

SOLANGE CAMPELO COSTA

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

***PESQUISA DE MUTAÇÕES NO EXON 2 DO GENE MEN 1
EM TUMORES ESPORÁDICOS, ENDÓCRINOS E
NÃO ENDÓCRINOS***

CAMPINAS

2001

SOLANGE CAMPELO COSTA

***PESQUISA DE MUTAÇÕES NO EXON 2 DO GENE MEN 1
EM TUMORES ESPORÁDICOS, ENDÓCRINOS E
NÃO ENDÓCRINOS***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica, Área de Concentração Clínica
Médica.*

Orientadora: Profa. Dra. Laura Sterian Ward

CAMPINAS

2001

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

C823p

Costa, Solange Campelo

Pesquisa de mutações no exon 2 do gene men 1 em tumores esporádicos, endócrinos e não endócrinos / Solange Campelo Costa. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

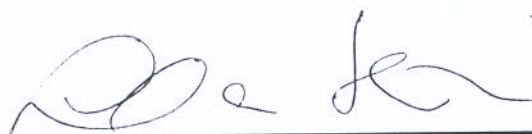
Orientador : Laura Sterian Ward

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Genética molecular. 2. Endocrinologia Molecular. 3. Oncologia. I. Laura Sterian Ward. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

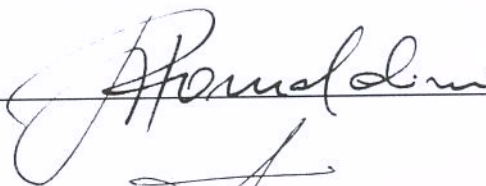
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Profa.Dra. LAURA STERIAN WARD

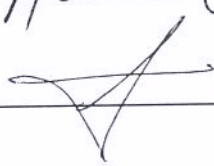


Membros:

1. Prof.Dr. João Hamilton Romaldini



2. Prof.Dr. Mário José Abdalla Saad



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/05/01

DEDICATÓRIA

A meus pais, Vicente e Eduvirgens, que me permitiram seguir atrás de meus sonhos e projetos, sempre me incentivando com seu exemplo e amor.

A minha irmã, Ceiça, e a meu irmão, Antonio Francisco, pela grande amizade e amor que nos une, e pelo apoio que sempre me deram.

A Deus, Autor da Vida e do Amor.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Laura Sterian Ward, pessoa de inteligência admirável, de incrível rapidez de raciocínio, por ter acreditado em mim e nesse projeto, tornando-o realidade.

A Profa. Dra. Patrícia Sabino de Mattos, pela valiosa colaboração, cedendo material para pesquisa e fazendo revisão das lâminas.

Ao Prof. Dr. Câmara Lopes, por ter permitido acesso a casos do Hospital Sírio Libanês para a nossa pesquisa.

A Profa. Dra. Cristine Hackel, do CBMEG, por nos ter disponibilizado recursos técnicos de seu laboratório, inclusive o aparelho Phast System.

A Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad, , por ter permitido que usássemos o aparelho Phast System do Hemocentro..

A Arno Hamel, aluno de Doutorado do Hemocentro, por sua inestimável ajuda e amizade.

A Marcelo Ribeiro, aluno de Mestrado do CBMEG, por dividir conosco o conhecimento técnico, pela paciência em ensinar.

A todos do CBMEG e do Hemocentro que de alguma forma colaboraram para que esse trabalho fosse realizado.

Aos alunos da iniciação científica, Lúcio, Fábio, Cristina, Lilian, Cláudia, futuros médicos, bons pesquisadores. Juntos aprendemos as primeiras técnicas de biologia molecular.

A Andréa Damico, Janaína Leite e Fabiana Granja, futuras biólogas, ótimas técnicas, pela ajuda na realização dos experimentos e pela amizade.

Às colegas de Laboratório e de Pós-Graduação, Gabriela, Suzy, Elaine, Hérika, pesquisadoras de talento, a quem desejo muito sucesso.

Aos técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica, especialmente ao Aparecido, pela inestimável ajuda.

*Não chores meu filho;
Não chores, que a vida
É luta renhida:
Viver é lutar.
A vida é um combate,
Que os fracos abate,
Que os fortes, os bravos
Só pode exaltar.*

Gonçalves Dias - Canção do Tamoio, 1851.

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO	<i>ix</i>
INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	24
MATERIAL E MÉTODOS	26
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÕES	62
SUMMARY	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

RESUMO

Mutações no gene da Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 (MEN1) têm sido descritas não só em portadores da Síndrome da MEN1, mas também em tumores esporádicos como gastrinomas, insulinomas, e carcinóides brônquicos. Pesquisamos o exon 2 do gene MEN1, tendo em vista a alta prevalência de mutações descritas nesta região do gene.

Foram analisados 148 tumores esporádicos, endócrinos e não-endócrinos. Setenta e oito tumores eram de tireóide: 28 adenomas foliculares (AF), 35 carcinomas papilíferos (CP), 14 carcinomas foliculares (CF), e um carcinoma anaplásico (Ana); havia 46 lesões de adrenal: 3 hiperplasias, 3 adenomas, e 35 carcinomas de córtex adrenal, 2 feocromocitomas, 2 ganglioneuroblastomas e um linfoma; e 24 tumores de mama: 6 carcinomas não invasivos, 16 do tipo infiltrante ductal, 2 do tipo invasivo lobular.

A extração de DNA de 108 tumores embebidos em parafina e de 40 tecidos frescos foi realizada utilizando a técnica de fenol-clorofórmio e precipitação com álcool. Utilizamos 5 pares de *primers* para amplificar todo o exon 2 do gene MEN 1 pela técnica da Reação da Polimerase em Cadeia

seguida por Single Strand Conformation Polymorphism Analysis (PCR-SSCP).

Os produtos de PCR de cinco tumores apresentaram banda suspeita de alteração ao SSCP. Esses produtos foram seqüenciados *sense* e *anti-sense*, mas não mostraram mutações.

Nossos resultados sugerem que mutações no exon 2 do gene MEN 1 não ocorrem nos tumores esporádicos de tiróide, adrenal e mama.

INTRODUÇÃO

1. A NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 1

A Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 1 (*multiple endocrine neoplasia type 1*, MEN1) é uma síndrome autossômica dominante definida pela presença de tumor em pelo menos dois dos seguintes tecidos endócrinos: paratiróide, tecido endócrino enteropancreático e hipófise anterior. Será considerada familiar se pelo menos um parente de primeiro grau for afetado em um desses tecidos (MARX *et al*, 1999).

2. HISTÓRICO

A desordem foi primeiramente chamada de Adenopatia Endócrina Múltipla (UNDERDAHL *et al*, 1953), ou Síndrome Pluriglandular (BERDJIS, 1962), no entanto, como hiperplasia e malignidade podem ocorrer nesses pacientes, o termo Neoplasia Endócrina Múltipla é agora preferido (STEINER *et al*, 1968; WERMER, 1974).

O primeiro relato de caso de MEN1 foi feito em 1903, por ERDHEIM, em uma autópsia de um paciente com acromegalia que apresentava tumor de

hipófise e tumor de paratiróide. Em 1939, ROSSIER e DRESSLER relataram duas irmãs com características da Síndrome, e em 1954, concomitante e independentemente, MOLDAWER *et al*, descrevendo um pai e uma filha, e WERMER, descrevendo um pai e quatro filhas, estabeleceram a natureza familiar da Síndrome, que hoje é conhecida como Síndrome de Wermer.

3. EPIDEMIOLOGIA

A ocorrência da MEN1 é igual entre os sexos, a penetrância é alta, chegando a 95%, e dados populacionais precisos não existem, mas é uma síndrome rara, com prevalência variando entre 2 a 10/100.000 (MARX *et al*, 1999).

Como uma síndrome autossômica dominante o achado de um paciente com MEN1 implica que parentes de primeiro grau têm até 50% de chance de desenvolver a doença. Desta forma, rastreamento bioquímico e genético têm importante função na vida desses pacientes e suas famílias. Ocasionalmente, a síndrome da MEN1 pode ocorrer sem história familiar, mas pode ser difícil de distinguir a forma esporádica da forma familiar, pois um parente afetado pode ter falecido antes de desenvolver qualquer manifestação.

A síndrome MEN1 afeta todos os grupos etários, mas um estudo no Reino Unido concluiu que metade dos portadores do gene da MEN1 expressam umas das características da Síndrome até os 21 anos de idade (TRUMP *et al*, 1996). O acometimento precoce de neoplasias é uma característica de neoplasias hereditárias. Outra característica das neoplasias hereditárias é multiplicidade de tumores, o que se refere tanto a tumores em múltiplos órgãos, como a múltiplos tumores em um órgão. Essas características podem ser explicadas por uma mutação genética em linhagem celular germinativa, mutação esta que estará presente em cada célula do organismo.

4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Tumores de paratiróide ocorrem em 95% dos portadores de MEN1, e são a primeira manifestação da síndrome em 90% dos casos (TRUMP *et al*, 1996). Geralmente as quatro glândulas são afetadas. A maioria são adenomas, tumores benignos, e podem causar sintomas pela hipersecreção hormonal. Entre os portadores de hiperparatireoidismo primário, até 18% podem ser portadores de MEN1 (JACKSON & BOONSTRA, 1967). Os pacientes

afetados podem apresentar desde hipercalcemia assintomática, até nefrolitíase, osteíte fibrosa cística, ou sintomas vagos associados com hipercalcemia (poliúria, polidipsia, constipação). Não existe tratamento clínico efetivo e a remoção cirúrgica das paratiróides é o tratamento de escolha (NORTON *et al*, 1987).

Tumores de tecido enteropancreático ocorrem em 40% dos pacientes com MEN1 (THAKKER, 1998). A maioria dos tumores é produtor de hormônio, por exemplo, gastrina, insulina, glucagon, ou polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), levando a síndromes clínicas características (MARX *et al*, 1999; TEH *et al*, 1995). Os gastrinomas (tumores secretores de gastrina), que levam à Síndrome de Zollinger-Ellison (SZE), representam 50% dos tumores enteropancreáticos em portadores de MEN1 e são a principal causa de morbi-mortalidade nesses pacientes devido a múltiplas úlceras pépticas, recorrentes, que podem perfurar, e a uma baixa taxa de cura cirúrgica (MARX *et al*, 1999). Além disso, cada portador de SZE deve ser considerado como candidato a ser portador de MEN1 (BARDAM & STAGE, 1985).

Entre os outros tumores enteropancreáticos encontrados em pacientes com MEN1, aproximadamente 25% são produtores de insulina, 25% são

produtores de glucagon e 25% são produtores de polipeptídeo pancreático (KLOPPEL *et al*, 1986). No entanto, somente a minoria secreta hormônio em quantidade suficiente para causar sintomas. A síndrome do insulínoma ocorre em 10% ou menos dos pacientes com MEN1. Menor quantidade ainda de pacientes apresenta síndrome de hipersecreção de glucagon, de PIV (polipeptídeo intestinal vasoativo), ou de somatostatina. Muitos tumores enteropancreáticos são não-funcionantes e, freqüentemente, encontrados acidentalmente (incidentalomas) ou produzem polipeptídeo pancreático, que não causa nenhuma manifestação clinicamente demonstrável (Le BODIC *et al*, 1996, LANGSTEIN *et al*, 1990).

Tumores de hipófise anterior ocorrem em 30% dos casos de MEN1, Sessenta por cento desses tumores são prolactinomas, 20% são somatotrofinomas. Corticotrofinomas e tumores não funcionantes representam menos que 15% dos casos (THAKKER, 1998). A maioria são tumores benignos, que podem causar sintomas por compressão local e/ou por hipersecreção hormonal (THAKKER, 1998).

Os pacientes afetados pela Síndrome têm ainda elevada incidência de tumores carcinóides (4%), tumores de córtex adrenal (5%), lipomas (1%) (THAKKER, 1998) e tumores de tireóide (LAIRMORE & WELLS, 1997).

5. O GENE MEN1

A maioria dos genes causadores de neoplasias hereditárias, doenças raras, pode contribuir para o desenvolvimento de neoplasias esporádicas, doenças bem mais comuns. Alguns dos genes implicados em hiperfunção hereditária de uma glândula endócrina estão também implicados em neoplasias endócrinas esporádicas. Por exemplo, o gene do receptor de hormônio tirotrófico (TSH-R) está implicado na gênese de tumores hiperfuncionantes da tireóide, os adenomas tóxicos (PARMA *et al*, 1997) e o gene receptor de hormônio luteotrófico (LH-R) está implicado em adenomas de células de Leydig (LIU *et al*, 1999).

LARSSON *et al*, em 1988, procurando por perda de heterozigossidade (*loss of heterozigosity*, LOH) em tumores associados a MEN1 e estudando essas famílias por uma técnica denominada *genetic linkage*, mapearam o gene da MEN1 em 11q13, ligado ao marcador PYGM, gene da fosforilase

muscular. Esse estudo sugeriu ainda que se tratava de um gene supressor tumoral, pois o alelo perdido era sempre originado do progenitor não afetado, consistente com a teoria de segundo *hit* (KNUDSON, 1971).

No entanto, somente em 1997 o gene MEN1 foi identificado e clonado, simultânea e independentemente, por CHANDRASEKHARAPPA *et al* e pelo EUROPEAN CONSORTIUM ON MEN1. CHANDRASEKHARAPPA e seu grupo do NIH (National Institute of Health) utilizou a técnica de LOH com marcadores de microssatélites para um mapeamento genético em tumores de pacientes com a síndrome. Testou diferentes genes através do *positional cloning*, uma técnica que consiste em clonar e testar genes candidatos. Identificou um gene consistentemente mutado em 14 de 15 indivíduos afetados estudados. O Consórcio Europeu confirmou estes dados por estudos de segregação em famílias de portadores de MEN1, utilizando protocolos diversos para detecção de mutações.

O gene MEN1 contém 10 exons, com uma região codificadora, RNAm, de 2,8 kb. A maioria das mutações detectadas nesse gene resultam em perda da função do gene ou em um produto truncado, o que indica que se trata de um gene supressor tumoral. Cerca de 50% das mutações descritas até 1997

afetam o exon 2 (EUROPEAN CONSORTIUM ON MEN1, 1997). Estudos subseqüentes, entretanto, mostraram que as mutações se distribuem por toda a extensão do gene.

O gene MEN1 codifica uma proteína nuclear chamada menin, com 610 aminoácidos. A localização nuclear sugere que possa agir tanto em processos de regulação de transcrição como em controle de replicação de DNA e do ciclo celular (GURU *et al*, 1998; KAJI *et al*, 1999). KIM *et al*, (1999), mostraram que a superexpressão de menin suprime a tumorigênese do oncogene *RAS* em cultura de células de tumor murino. Em estudos com leveduras mostrou-se que a proteína menin funciona como um repressor transcripcional através de interação com o fator transcripcional JunD (GOBL *et al*, 1999; AGARWAL *et al*, 1999).

6. EVIDÊNCIAS DE ENVOLVIMENTO DO GENE MEN1 EM TUMORES ESPORÁDICOS

Numerosos estudos foram feitos visando estabelecer se o gene MEN1 estaria implicado na patogênese de tumores esporádicos nos mesmos tecidos afetados pela Síndrome (KOPER & LAMBERT, 2000).

Procurando por LOH em 11q13, locus do gene MEN1, em tumores esporádicos de paratiróide, FRIEDMAN *et al*, (1992), encontraram 26%; HEPPNER *et al*, (1997), encontraram 21%; e FARNEBO *et al*, (1998), encontraram 32%.

Em tumores endócrinos esporádicos de tecido enteropancreático, LOH em 11q13 foi encontrado em 19% de insulinomas e 44% de gastrinomas (DEBELENKO *et al*, 1997b). Já ZHUANG *et al*, (1997a), encontraram LOH em 11q13 em 93% de gastrinomas esporádicos, e em 50% de insulinomas esporádicos.

Em tumores carcinóides de pulmão, tumores neuroendócrinos que são encontrados tanto esporadicamente quanto em associação à Síndrome MEN1, DEBELENKO *et al* (1997a), encontraram LOH em 11q13 em 36% e JAKOBOVITZ *et al* (1996) encontraram entre 58 e 78%.

Em tumores esporádicos de hipófise anterior, BOGGILD *et al*, (1994), encontraram 18% de LOH em 11q13; enquanto ZHUANG *et al*, (1997b),

encontraram 10%, e TANAKA *et al*, (1998), encontraram LOH em 11q13 em apenas 3% dos casos pesquisados.

Em tumores de tiróide, cuja frequência está aumentada na síndrome MEN1 (LAIRMORE & WELLS, 1997; PEARCE, 1997), a prevalência encontrada de LOH em 11q13 varia de acordo com o tipo histológico: 15% em adenomas foliculares (MATSUO *et al*, 1991); 30% em carcinomas foliculares (WARD *et al*, 1998a; NORD *et al*, 1999) e em anaplásicos (KITAMURA *et al*, 2000).

Em lesões de córtex adrenal, que também se associam com frequência maior em pacientes com MEN1 que na população em geral, LOH em 11q13 foi encontrado em 37% dos carcinomas, por KJELMAN *et al*, (1999), em 60% por GORTZ *et al* (1999), e em 50% por SCHULTE *et al*, (2000). Em adenomas de adrenal, HEPPNER *et al* (1999) encontraram LOH em 11q13 em 9%, GORTZ *et al* (1999) em 7% e SCHULTE *et al*, (1999), em 20%.

Em tumores de mama, cuja frequência não está aumentada em pacientes com MEN1, ZHUANG *et al* , (1995), descreveram LOH em 11q13 em 15 de 21 (71%) carcinomas *in-situ* e em 24 de 36 (67%) carcinomas invasivos.

CHUAQUI *et al*, (1997), encontraram LOH em 11q13 em 6 de 22 (27%) carcinomas *in situ* e em 1 de 11 (9%) casos de hiperplasia ductal atípica.

Em resumo, estes dados sugerem que um gene supressor tumoral localizado em 11q13 poderia estar envolvido na patogênese destes tumores esporádicos. Por estar localizado nessa região, o gene MEN1 torna-se um forte candidato a este papel. Assim, a pesquisa de mutação desse gene nesses tumores poderia contribuir para esclarecer o mecanismo oncogenético desses tumores.

OBJETIVOS

Propomos:

1. Padronizar metodologia para rastreamento de mutações por *single strand conformation polymorphism analysis* (SSCP) em DNA:

- a) extraído de blocos de tecidos embebidos em parafina
- b) extraído de tecidos coletados a fresco

2. Rastrear por *single strand conformation polymorphism analysis* (SSCP) mutações no exon 2 do gene da MEN 1 em tumores esporádicos:

a. Endócrinos:

- i. de glândula tiróide
- ii. de glândula adrenal

b. Não-endócrinos

- i. de mama
- ii. de adrenal

MATERIAL E MÉTODOS

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP aprovou o estudo de tumores de 148 pacientes. Destes, 82 eram do sexo feminino e 66 do sexo masculino.

A idade dos pacientes variou entre 4 e 78 anos, mas eles foram separados em dois grupos: menor ou igual a 45 anos e maior que 45 anos, conforme preconizado pelo *Manual for Staging of Cancer - TNM* (BEARHS *et al*, 1992). Dezesete casos de tumores de adrenal e 2 casos de tumores de tiróide eram de crianças entre 4 e 16 anos.

Os dados clínicos de cada caso foram obtidos por revisão de Prontuário do paciente no Serviço de Arquivo Médico (SAME).

Amostras de quarenta tumores foram obtidas durante cirurgia (tecido a fresco). Tecido normal do lobo contra-lateral ao tumor foi obtido em 12 casos de tumores da tiróide. Cento e oito tumores foram obtidos dos arquivos da Anatomia Patológica, em forma de blocos embebidos em parafina. Esses dados estão resumidos nas TABELAS 1 e 2.

Dos 148 casos estudados 121 eram tumores endócrinos: 78 tumores de tiróide, 43 tumores de origem adrenal.

Entre os tumores de tiróide, a classificação histológica foi a seguinte: 28 adenomas foliculares (FA), 35 carcinomas papilíferos (PC), 14 carcinomas foliculares (FC) e 1 carcinoma anaplásico de tiróide (Ana). Destes, 12 foram obtidos de tecido a fresco e 66 foi obtido de blocos de parafina. Os dados clínicos e classificação histológica desses casos estão resumidos na TABELA 3.

Entre os tumores endócrinos de adrenal, a classificação histológica foi a seguinte: 3 hiperplasias (HP), 3 adenomas (ADN), 35 carcinomas adrenocorticais (ADRCA) e 2 feocromocitomas (FEO). Destes, 4 foram obtidos como tecido a fresco e 39 foram obtidos em blocos de parafina. A TABELA 5 resume os dados clínicos e classificação histológica desses pacientes.

Também analisamos 27 casos de tumores não-endócrinos entre os quais estavam três tumores não-endócrinos de origem adrenal, com a seguinte classificação histológica: 2 ganglioneuroblastomas (GNBL), 1 linfoma (LINF), todos obtidos de parafina. Os dados clínicos desses casos encontram-se na TABELA 5.

Os outros tumores não-endócrinos eram 24 tumores de mama, com a seguinte classificação histológica: 6 não-invasivos (NI), 16 ductais infiltrativos (DI), 2 lobulares invasivos (LI). Todos obtidos de tecido fresco. Os dados clínicos e histológicos estão resumidos na TABELA 4.

TABELA 1. Distribuição dos casos de tumores endócrinos de acordo com sexo masculino (M) ou feminino (F) e a forma de obtenção do tecido.

	Tecido Fresco	Bloco de Parafina	F	M	Total
Tiróide	12	66	31	47	78
Adrenal	4	39	27	16	43
Total	16	105	58	63	121

TABELA 2. Distribuição dos casos de tumores não-endócrinos de acordo com sexo masculino (M) ou feminino (F) e a forma de obtenção do tecido.

	Tecido Fresco	Bloco de Parafina	F	M	Total
Adrenal	0	3	0	3	3
Mama	24	0	24	0	24
Total	24	3	24	3	27

TABELA 3. Distribuição dos tumores de tiróide de acordo com sexo masculino (M) ou feminino (F), idade e sua classificação histológica: adenomas folicular (FA), carcinoma papilífero (PC), carcinoma folicular (FC) e carcinoma anaplásico (Ana).

	F (≤45anos)	M (≤45 anos)	F (>45 anos)	M (>45 anos)	TOTAL
FA	2	3	12	11	28
PC	4	3	15	13	35
FC	1	1	7	5	14
ANA				1	1
TOTAL	7	7	34	30	78

TABELA 4: Distribuição dos tumores de mama, de acordo com sexo masculino (M) ou feminino (F), idade e sua classificação anátomo-patológica: : não-invasivo (NI), ductal infiltrativo (DI), lobular invasivo (LI).

	NI	DI	LI	TOTAL
F (≤45anos)	6	4		10
F (>45anos)		12	2	14
TOTAL	6	16	2	24

TABELA 5. Distribuição dos tumores de adrenal, endócrinos e não-endócrinos, de acordo com sexo, idade e classificação histológica: hiperplasia (HP), adenoma (ADN), adenocarcinoma (ADRCa), feocromocitoma (FEO), ganglioneuroblastoma (GNBL), linfoma (LINF).

	F (≤45anos)	M (≤45anos)	F (>45anos)	M (>45anos)	TOTAL
HP	2	1			3
ADN		3			3
ADRCa	17	18			35
FEO	1	1			2
GNBL		2			2
LINF				1	1
TOTAL	20	25	0	1	46

Dentre as 43 lesões de adrenal de origem endócrina, havia 2 tumores produtores de cortisol, levando ao desenvolvimento de Síndrome de Cushing, 12 tumores virilizantes, levando à puberdade precoce nas crianças, e 29 tumores não-produtores de hormônios.

Pelo menos 6 lâminas confeccionadas com material proveniente de cada uma das lesões tumorais obtidas tanto de tecidos a fresco como de blocos de

parafina foram cuidadosamente revisadas por 2 patologistas (Patrícia Sabino Matos e Luis H. Camara-Lopes) para confirmação do diagnóstico.

O material obtido de blocos de parafina foi cuidadosamente microdissecado, procurando-se obter partes homogêneas do tumor, sem necrose ou fibrose. Eram, então, realizados cinco a dez cortes de 15 μ de cada amostra, e colocados em tubos tipo *ependorf* até serem submetidos ao processo de extração de DNA.

No caso do material obtido durante a cirurgia, tecido a fresco, logo após a retirada do tumor o cirurgião separava uma porção central e homogênea do espécime. Tal fragmento era congelado imediatamente em nitrogênio líquido e mantido a -80° C, em tubos tipo *ependorf*, até ser processada para extração de DNA.

O DNA dos tumores foi extraído usando o método do fenol-clorofórmio (modificado de SAMBROOK *et al*, 1989).

No caso dos tecidos embebidos em parafina, foi inicialmente feita deparafinização com xileno: acrescenta-se 1 ml de xileno, agita-se, deixa-se

descansar por 3 a 5 minutos, centrifuga-se a 12.000 rpm, por 5 minutos, decanta-se o xileno e repete-se esse passo mais uma vez. Para retirada de quaisquer resíduos de xileno, re-suspende-se o material em etanol 100%, 500 ul centrifuga-se a 12.000 por 5 min, decanta-se o etanol, re-suspende-se novamente, agora em etanol 95%, centrifuga-se, mesma velocidade e tempo, decanta-se, e repete-se esse passo ainda uma vez, usando agora etanol 70%.

Deixar secar todo o resíduo de álcool, para seguir para o próximo passo que é similar na extração de tecidos embebidos em parafina ou de tecidos coletados a fresco.

Em seguida, procedemos a digestão com proteinase K, na concentração de 20 mg/ml em tampão Tris (Tris 2 M: 7,5 ml; SDS 10%: 7,5 ml; EDTA 0,5 M: 0,3 ml; água: 134,7ml) por 12 h (*over night*) em banho-maria a 55 °C. A solução deverá estar clara, indicando digestão protéica completa, se não, adicionar 5 ul de proteinase K e incubar novamente por mais 2 a 3 horas.

A extração propriamente dita é feita acrescentando-se ao produto dos passos anteriores 430 ul de fenol puro, agita-se em vortex, e centrifuga-se a 12.000 rpm por 30 min. Transfere-se o sobrenadante para novo tubo, adiciona-se

fenol-clorofórmio 1:1, 430 ul, agita-se em vortex, e centrifuga-se a 12.000 rpm por 30 minutos. Transfere-se o sobrenadante para novo tubo. Repete-se esse passo. Adiciona-se 430 ul de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1, agita-se em vortex, centrifuga-se a 12.000 rpm por 30 minutos. Transfere-se o sobrenadante para novo tubo. Repete-se o último passo. Transfere-se o sobrenadante para novo tubo, adiciona-se acetato de amônio 10 M, 1/3 do volume final do sobrenadante transferido, e etanol 100% gelado (-20 °C), 2,5 vezes o volume, inverte-se delicadamente, incuba-se por 12 h a -20 °C.

Após esse período, centrifuga-se a -4 °C a 12.000 rpm, por 30 minutos, decanta-se o sobrenadante, lava-se o precipitado com etanol 70%, 500 ul, que é adicionado delicadamente e logo após desprezado, deixa-se secar e ressuspende-se em água bidestilada.

Todas as amostras foram estocadas a -4 °C até serem usadas. A concentração do DNA é determinada por leitura espectrofotométrica nas faixas 260/280 e a integridade do material é visualizada em gel de agarose a 0.8%, corrido sob gradiente eletroforético em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE), e corado com brometo de etídeo.

Foram desenhados 5 pares de oligonucleotídeos (*primers*) para amplificar todo a sequência do exon 2 do gene MEN1. Os oligonucleotídeos utilizados estão listados na TABELA 6.

TABELA 6. Descrição dos *primers* usados para amplificar a sequência do exon 2 do gene MEN1. A sequência do primer de direção 3' (sense) e de direção oposta (anti sense), o tamanho do fragmento correspondente amplificado pelo par de *primers*, sua localização e temperatura de anelamento (temp).

<i>Primers</i>	Sequência	Fragmento	Temp
A Sense	TTG CCT TGC AGG CCG CCG CC	2254 → 2456 = 202pb	62 ⁰ C
A Anti Sense	TGG TAG GGA TGA CGC GGT TG		
B Sense	GGC TTC GTG GAG CAT TTT CT	2411 → 2612 = 201pb	55 ⁰ C
B Anti Sense	CTC GAG GAT AGA GGG ACA GG		
C Sense	TTC ACC GCC CAG ATC CGA GG	2564 → 2759 = 195pb	52 ⁰ C
C Anti Sense	TAA GAT TCC CAC CTA CTG GG		
H Sense	TTA GCG GAC CCT GGG AGG AG	2195 → 2421 = 226pb	62 ⁰ C
H Anti Sense	TCC ACG AAG CCC AGC ACC AAG		
J Sense	CTG GCG GCC TCA CCT ACT TTC	2502 → 2653 = 151pb	62 ⁰ C
J Anti Sense	GGA GAC CTT CTT CAC CAG CTC AC		

Na FIGURA 1 mostramos que os *primers* foram desenhados de forma a se sobreporem entre si, cobrindo todo o exon 2 do gene MEN 1 .

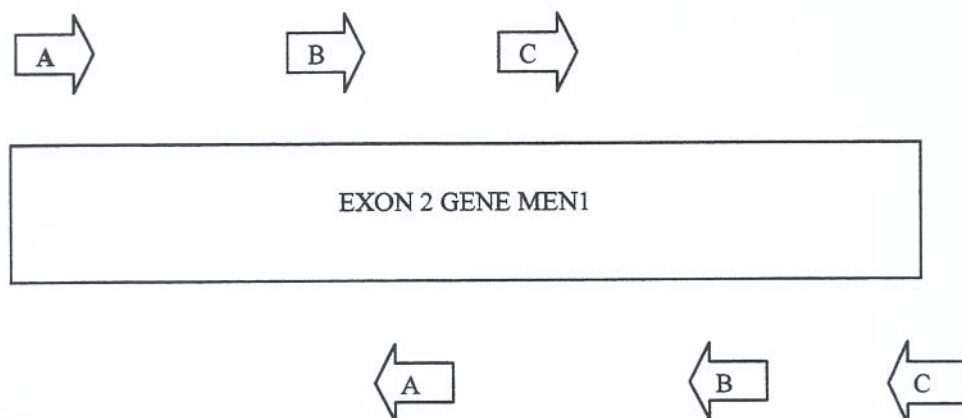


FIGURA 1 – Esquema dos primers utilizados para cobrir toda sequência do exon 2 do gene MEN 1.

A triagem para a pesquisa de mutações no exon 2 do gene MEN1 foi feita usando a técnica de PCR-SSCP (Reação da Polimerase em Cadeia-*Single Strand Conformation Polymorphism*) (SAIKI et al, 1988; ORITA *et al*, 1989 a e b,).

Uma PCR é feita com 200 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada primer, 100 μ M dNTPs, diferentes concentrações de $MgCl_2$ para cada par de primer, 10 mM Tris HCl (ph=9.0 a 25°C), 50 mM KCl, e 1U Taq polymerase em um volume final de 20 uL. Trinta e cinco ciclos de desnaturação (94°C), anelamento (52 a 62°C) e extensão (72°C) foram realizados em termociclador automático (DNA thermal cyclers, Perkin-Elmer/Cetus).

Na FIGURA 2 mostramos um esquema demonstrativo das condições de PCR.

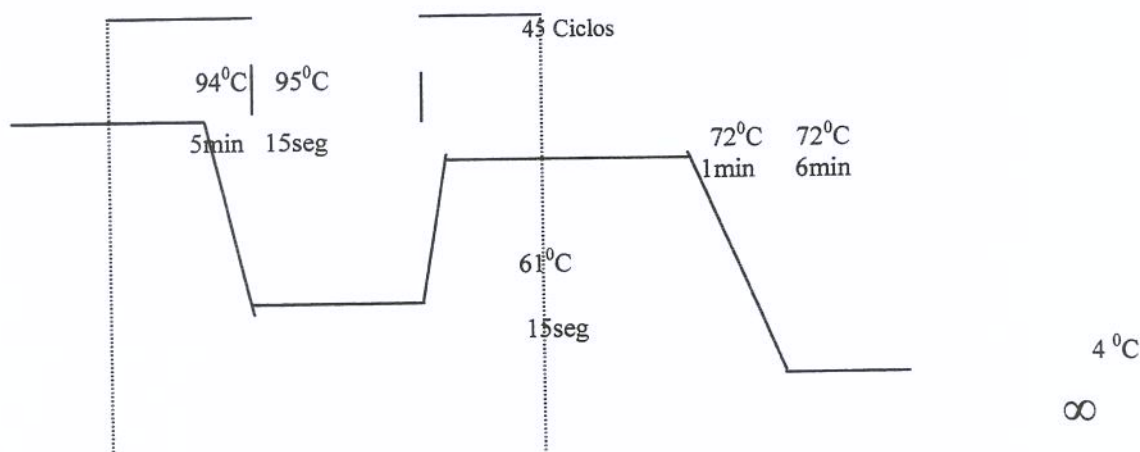


FIGURA 2 – Esquema das condições de PCR utilizadas para amplificação de fragmento visado pelo par de primers A

A técnica de SSCP foi realizada utilizando o aparelho Phast System (PHARMACIA LKB), de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 3ul dos produtos de reação PCR são misturadas a 3ul de uma solução (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05%, pH 8,0). Essa mistura é desnaturada a 95 °C por 7 minutos e mantida em gelo até a aplicação. A aplicação é feita em gel pré-moldado para o Phast System, 12,5% de poliacrilamida, e submetido a gradiente elétrico, 250 Vh, por 3h. O gel foi corado com nitrato de prata (AgNO₃). As condições para cada de par de *primers* tiveram que ser estabelecidas, pois poderiam variar a concentração do gel, (12,5 ou 20%), a

temperatura da corrida em gradiente elétrico (4, 15 ou 20 °C), e a voltagem (250 ou 450 Vh). A TABELA 7 exemplifica condições para corrida de SSCP para um par de *primer*.

TABELA 7. Condições de SSCP.

Condições 1	Condições 2	Condições 3
SSCP 1	SSCP 2	SSCP 3
450 Vh	250 Vh	250 Vh
4 °C	20 °C	15 °C
Gel 20%	Gel 12,5%	Gel 20%
Tampão SDS	Tampão SDS	Tampão SDS

Cinco casos apresentaram alteração ao SSCP. O DNA desses casos foi então re-amplificado por PCR e submetido a seqüenciamento em um seqüenciador automático ABI 3776 (Perkin Elmer), segundo instruções do fabricante.

RESULTADOS

Apresentamos em primeiro lugar o resultado da extração de DNA, método fenol-clorofórmio, dos tecidos embebidos em parafina e dos tecidos colhidos a fresco. Nota-se a diferença entre o produto obtido, de acordo com a origem do tecido, sendo o DNA obtido de parafina de pior qualidade, e que leva a maior dificuldade para amplificação. As FIGURAS 3 e 4 mostram exemplos de géis de agarose a 0,8%, em que as amostras de DNA foram submetidas a um gradiente eletroforético em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE), coradas com brometo de etídio,. visualizados por luz ultravioleta e fotografadas.

A seguir mostramos exemplos de amplificação do exon 2 do gene MEN1 por PCR. O DNA extraído de material embebido em parafina apresentou maior dificuldade para ser amplificado, mas, após número variado de tentativas para cada amostra, conseguimos amplificar todas como exemplificado nas FIGURAS 5 e 6.

Nas FIGURAS 5 e 6 mostramos exemplos dos resultados obtidos na amplificação por PCR respectivamente de material obtido da extração de tecidos embebidos em blocos de parafina e de tecidos coletados a fresco. Podemos notar que no primeiro caso nem sempre obtivemos sucesso na amplificação.

Na FIGURA 7 mostramos exemplos dos resultados obtidos no rastreamento por SSCP de mutações do exon 2 do gene MEN 1 nos tumores estudados.

A FIGURA 8 mostra o resultado do seqüenciamento de um dos casos em que houve alteração ao SSCP, um carcinoma papilífero de tiróide. Não há alteração em relação à seqüência original descrita. Seqüenciamento automático, realizado em um sequenciador ABI 3776 (Perker Elmer), interpretado pelo programa de computador Gene Runner (versão 3.0 – Hastings Software Inc. 1994).

FIGURA 3. Exemplo de gel de agarose a 0.8% onde foram submetidas a gradiente eletroforético amostras de DNA extraídas de blocos de parafina através da técnica de fenol/clorofórmio.

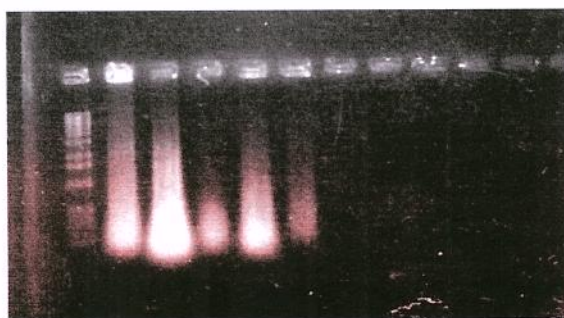


FIGURA 4. Exemplo de gel de agarose a 0.8% onde foram submetidas a gradiente eletroforético amostras de DNA extraídas de tecido a fresco através da técnica de fenol/clorofórmio.

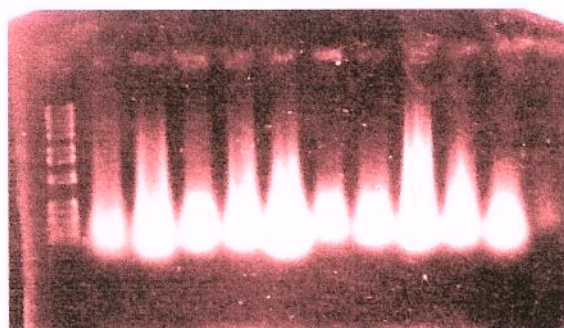


FIGURA 5. Exemplos dos resultados obtidos na amplificação por PCR de DNA extraído de tecidos embebidos em blocos de parafina. Da esquerda para direita: carcinoma papilífero de tiróide, adenoma folicular de tiróide, carcinoma folicular de tiróide, carcinoma de adrenal, adenoma de adrenal.



FIGURA 6. Exemplos dos resultados obtidos na amplificação por PCR de DNA de tecidos coletados a fresco. Da esquerda para direita: tecido normal, carcinoma folicular de tiróide, adenoma folicular de tiróide, carcinoma papilífero de tiróide, carcinoma de adrenal, carcinoma invasivo de mama, carcinoma ductal de mama.

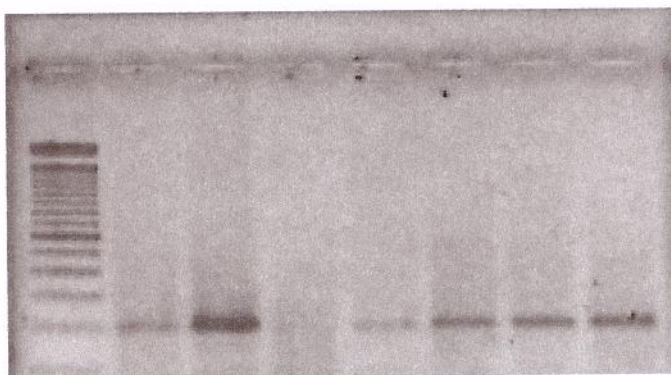


FIGURA 7. Gel de SSCP representativo dos resultados obtidos no rastreamento por SSCP de mutações do exon 2 do gene MEN 1, da esquerda para direita: tecido normal de lobo contralateral de carcinoma folicular de tiróide, carcinoma folicular de tiróide, adenoma folicular de tiróide, carcinoma anaplásico de tiróide, carcinoma de adrenal, carcinoma invasivo de mama, carcinoma ductal de mama, carcinoma não-invasivo de mama.

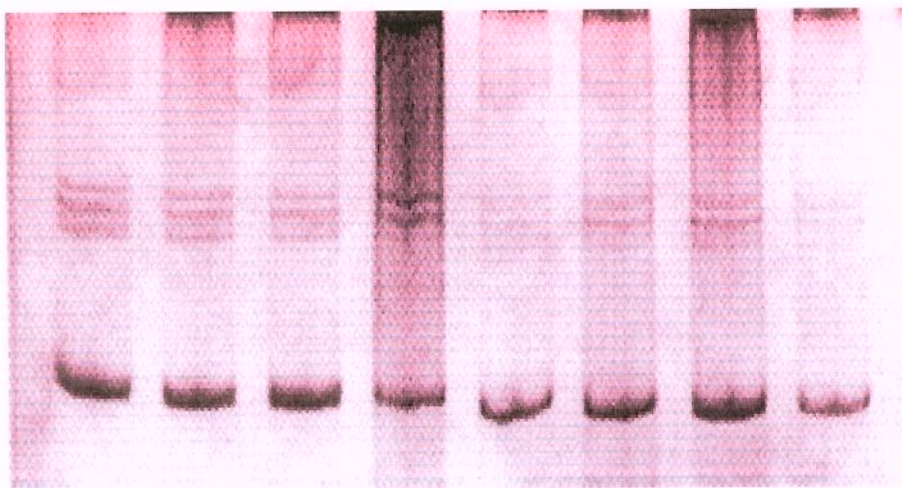
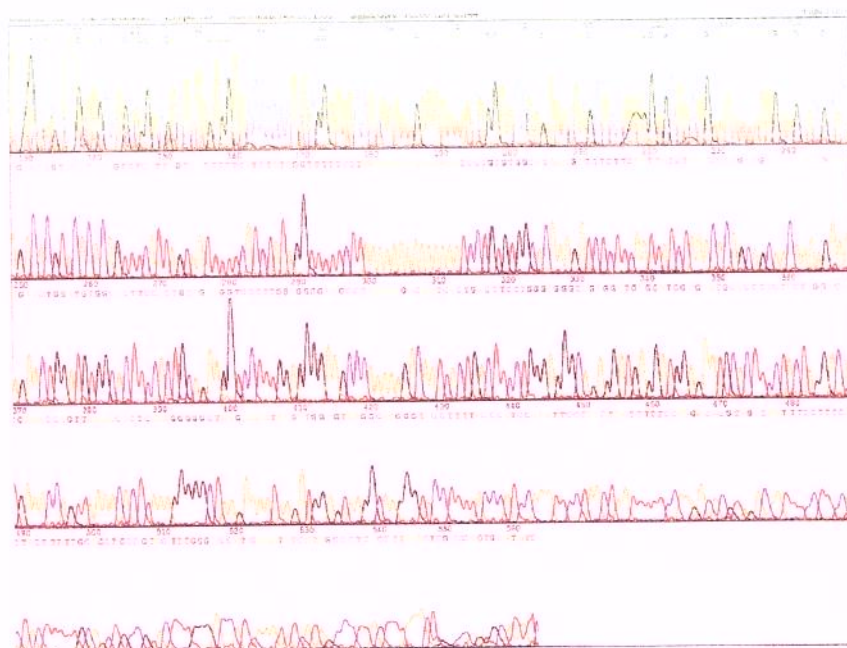


FIGURA 8. Seqüenciamento automático do exon 2 do gene MEN1 de um carcinoma papilífero de tiróide, sem alteração em relação à seqüência original.



DISCUSSÃO

1. BIOLOGIA MOLECULAR DO CÂNCER

O câncer ocorre em decorrência de danos genéticos herdados e/ou adquiridos, alterando a expressão ou as propriedades bioquímicas de genes envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular (BISHOP, 1987; WEINBERG, 1989; SCHORDERET & MUNIER 1996; KNUDSON, 1993).

Uma célula precisa vencer uma série de barreiras fisiológicas a fim de escapar do controle normal de crescimento e progredir até a malignidade. Esses obstáculos seqüenciais contribuem para garantir que o processo tumorigênico seja um evento raramente concluído com sucesso. Supõe-se que mutações, seja de oncogenes ou de genes supressores tumorais, confirmam às células atingidas uma vantagem de crescimento que permite expansão clonal. Esta expansão por sua vez, aumenta a probabilidade de mutações adicionais. Além disso, uma disfunção no programa genético controlador da morte celular (apoptose) pode resultar no prolongamento do ciclo de vida da célula predispondo-a ao acúmulo de novas mutações gênicas (WARD, 1998b).

Em seres humanos, medidas indiretas baseadas na incidência de tumores em diferentes faixas etárias predizem que sejam necessárias, em média, cinco a seis etapas mutacionais, diferentes e sucessivas, para levar uma célula normal a alcançar um fenótipo altamente maligno e infiltrativo (WEINBERG, 1989, WARD, 1998b).

2. GENES ENVOLVIDOS NA TUMORIGÊNESE

A natureza de muitas aberrações genéticas e dos mecanismos de controle que regulam o crescimento celular tem sido deslindados nestes últimos anos. De acordo com o seu mecanismo de ação, os genes sujeitos a mutações no câncer humano podem ser classificados como oncogenes, genes supressores tumorais e genes que controlam a morte celular (WARD, 1997, 2000).

Mutações ativadoras de oncogenes - através de translocação cromossômica, amplificação gênica, inserção retroviral ou mutações pontuais, podem induzir o crescimento celular ou a transformação de uma variedade de tecidos humanos (BISHOP, 1987; WEINBERG, 1989). Estas mutações

normalmente agem de uma maneira dominante, isto é, a mutação de um único alelo é suficiente para evocar o fenótipo neoplásico.

Genes supressores tumorais (GST) atuam inibindo ou evitando a expressão do fenótipo tumorigênico (FAGIN, 1994). Ao contrário das mutações em oncogenes, os GSTs tendem a atuar de maneira recessiva, isto é, ambos alelos devem estar mutados para o fenótipo ser plenamente expresso. Mesmo se um alelo anormal é herdado, o alelo normal remanescente é suficiente para proteger contra o desenvolvimento tumoral (KNUDSON, 1971).

Para a maioria dos cânceres humanos, os genes mais freqüentemente mutados são os GST, com a notável exceção das leucemias e linfomas.

3. OS TUMORES DE TIROIDE, ADRENAL E MAMA

Os cânceres de glândulas endócrinas são relativamente raros, representando apenas 1,2% dos novos casos de câncer (WINGO *et al*, 1995).

O câncer de tiróide é o mais comum (90%) entre os de origem endócrina e é responsável pela maioria das mortes por neoplasia endócrina (63%) (CORREA & CHEN, 1995). A incidência de neoplasia de tiróide é aumentada em certas síndromes hereditárias, incluindo polipose familiar de cólon (BELL & MAZZAFERRI, 1993), Doença de Cowden (SHAPIRO, 1988) e MEN 1 (PEARCE, 1997; LAIRMORE & WELLS, 1997).

O carcinoma adrenocortical é extremamente raro no ser humano, sua incidência é de aproximadamente um caso para cada 1.700.000 pessoas (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1975). Embora rara, esta neoplasia se torna extremamente interessante do ponto de vista genético pois a susceptibilidade a tumores de adrenal parece ser herdada em alguns indivíduos, como nas Síndromes de Beckwith-Wiedemann, (BECKWITH, 1969); de Li e Fraumeni (LI & FRAUMENI, 1982), na Síndrome de Lynch (LYNCH *et al*, 1985) e MEN1 (TRUMP, 1996). As lesões de adrenal observáveis na MEN1 vão desde hiperplasia cortical macronodular, adenomas corticais até carcinomas.

O câncer de mama é o carcinoma não-dermatológico mais comum entre as mulheres. A predisposição genética é responsável por 5-10% dos casos,

mas a maioria dos casos se deve a mutações esporádicas, com complexas interações de fatores (HAMPL *et al*, 1997). Os genes mais freqüentemente mutados em carcinoma de mama são BRCA 1 e BRCA 2, localizados respectivamente nos cromossomas 17 e 13. Não se encontra na literatura associação entre MEN1 e carcinoma de mama, embora tenha sido encontrada perda alélica em tumores de mama no locus do gene MEN1, 11q13 (ZHUANG *et al*, 1995, CHUAQUI *et al*, 1997).

4. FATORES METODOLÓGICOS

A maioria dos tumores estudados neste projeto estava fixado em fenol e embebida em parafina. O processo para a fixação em parafina envolve uma etapa em que o tecido é imerso em solução de formol tamponado, por um tempo variável. KARLSEN *et al* (1994) descrevem as modificações sofridas na estrutura do DNA fixado em formol, dificultando a amplificação desse pelo PCR. O formol reage com o DNA através de interação com pontes de hidrogênio, fixação de proteínas histônicas, e hidrometilação de ácidos nucleicos. Segundo os autores, o DNA assim fixado está desnaturado pelas modificações descritas, dificultando a amplificação de fragmentos de mais que 200 pares de bases (bp), em proporção direta com o tempo de fixação em

formol, mas, para fragmentos de até 200 pb, o DNA isolado de tecidos embebidos em parafina, após fixação com formol, pode ser utilizado em PCR.

Apesar de necessitar de repetição de várias reações para cada amostra até conseguir amplificação adequada, conseguimos amplificar por PCR todas as amostras, tanto em tecido fixado em parafina quanto em tecido colhido a fresco. No entanto, a amplificação foi obtida com muito menor dificuldade quando o DNA era proveniente de tecidos colhidos a fresco. Seguramente obtivemos amplificação pelo fato de escolhermos para estudo fragmentos não maiores do que 200 pares de base (ver TABELA 6).

A deparafinização das amostras é feita com solventes orgânicos, no caso xileno. Tal procedimento consome tempo, é trabalhosa e requer várias etapas de centrifugação e lavagem, processo durante o qual há risco de introdução de contaminantes (FREDRICKS & RELMAN, 1999). Nas reações de PCR, a contaminação foi excluída graças ao uso de controles negativos em todos os ensaios.

Desde o advento da técnica de PCR, (SAIKI *et al*, 1988), várias metodologias associadas foram desenvolvidas. A técnica de SSCP descrita por ORITA *et al* (1989 a e b) baseia-se no fato de que a mobilidade de fitas

simples de DNA em gel não desnaturante de poliacrilamida depende não apenas do seu tamanho, mas também de sua sequência. A alteração na sequência de nucleotídeos leva a alteração conformacional da fita simples de DNA, e conseqüentemente à alteração na migração eletroforética. Desta forma, mutações pontuais ou simples polimorfismos, podem ser detectados. O processo é simples, já que não há necessidade de digestão com enzimas de restrição, *blotting* ou hibridação com probes. MOHABEER, HITI e MARTIN (1991) simplificaram mais ainda o processo introduzindo o uso de um sistema de eletroforese semi-automatizado para SSCP, o PhastSystem (Pharmacia), que dispensava o uso de material radioativo, anteriormente utilizado, e que tem a vantagem de ter as condições de eletroforese bem controladas e uma coloração com prata bem sensível. HAYASHI & YANDELL (1993) estudaram a sensibilidade da SSCP em detectar mutações e os fatores que a influenciam. Chegando à conclusão de que a técnica possui alta sensibilidade, até 96%, especialmente para fragmentos de até 200 pb, para fragmentos entre 300 e 350 pb a sensibilidade cai para 80%. Além do tamanho dos fragmentos pesquisados, outros fatores que influenciam a sensibilidade da SSCP são a temperatura e a concentração salina, a maioria dos fragmentos de fita de DNA tem conformação mais compacta em temperaturas mais baixas. Baseados na

experiência de inúmeros laboratórios, recomendam que a eletroforese seja otimizada testando dois ou três conjuntos de condições.

5. O GENE MEN1 COMO SUSPEITO NA PATOGÊNESE DE TUMORES ESPORÁDICOS

Já existiam na literatura indicativos de que no cromossoma 11q13, locus do gene MEN1, estaria um gene envolvido na carcinogênese de tumores esporádicos, endócrinos e não-endócrinos, nos mesmos tecidos afetados na Síndrome da Neoplasia Endócrina Múltipla e também em tecidos não afetados na síndrome. Os estudos feitos se basearam na técnica de perda de heterozigosidade (*loss of heterozigosity*: LOH), técnica utilizada para pesquisa de genes supressores tumorais, realizada em tecidos tumorais comparando-se alelos gênicos no tecido tumoral com as células normais do mesmo paciente. A perda heterozigosidade no tecido tumoral significa que um locus foi perdido em relação ao tecido normal, e o desenvolvimento tumoral indica que o alelo mantido está mutado, não exercendo sua função de supressão tumoral, sendo isso confirmado pela pesquisa de mutação germinativa.

A demonstração de alta frequência de LOH em 11q13, o locus do gene MEN1, em tumores esporádicos, não só nos tecidos afetados pela Síndrome, mas também em tumores de outros tecidos, que se encontram associados em maior frequência à Síndrome ou não, leva a considerar a possibilidade de que mutação nesse gene seja importante ou esteja implicada na patogênese desses tumores.

Como o exon 2 do gene MEN1 era descrito como o mais frequentemente mutado em tumores pesquisados (EUROPEAN CONSORTIUM ON MEN1, 1997) foi esse exon que escolhemos para triagem de mutações em um extenso número de tumores endócrinos e não-endócrinos.

Nossos resultados, quanto à triagem de mutação no exon 2 do gene MEN1, através da técnica de PCR-SSCP, em tumores de tiróide, adrenal e mama, resultou negativa. Isso tanto pode ser por que não há, realmente, mutação nesse exon nos tumores pesquisados, ou por que a técnica por nós utilizada não foi sensível o suficiente para detectar mutação.

A sensibilidade da técnica utilizada, PCR-SSCP, já foi discutida, assim como os fatores que podem influenciá-la, sendo uma técnica adequadamente sensível. Passamos, então, a discutir outras hipóteses.

6. MUTAÇÕES DO GENE MEN 1 EM TUMORES ESPORÁDICOS

Comparando os dados de LOH em 11q13 e os de mutação em MEN1 em tumores esporádicos podemos notar que os resultados variam de acordo com o tecido pesquisado.

Procurando por mutação no gene MEN1 em tumores esporádicos de paratiróide, HEPPNER *et al* (1997) encontraram mutação no gene MEN1 em todos os casos que apresentavam LOH em 11q13; e FARNEBO *et al*, 1998, encontraram mutação em MEN1 em 50% dos casos que apresentavam LOH em 11q13.

Em tumores enteropancreáticos, 33% dos gastrinomas esporádicos e 17% insulinomas esporádicos que apresentavam LOH em 11q13 apresentavam mutação no gene MEN1 (ZHUANG *et al*, 1997a). GORTZ *et al*

(1999b) encontraram dados semelhantes, sendo o LOH em 11q13 2 a 3 vezes mais freqüente que a mutação em MEN1.

Em tumores esporádicos de hipófise anterior, ZHUANG *et al*, (1997b), encontraram mutação em MEN1 em metade dos casos que apresentavam LOH em 11q13, e TANAKA *et al* (1998) encontraram mutação no gene MEN1 em apenas 1 de 31 casos, o qual também apresentava LOH em 11q13. PREZANT *et al* (1998) não encontrou mutação em MEN1 em nenhum de 45 tumores esporádicos de hipófise.

NORD *et al* (1999) não encontraram nenhuma mutação no gene MEN1 em 60 carcinomas foliculares de tiróide, apesar de terem encontrado 20% de LOH em 11q13 nos tumores estudados, sugerindo que algum outro gene nessa região possa estar envolvido na tumorigênese de tumores foliculares de tiróide.

BECKERS *et al* (1992) descrevem LOH em 11q13 tanto em tumores adrenocorticais esporádicos quanto em tumores de adrenal de pacientes com MEN 1. KJELLMAN *et al*, (1999), GORTZ *et al* (1999a), HEPPNER *et al* (1999) em carcinomas e adenomas de adrenal, não encontraram nenhuma

mutação em MEN1, apesar de terem demonstrado LOH em 11q13 nos tumores estudados. SCHULTE *et al*, (1999 e 2000) descreveram dois casos de mutação em MEN1: em 1 de 16 adenomas de adrenal e em 1 de 14 carcinomas de adrenal, todos esporádicos, sendo que no último caso a expressão do RNA mensageiro estava intacta, tornando improvável que a inativação transcripcional do gene MEN1 seja causal nesses tumores. Dados confirmados por ZWERMANN *et al* (2000), que investigaram se a expressão reduzida do gene, que poderia ser causada por mutações na região promotora do gene, por exemplo, estaria presente em tumores de adrenal, os autores concluíram que os níveis de RNA mensageiro do gene MEN1 estavam inalterados na maioria dos tumores adrenocorticais estudados.

Na Literatura não há relato de qualquer pesquisa de mutação em MEN 1 em tumores de mama, apesar de haver achados de LOH em 11q13 em tumores pesquisados (ZHUANG *et al* , 1995;. CHUAQUI *et al*, 1997).

Os dados da Literatura mostram que o gene MEN1 pode estar envolvido na patogênese em uma percentagem de tumores esporádicos que acometem os mesmos tecidos afetados pela Síndrome, como paratiróide, tecido endócrino enteropancreático, e, em menor proporção, hipófise. Mas que muito

provavelmente não está implicado em outros tumores estudados, como de tiróide e adrenal. Os achados de alta prevalência de perda alélica no locus 11q13, no entanto, sugerem que nessa região possa existir outro gene supressor tumoral (CHAKRABATTI *et al*, 1998).

CONCLUSÕES

Conseguimos cumprir os nossos objetivos, obtendo extração de DNA de tumores embebidos em parafina e de tecidos coletados e congelados a fresco. Obtivemos amplificação por PCR e realizamos a triagem de mutações pela técnica SSCP do fragmento gênico almejado em todos os casos.

Nossos resultados, em que não encontramos mutação no exon 2 do gene MEN 1 nos tumores de tiróide, adrenal e mama estudados, são compatíveis com os mais recentes dados da literatura. Ao contrário do que os estudos demonstrando perda alélica em 11q13 sugeriam, a pesquisa de mutações nesse mesmo gene em tumores esporádicos não associados à síndrome mostraram uma incidência muito baixa.

Estes dados sugerem que o gene MEN1 não está diretamente implicado na tumorigênese do câncer de tiróide, de adrenal ou de mama.

SUMMARY

Besides the mutations that underlie most cases of familial or sporadic Multiple Endocrine Neoplasia syndrome, somatic mutations of the MEN1 gene has also been described in sporadic tumors like gastrinomas, insulinomas and bronchial carcinoid, where MEN 1 is the known gene most frequently mutated.

In order to determine whether the gene could also be involved in other types of endocrine and non-endocrine tumors, we examined this gene for exon 2 mutations in thyroid, adrenal and breast tumors. We performed polymerase chain reaction -single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique to screen exon 2 of the MEN1 gene of 78 sporadic thyroid tumors: 28 follicular adenomas (FA), 35 papillary carcinomas (PC), 14 follicular carcinomas (FC) and 1 anaplastic thyroid carcinoma (Ana). We also examined 46 adrenal lesions (3 hyperplasias, 3 adenomas and 35 adrenocortical carcinomas, 2 pheochromocytomas, 2 ganglioneuroblastomas, 1 lymphoma) and 24 breast cancers (6 noninvasive, 16 infiltrating ductal, 2 invasive lobular).

DNA was obtained using phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation from 108 formalin-fixed, paraffin embedded samples and other 40 fresh tumor tissues. A non-radioactive PCR-SSCP was performed using 5 pairs of *primers* to encompass the complete coding sequence of exon 2 of the MEN 1 gene where most mutations have been described.

The product of PCR of 5 tumors suspected to present bands shift at SSCP was submit to direct sequencing, sense and antisense, but did not identify mutations.

These results suggest that exon 2 of MEN 1 gene is not important in breast, thyroid or adrenal sporadic tumorigenesis.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S.K.; GURU, S.C.; HEPPNER, C.; ERDOS, M.R.; COLLINS, R.M.; PARK, S.Y.; SAGGAR, S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.C.; COLLINS, F.S.; SPIEGEL, A.M.; MARX, S.J.; BURNS, A.L. - Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. Cell 96(1):143-152, 1999.
- BARDHAM, L; STAGE, J.G. - Frequency of endocrine disorders in patients with the Zollinger-Ellinson syndrome. Scand J Gastroenterol, 20(2):233-238, 1985.
- BEAHR, O.R.; HENSON, D.E.; HUTTER, R.V.P. MYERS, MYERS, M.H. - Manual for staging of cancer : American Joint Committee on Cancer. 4 ed: Philadelphia, JB Lippincott, 1992.
- BECKERS, A.; ABS, R.; WILLEMS, P.J.; AUWERA, B.; KOVACS, K.; REZNIK, M.; STEVENAERT, A. - Aldosterone secreting adrenal adenoma as part of multiple endocrine neoplasia type 1(MEN1): loss of heterozygosity for polymorphic chromosome 11 deoxyribonucleic acid markers, including the MEN 1 locus. J. Clin. Endocrinol. Metabol., 75(2): 564-569, 1992.

- BECKWITH, J.P. - Macroglossia, omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism and hyperplastic visceromegaly. Birth Defects Orig. Art. Ser. 5: 188-196, 1969.
- BELL, B.& MAZZAFERRI, E.L. - Thyroid cancer in familial poliposis coli: case report and literature review. Dig. Dis. Sci. 38: 185, 1993.
- BERDJIS, C.C. - Pluriglandular syndrome: Multiple endocrine adenomas in man. A report of five cases and a review of the literature. Oncologia 15:288-311, 1962.
- BISHOP, JM. - The molecular genetics of cancer. Science, 235:305-311, 1987.
- BOGGILD, M.D.; JENKINSON, S.; PISTORELLO, M.; BOSCARO, M.; SCANARINI, M.; McTERNAN, P.; PERRETT, C.W.; THAKKER, R.V.; CLAYTON, R.N. -molecular genetics studies of sporadic pituitary tumors. J Clin Endocrinol Metabol 78(2):387-392, 1994.
- CHANDRASEKHARAPPA, S.C.; GURU, S.C.; MANICKAM, P.; OLUFEMI, S.E.; COLLINS, F.S.; EMMERT-BUCK, M.R.; CRABTREE, J.S.; WANG, Y.; ROE, B.A.; WEISEMANN, J.; BOGUSKI, M.S.; AGARWAL, S.K.; KESTER, M.B.; KIM, Y.S.; HEPPNER, C.; DONG, Q.; SPIEGEL, A.M.; BURNS, A.L.; MARX, S.; - Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. Science 276 : 404-7, 1997.

- CHAKRABATTI, R.; SRIVATSAN, E.S.; WOOD, T.F.; EUBANKS, P.J.;
EBRAHIMI, A.S.; GATTI, R.A.; PASSARO, E.; SAWICKI, M.P. -
Deletion mapping of endocrine tumors localizes a second tumor
supressor gene on chromosome band 11q13. Genes Chromosomes and
Cancer 22:130-137, 1998.
- CHUAQUI, R.F.; ZHUANG, Z.; EMMERT BUCK, M.R.; LIOTTA, L.A.;
MERINO, M.J. - Analysis of loss of heterozygosity on chromosome
11q13 in atypical ductal hyperplasia and in situ carcinoma of the breast.
American Journal of Pathology 150(1):297-303, 1997.
- CORREA, P.& CHEN, V.W. - Endocrine glands cancer. Cancer, 75: 388,
1995.
- DEBELENKO, L.V., ZHUANG, Z.; EMMERT-BUCK, M.R. - Allelic
deletions on chromosome 11q13 in MEN 1 associated and sporadic
duodenal gastrinomas and pancreatic endocrine tumors. Cancer Res. 57:
2238-2243, 1997b.

- DEBELENKO, L.V.; BRAMBILLA, E.; AGARWAL, S.K.; SWALWELL, J.I.; KESTER, M.B.; LUBENSKY, I.A.; ZHUANG, Z.; GURU, S.C.; CRABTREE, J.S.; KIM, Y.S.; HEPPNER, C.; BURNS, A.L.; SPIEGEL, A.M.; MARX, S.J.; LIOTTA, L.A.; COLLINS, F.S.; TRAVIS, W.D.; EMMERT BUCK, M.R. - Identification of MEN1 gene mutations in sporadic carcinoid tumors of the lung. Hum Mol Genet 6:2285-90, 1997a.
- ERDHEIM, J. - Zur normalen und pathologischen histologie der glandular thyreoidea, parathyreoidea und hypophysis. Beitr Pathol Anat Allergy Pathol 33: 158-236, 1903.
- EUROPEAN CONSORTIUM ON MEN1. Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. Hum Mol Genet 7: 1177-1183, 1997.
- FAGIN, J.A. - Molecular pathogenesis of human thyroid neoplasms. Thyroid Today, 17: 1-7, 1994.
- FARNEBO, F.; TEH, B.T.; KYTOLA, S.; SVENSSON, A.; PHELAN, C.; SANDELIN, K.; THOMPSON, W.N.; HOOG, A.; WEBER, G.; FARNEBO, L.O.; LARSSON, C. - Alterations of the MEN1 gene in sporadic parathyroid tumors. J Clin Endocrinol Metabol, 83(8): 2627-2630, 1998.

- FRIEDMAN, E.; DeMARCO, L.; GELMAN, P.V.; NORTON, J.A.; BALE, A.E.; AURBACH, G.D.; SPIEGEL, A.M.; MARX, S.J. - Allelic loss from chromosome 11 in parathyroid tumors. Cancer Res. 52(24):6804-6809, 1992.
- FREDRICKS, D.N.; RELMAN, D.A.; - Paraffin removal from tissue sections for digestion and PCR analysis. BioTechniques 26(2): 198-200, 1999.
- GOBL, A.E.; BERG, M.; LOPEZ EGIDO, J.R.; OBERG ,K.;SKOGSEID, B.; WESTIN, G. - Menin represses JunD-activated transcription by a histone deacetylase-dependent mechanism. Biochimica et Biophysica Acta 1447:51-6, 1999.
- GORTZ, B.; ROTH, J.; SPEEL, E.J.; KRAHENMANN, A.; KRIJGER, R.R.; GUIU, M.X.; FEURER, S.M.; RUTMANN, K.; SAREMASLANI,P.; HEITZ, F. U.; KOMMINOTH, P. - MEN1 gene mutation analysis of sporadic adrenocortical lesions. Int. J. Cancer. 80: 373-379, 1999a.
- GORTZ, B.; ROTH, J.; KRAHENMANN, A.; KRIJGER, R.R.; FEURER, S.M; RUTIMANN, K.; SAREMASLANI,P.; SPEEL, E.J.; HEITZ, F. U.; KOMMINOTH, P. - Mutations and allelic deletions of the MEN1 gene are associated with a subset of sporadic endocrine pancreatic and neuroendocrine tumors and not restricted to foregut neoplasms. Am J Pathol, 154(2):429-436, 1999b.

- GURU, S.C.; GOLDSMITH, P.K.; BURNS, A.L.; MARX, S.J.; SPIEGEL, A.L.; COLLINS, F.S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.C. Menin, the product of the MEN1 gene, is a nuclear protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:1630-1634, 1998.
- HAYASHI, K.; YANDELL, D.W. - How sensitive is PCR-SSCP? Hum Mutat 2:338-346, 1993.
- HAMPL, M.; CHANG-CLAUDE, J.; SCHAWAZ, P.; SAEGR, H.D. SCHACKERT, H.K. Molecular genetics of hereditary breast cancer. Zentralbl. Chir. 122(2): 67-73, 1997.
- HEPPNER, C.; KESTER, M.B.; AGARWAL, S.K.; DEBELENKO, L.V.; EMMERT BUCK, M.R.; GURU, S.C.; MANICKAM, P.; OLUFEMI, S.E.; SKARULIS, M.C.; DOPPMAN, J.L.; ALEXANDER, R.H.; KIM, Y.S.; SAGGAR, S.K.; LUBENSKY, I.A.; ZHUANG, Z.; LIOTTA, L.A.; CHANDRASEKHARAPPA, S.C.; COLLINS, F.S.; SPIEGEL, A.M.; BURNS, A.L.; MARX, S.J. - Somatic mutation of the MEN1 gene in parathyroid tumors. Nature Genetics 16:375-8, 1997.
- HEPPNER, C.; REINCKE, M.; AGARWAL, S.K.; - MEN1 gene mutations analysis of sporadic adrenocortical neoplasms. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 84: 216-219, 1999.

- JACKSON, C.E; BOONSTRA, C.E. - The relationship of hereditary hyperparathyroidism to endocrine adenomatosis. Am J Med 43: 727-734, 1967.
- KAJI, H.; CANAFF, L.; GOLTZMAN, D.; HENDY, N.G. - Cell cycle regulation of menin expression. Cancer Res. 59:5097-5101, 1999.
- KARLSEN, F.; KALANTARI, M.; CHITEMERERE, M.; JOHANSSON, B.; HAGMAR, B. - Modifications of human and viral deoxiribonucleic acid by formaldehyde fixation. Lab Invest. 71(4):604-611, 1994.
- KIM, Y.S.; BURNS, A.L.; GOLDSMITH, P.K.; HEPPNER, C.; PARK, S.Y.; CHANDRASEKHARAPPA, S.C.; COLLINS, F.S.; SPIEGEL, A.M.; MARX, S.J. - Stable overexpression of MEN1 supresses tumorigenesis of RAS. Oncogene, 18:5936-5942, 1999.
- KITAMURA, Y.; SHIMIZU, K.; TANAKA, S.; ITO, K.; EMI, M. - Allelotyping of anaplastic thyroid carcinoma: frequent allelic loss of 1q, 9p, 11, 17, 19p, 22q. Genes Chromosomes Cancer, 27(3): 244-251, 2000.
- KJELLMAN, M.; ROSHANIL,.; TEH, B.T. - Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-cetimorgan region in 2p16. J. Clin Endocrinol Metabol. 84: 730-735, 1999.

KNUDSON, A.G. - Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Nat Acad Sci USA, 68:820-823, 1971.

KNUDSON, A.G. - Antioncogenes and human cancer. Proc Nat Acad Sci USA, 90:10914-10921,1993.

KLOPPEL, G.; WILLEMAR, S; STAMM, B.;HACKI, W.H.; HEITZ, P.U.
Pancreatic lesions and hormonal profile of pancreatic tumors in multiple endocrine neoplasia type I. An immunocytochemical study of nine patients. Cancer 57(9):1824-32, 1986.

KOPER, J.W.; LAMBERTS, S.W. - Sporadic endocrine tumors and their relationship to the hereditary endocrine neoplasia syndromes. Eur J Clin Invest, 30(6): 493-500, 2000.

LANGSTEIN, H.N.; NORTON, J.A.; CHIANG, V.; O'DORISIO, P.N.; MARX, S.J.; JENSEN, R.T. - The utility of circulating levels of human pancreatic polypeptide as a marker for islet cell tumors. Surgery, 108(6): 1109-1115, 1990.

LARSSON, C.; SKOGSEID, B.; OBERG, K.; NAKAMURA, Y.; NORDENSKJOLD, M. - Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. Nature 332: 85-87, 1998.

- LAIRMORE, T.C.; WELLS, S.A.; Molecular biology of endocrine tumors. In: DeVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. Cancer: Principles & Practices of Oncology. Fifth edition. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997. p.1617-1628.
- LeBODIC, M.F.; HEYMAN, M.F.; LECOMTE, M.; BERGER, N.; BERGER, F.; LOUVEL, A.; DeMICCO, C.; PATEY, M.; DeMASCAREL, A.; BURTIN, F.; SAINT-ANDRE, J.P. - Immunohistochemical study of 100 pancreatic tumors in 28 patients with multiple endocrine neoplasia type I. Am J Surg Pathol, 20(11): 1378-1384, 1996.
- LI, F.P.& FRAUMENI, J.F. - Propective study of a family cancer syndrome. JAMA, 247: 2692-2694, 1982.
- LIU, G.; DURANTEAU, L.; CAREL, J.C.; MONROE, J.; DOYLE, D.A.; SHENKER, A. - Leydig-cell tumors caused by an activating mutation of the gene encoding the luteinizing hormone receptor. N Engl J Med, 241(23):1731-1736, 1999.
- LYNCH, H.T.; KATZ, D.A.; BOGARD, J.P. - The sarcoma, breast cancer, lung, and adrenocortical carcinoma syndrome revisited. Am. J. Dis. Child, 139:134-136, 1985.

MARX, S.J.; AGARWAL, S.K.; KESTER, M.B.; HEPPNER, C.; KIM, Y.S.;
EMMERT BUCK, M.R.; DEBELENKO, L.V.; LUBENSKY, I.A.;
ZHUANG, Z.; GURU, S.C.; MANICKAM, P.; OLUFEMI, S.E.;
SKARULIS, M.C.; DOPPMAN, J.L.; ALEXANDER, R.H.; LIOTTA,
L.A.; COLLINS, F.S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.C.; SPIEGEL,
A.M.; BURNS, A.L. - Germline and somatic mutation of the gene for
multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). Journal of Internal
Medicine 243: 447-453, 1998.

MARX, S.J.; AGARWAL, S.K.; KESTER, M.B.; HEPPNER, C.; KIM, Y.S.;
SKARULIS, M.C.; JAMES, L.A.; GOLDSMITH, P.K.; SAGGAR, S.K.;
PARK, S.Y.; SPIEGEL, A.M.; BURNS, A.L.; DEBELENKO, L.V.;
ZHUANG, Z.; LUBENSKY, I.A.; LIOTTA, L.A.; EMMERT-BUCK,
M.R.; GURU, S.C.; MANICKAM, P.; CRABTREE, J.; ERDOS, M.R.;
COLLINS, F.S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.C. - Multiple endocrine
neoplasia type 1: clinical and genetic features of the hereditary endocrine
neoplasias. Recent Progress Hormone Research , 54: 397-438, 1999a.

- MARX, S.J.; AGARWAL, S.K.; HEPPNER, C.; KIM, Y.S.; KESTER, M.B.; GOLDSMITH, P.K.; SKARULIS, M.C.; SPIEGEL, A.M.; BURNS, A.L.; DEBELENKO, L.V.; ZHUANG, Z.; LUBENSKY, I.A.; LIOTTA, L.A.; EMMERT-BUCK, M.R.; GURU, S.C.; MANICKAM, P.; CRABTREE, J.; COLLINS, F.S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.C. - The gene for multiple Endocrine Neoplasia Type 1: Recent Findings. Bone, 25(1):119-122, 1999b.
- MATSUO, K.; TANG, S.H.; FAGIN, J.A. - Allelotype of human thyroid tumors: loss of chromosome 11q13 sequences in follicular neoplasms. Mol Endocrinol 5:1873-1879, 1991.
- MOHABEER, A.J.; HITI, A.L.; MARTIN, W.J. - Non-radioactive single-strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia PhastSystem. Nucleic Acids Research, 19 (11):3154, 1991.
- MOLDAWER, M.P.; NARDI, G.L.; RAKER, J.W. - Concomitance of multiple adenomas of the parathyroids and pancreatic islet cells with tumor of the pituitary: a syndrome with familial incidence. Am J Med Sci 228:190-206, 1954.

- NORD, B.; LARSSON, C.; WONG, F.K.; WALLIN, G.; TEH, B.T.; ZEDENIUS, J. - Sporadic follicular thyroid tumors show loss of a 200-kb region in 11q13 without evidence for mutations in the MEN1 gene. Genes Chromosomes & Cancer 26: 35-9, 1999.
- NORTON, J.A.; CORNELIUS, M.J.; DOPPMAN, J.L.; MATON, P.N.; GARDNER, J.D.; JENSEN, R.T. - Effect of parathyroidectomy in patients with hyperparathyroidism, Zollinger-Ellison syndrome, and multiple endocrine neoplasia type 1: a prospective study. Surgery 102(6): 958-66, 1987.
- ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T.; - Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci, 86: 2766-2770, 1989a.
- ORITA, M.; SUSUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. - Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5:874-879, 1989b.

- PARMA, J.; DUPREZ, L.; VanSANDE, J.; HERMANS, J.; ROCMANS, P.;
VanVLIET, G.; COSTAGLIOLA, S.; RODIEN, P.; DUMONT, J.E.;
VASSART, G. - Diversity and prevalence of somatic mutations in the
thyrotropin receptor and Gs alpha genes as a cause of toxic thyroid
adenomas. J Clin Endocrinol Metabol, 82(8):2695-2701, 1997.
- PEARCE, S.H. - MEN type 1 (MEN1): recent advances. Clinical
Endocrinology. 47: 513-514, 1997.
- PREZANT, T.R.; LEVINE, J.; MELMED, S. - Molecular characterization of
the MEN 1 tumor suppressor gene in sporadic pituitary tumors. Journal of
Clinical Endocrinology and Metabolism 83: 1388-91, 1998.
- ROSSIER, P.H.; DRESSLER, M. - Familiäre Erkrankung innersekretorischer
Drüsen kombiniert mit Ulkuskrankheit. Schweiz Med Wochenschr 69:
43, 1939.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. - Molecular cloning - a
laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab., Plainview, N.Y. 1989.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.;
HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. - Primer-directed
enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science, 239:487-491, 1988.

- SCHORDERET, D.F.; MUNIER, F.L. - Oncogenes and anti-oncogenes: the genetics of cancer. Schweizerische Rundschau für Medizin Praxis, 85:1019-1022, 1996.
- SCHULTE, K.M.; HEINZE, M.; MENGEL, M.; SIMON, D.; SCHEURING, S.; KÖHRER, K.; RÖHER, H.D. - MEN I gene mutations in sporadic adrenal adenomas. Human Genetics 105: 603-610, 1999.
- SCHULTE, K.M.; MENGEL, M.; HEINZE, M.; SIMON, D.; SCHEURING, S.; KÖHRER, K.; RÖHER, H.D. - Complete sequencing and messenger ribonucleic acid expression analysis of the MEN I gene in adrenal cancer. J Clin Endocrinol Metabol 85: 441-8, 2000.
- SHAPIRO, S.D.; LAMBERT, W.C.; SCHWARTZ, R.A. - Cowden's disease: a marker for malignancy. Int. J. Dermatol. 27: 232, 1988.
- STEINER, A.L.; GOODMAN, A.D.; POWERS, S.R. - Study of a kindred with pheochromocytoma, medullary thyroid carcinoma, hyperparathyroidism and Cushing's disease: Multiple Endocrine Neoplasia, type 2. Medicine 47:371-409, 1968.
- TANAKA, C.; KIMURA, T.; YANG, P.; MORITANI, M.; YAMAOKA, T.; YAMADA, S.; SANO, T.; YOSHIMOTO, K.; ITAKURA, M. - Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 11 and infrequent inactivation of the MEN1 gene in sporadic pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metabol 83(8):2631-2634, 1998.

- TEH, B.T.; GRIMMOND, S.; SHEPHERD, J.J.; LARSSON, C.;
HAYWARD, N. - Multiple Endocrine Neoplasia type 1: clinical
syndrome to molecular genetics. Australian New Zealand Journal of
Surgery 65:708-13, 1995.
- THAKKER, M.R.C. - Editorial: Multiple Endocrine Neoplasia - Syndromes
of the twentieth century. J Clin Endocrinol metabol, 83(8):2617-2620,
1998.
- TRUMP, D.; FARREN, B.; WOODING, C.; PAGE, J. T.; BESSER, G.M.;
BUCHANAN, K.D. - Clinical studies of multiple endocrine neoplasia
type 1. Q J Med, 89: 653-669, 1996.
- UNDERDAHL, L.O.; WOOTNER, L.B.; BLACK, B.M. - Multiple endocrine
adenomas: report of 8 cases in which parathyroids, pituitary and
pancreatic islets were involved. J Clin Endocrinol Metabol. 13:20-47,
1953.
- US DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE,
PUBLIC SERVICE, NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH,
NATIONAL CANCER INSTITUTE. - Incidence data national cancer
monograph. 1975.

- WARD, L.S. - Genética Molecular do câncer: implicações no cancer da tiróide humana. Rev Bras Clin Terap, 23(6):212-218, 1997.
- WARD, L.S.; BRENTA, G.; MEDVEDOVIC, M.; FAGIN, J.A. - Studies of allelic loss in thyroid tumors reveal major differences in chromosome instability between papillary and follicular carcinomas. J. Clin. Endocrinol. Metab. 83, 2:525-530, 1998a.
- WARD, L.S.; FAGIN, J.A.; - Molecular genetics of thyroid cancer: evidence that inactivation of tumor supressor genes occurs at late stages of tumor progression. Molecular and cellular pediatric endocrinology. Press Inc, Totowa, 1998b, 201-211.
- WARD, L.S. - Molecular basis for the diagnosis and therapy of the thyroid cancer. Rev Bras Clin Terap, 26(3):103-107, 2000.
- WEINBERG, R. - Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Cancer Res, 49:3713-3721, 1989.
- WERMER, P. - Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands. Am J Med 16:363-371, 1954.
- WERMER, P. - Multiple endocrine adenomatosis: Multiple hormone-producing tumors, a familial syndrome. Clin Gastroenterol 3:671-684, 1974.

WINGO, P.A.; TONG, T., BOLDEN, S. - Cancer statistics. J. Clin. Cancer, 45-48, 1995.

ZHUANG, Z.; MERINO, M.J.; CHUAQUI, R. LIOTTA, L.A.; EMMERT-BUCK, M.E. - Identical allelic loss on chromosome 11q13 in microdissected in situ and invasive human breast cancer. Cancer Res. 55: 467-471, 1995.

ZHUANG, Z.; VORTMEYER, A.O.; PACK, S.; HUANG, S.; PHAM, T.A.; WANG, C.; PARK, W.S.; AGARWAL, S.K.; DEBELENKO, L.V.; KESTER, M.; GURU, S.C.; MANICKAM, P.; OLUFEMI, S.E.; YU, F.; HEPPNER, C.; CRABTREE, J.S.; SKARULIS, M.C.; VENZON, D.J.; EMMERT BUCK, M.R.; SPIEGEL, A.M.; CHANDRASEKHARAPPA, S.C.; COLLINS, F.S.; BURNS, A.L.; MARX, S.J.; LUBENSKY, I.A. - Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic gastrinomas and insulinomas. Cancer Res 57:4682-4686, 1997a.

ZHUANG, Z.; EZZAT, S.Z.; VORTMEYER, A.O.; WEIL, R.; OLDFIELD, E.H.; PARK, W.S.; PACK, S.; HUANG, S.; AGARWAL, S.K.; GURU, S.C.; MANICKAM, P.; DEBELENKO, L.V.; KESTER, M.B.; OLUFEMI, S.E.; HEPPNER, C.; CRABTREE, J.S.; BURNS, A.L.; SPIEGEL, A.M.; MARX, S.J.; CHANDRASEKHARAPPA, S.C.; COLLINS, F.S.; EMMERT BUCK, M.R.; LIOTTA, L.A.; ASA, S.L.; LUBENSKY, I.A. - Mutations of the MEN1 tumor supressor gene in pituitary tumors. Cancer Res 57:5446-5451, 1997b.

ZWERMANN,O.; BEUSCHLEIN, F.; MORA, P.; WEBER, G.; ALLOILIO, B.; REINCKE, M. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene expression is normal in sporadic adrenocortical tumors. Eur J Endocrinol, 142(6): 689-695, 2000.