large deletions (3). Defects in ATM contribute to various B cell and T cell Leukemia (4).

Specificity: A synthetic peptide corresponding to residues surrounding Serine 1981 of human ATM was used as immunogen.

Storage Conditions: Store at -20 °C. Buffer: 50 mM Tris-Glycine (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 40% Glycerol, 0.01% sodium azide and 0.05% BSA. Stable for 12 months from date of receipt.

Recommended Dilutions:
WB: 1:1,000 – 10,000
IHC: 1:100-250
ICC: 1:100-250
IP: 1:50

Background References:

1. Hamden, D.G. (1994) *Int. J. Radiat. Biol.* 66, S13-S19
2. Lavin, M.F. and Shiloh, Y. (1997) *Ann. Rev. Immunol.* 15, 177-202
3. Savitsky, K., Sfez, S., Tagle, D.A., Ziv, Y., Sartiel, A., Collins, F.S., Shiloh, Y. and Rotman, G. (1995) *Hum. Mol. Gen.* 4, 2025-2032.
4. Stankovic T., Weber P., Stewart G., Bedenham T., Murray J., Byrd P.J., Moss P.A.H., Taylor A.M.R.; *Lancet* 353:26-29(1999).

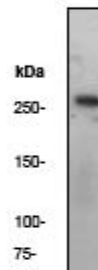


Fig 1. Western blot analysis on 293 cell lysate using anti-ATM RabMAB (cat. # 1549-1) dilution 1:5,000.

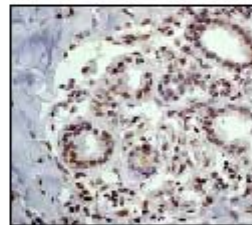


Fig 2. Immunohistochemical analysis of paraffin-embedded human carcinoma using anti-ATM RabMAB (cat. # 1549-1).

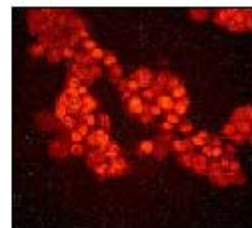


Fig 3. Immunofluorescent staining of 293 cells using anti-ATM RabMAB (cat. # 1549-1).

Product QC'd by: _____

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic applications.
This product was manufactured under U.S. Patent No. 5,675,063. For a complete list of protocols and available related products, please visit www.epitomics.com.

Epitomics, Inc., 863 Mitten Road, Suite 103 Burlingame, California 94010-1303

Rev. A/04-05/JS

ANEXO 2



Data Sheet PTEN

mouse monoclonal antibody

NCL-PTEN

Specificity	Human PTEN, also known as MMAC or TEP1.
Clone	28H6
Ig Class	IgG1, kappa
Antigen used for immunisations	Prokaryotic recombinant protein corresponding to a 200 amino acid C-terminal region of the PTEN molecule.
Hybridoma partner	Mouse myeloma (p3-NS1-Ag4-1).
Preparation	Lyophilised tissue culture supernatant containing 15mM sodium azide. Reconstitute with 1ml or 0.1ml of sterile distilled water as indicated on vial label.
Effective on frozen tissue	No
Effective on paraffin wax embedded tissue	Yes (using the high temperature antigen unmasking technique: see overleaf).
Recommendations on use	Immunohistochemistry: Typical working dilution 1:100 - 1:200. High temperature antigen unmasking technique. 60 minutes primary antibody incubation at 25°C. Standard ABC technique. Western blotting: Not recommended.
Positive controls	Tonsil
Staining pattern	Nuclear
Storage and stability	Store unopened lyophilised antibody at 4°C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 4°C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the antibody are frozen at -20°C (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use.
Legal consideration	NCL-PTEN is recommended FOR RESEARCH USE ONLY .

Application

PTEN also known as MMAC1 or TEP1, is a tumour suppressor gene which encodes a multifunctional phosphatase which is expressed almost ubiquitously and regulates the cell cycle, apoptosis and possibly cell adhesion. It is linked to cell cycle control through the retinoblastoma gene protein. PTEN also interacts with the focal adhesion kinase (FAK) reducing FAK phosphorylation affecting cell adhesion, spreading and recognition. In addition, PTEN may prevent resistance to apoptosis by dephosphorylating phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate. Deletions and mutations to PTEN occur in a range of cancers including breast cancer, malignant melanoma, endometrial carcinoma, bladder carcinoma, small cell lung carcinoma and endometrial ovarian cancer. Germline mutations of PTEN are found in Cowden syndrome which leads to a predisposition for breast and thyroid cancers. Loss of PTEN expression occurs in both breast and prostate cancer and in the latter it may be a marker of poor prognosis.

References

- Mutter G L. Histopathology of genetically defined endometrial precancers. *International Journal of Gynecology and Pathology* **19** (4): 301-309 (2000).
- Mutter G L, Lin M C, Fitzgerald J T, *et al.*. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *Journal of National Cancer Institute* **92** (11): 924-930 (2000).
- Lu Y, Lin Y-Z, LaPushin R, *et al.*. The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene* **18**: 7034-7045 (1999).
- Paramio J M, Navarro M, Segrelles C, *et al.*. PTEN tumour suppressor is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein. *Oncogene* **18**: 7462-7468 (1999).
- Perren A, Weng L-P, Boag A H, *et al.*. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *American Journal of Pathology* **155** (4): 1253-1260 (1999).
- Li J, Yen C, Liaw D, *et al.*. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**: 1943-1947 (1997).

Novocastra Laboratories Ltd

Balliol Business Park West, Benton Lane, Newcastle upon Tyne NE12 8EW, United Kingdom

Telephone: +44 (0) 191 215 0567 Facsimile: +44 (0) 191 215 1152

Registered Office: Balliol Business Park West, Benton Lane, Newcastle upon Tyne NE12 8EW, UK. Registered No: 2163063 (England and Wales)

PTEN/01/01