

Nilce Barril

**Análise Citogenética de Tecidos Tiroideanos
Benignos e Malignos Através da Técnica
de Hibridação in Situ Fluorescente**



Nilce Barril

**Análise citogenética de tecidos tiroideanos
benignos e malignos através da técnica de
hibridação *in situ* fluorescente**



865/99

Tese apresentada para obtenção
do Grau de Doutor em Ciências
Biológicas-Genética.

já zerocado

São José do Rio Preto - SP

1998

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista – UNESP.



Dedico este trabalho a minha filha,

Ana Carolina,

com todo meu amor.



AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, agradeço a todos que incentivaram e colaboraram direta ou indiretamente para a sua concretização.

À Profa. Dra. Eloíza Helena Tajara da Silva pela orientação, colaboração, compreensão e apoio que me permitiram conciliar a vida pessoal e profissional com a realização deste trabalho.

Às Profas. Dra. Ana Elisabete Silva, Dra. Lúcia Regina Martelli, Dra. Joyce Duffles Andrade e ao Prof. Dr. José Vitor Maniglia pela atenção e por todas as valiosas sugestões durante a análise da pro forma.

Ao amigo Josué Rodrigues dos Santos, pelo auxílio técnico durante a realização da parte experimental.

À Profa. Dra. Ana Elisabete Silva, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, e aos demais docentes desse curso que sempre nos acompanharam com empenho e dedicação.

À Profa. Dra. Nívea Conforte Froes pelas valiosas sugestões e pela concessão do microscópio de fluorescência para a realização das análises.

Ao Laboratório de Patologia do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pela concessão dos blocos dos seus arquivos.

Ao Serviço de Verificação de Óbito da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pela concessão das amostras de tecido tiroideano normal.

A todos os pacientes, colaboradores anônimos, que aqui foram mencionados apenas por um código, sem eles, nada disto teria acontecido.

À Andrea Borduchi Carvalho Sales com quem dividi os sucessos e fracassos durante o período de implantação da técnica de FISH deste laboratório.

A minha grande amiga, acho até que irmã, Mônica Vanucci Nunes Lipay, pelo carinho, compreensão e solidariedade.

Aos demais colegas do Curso de Pós-Graduação pelo ambiente fraterno e cordial.

Aos meus amigos pessoais que, durante a realização deste trabalho, sempre me olharam com olhos de compreensão.

Ao João Marcos pela resistência e apoio.

A minha filha, Ana Carolina, pela alegria de viver e pela força que me incentivava a continuar.

Ao meu inesquecível filho, Vitor (in memoriam), que de algum lugar do Mundo Maior me deu forças e disposição para continuar apesar da sua ausência física.

A minha mãe, Dirce, pela educação, carinho e esforço desempenhado para a minha formação profissional.

À minha irmã Nanci e aos meus queridos sobrinhos Guilherme e Cláudio Júnior, pelo carinho e apoio.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das condições materiais.

Ao Pai Maior e a espiritualidade amiga, que me deram inteligência e saúde para o convívio com todas essas pessoas e confiança para cumprir minha tarefa.

Nilce.

Durante a realização deste trabalho, foram redigidos para publicação os seguintes artigos:

- 1) A rapid technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by fluorescent *in situ* hybridization with alpha-satellite probes. **Genet. Mol. Biol.**, in press.
- 2) Interphase cytogenetic analysis of normal tissue of thyroid gland by fluorescence *in situ* hybridization. **Cancer Genet. Cytogenet.**, submitted.
- 3) Detection of numerical anomalies in interphase cells of benign and malignant thyroid lesions using fluorescence *in situ* hybridization. **Cancer Genet. Cytogenet.**

Índice

I. Introdução	1
I.1. Anatomia e fisiologia da glândula tiróide.....	1
I.2. Doenças tiroideanas	2
I.3. Alterações cariotípicas das lesões tiroideanas.....	7
I.4. Alterações moleculares das lesões tiroideanas.....	9
II. Objetivos.....	24
III. Artigos para publicação.....	25
Artigo 1	26
Artigo 2	35
Artigo 3	45
IV. Discussão e conclusões	68
V. Resumo	73
VI. Summary	75
VII. Referências bibliográficas	77

I. INTRODUÇÃO

I.1. Anatomia e fisiologia da glândula tiróide

A glândula tiróide está localizada imediatamente abaixo da laringe e seu desenvolvimento ocorre a partir do crescimento do duto tireoglosso e de parte do último arco branquial (Williams, 1995). Torna-se funcional por volta da 10a. semana de vida fetal e atinge seu tamanho normal aproximadamente aos 15 anos de idade, quando então é formada por dois lobos que lhe confere um aspecto de borboleta. Cada lobo é constituído por estruturas esféricas denominadas folículos ou ácinos, cujas paredes são revestidas por epitélio cubóide. O lúmen dos folículos é preenchido por uma substância, o colóide, que contém a proteína típica da glândula, ou seja, a tireoglobulina. Além dos folículos, a glândula possui uma pequena população de células conhecidas como células C, que secretam a calcitonina, um hormônio envolvido no metabolismo do cálcio (Wartofsky & Ingbar, 1991; Larsen, 1993; Guyton & All, 1997).

As substâncias produzidas pela tiróide desencadeiam a transcrição de um grande número de genes, o que leva à síntese de diferentes enzimas, proteínas estruturais e transportadoras e, conseqüentemente, à elevação do metabolismo basal e do gasto energético. Sua secreção é controlada pelo hormônio estimulante da tiróide ou tireotrófico (TSH), que é produzido pelo lobo anterior da hipófise (Cotran *et al.*, 1994). Tal controle é iniciado com a ligação do TSH a receptores específicos na membrana da célula, o que ativa a ciclase do adenilato aumentando a formação de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O AMPc,

por sua vez, estimula quinases citoplasmáticas e desencadeia múltiplas fosforilações, cujo resultado final é a produção de hormônios tiroideanos (Guyton & All, 1997).

A síntese desses hormônios depende da presença de iodo, que é bombeado ativamente do plasma para o interior da célula. No retículo endoplasmático é sintetizada a tireoglobulina, que contém 70 aminoácidos tirosina, posteriormente iodados pela forma oxidada do iodo para formação de dois importantes hormônios, a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3), a partir de seus precursores, a moniodotirosina (MIT) e a diiodotirosina (DIT). Essas moléculas permanecem como parte da molécula de tireoglobulina durante sua síntese e, mesmo depois, como hormônios armazenados no colóide folicular (Larsen, 1993; Guyton & All, 1997).

1.2. Doenças tiroideanas

A tiróide é sede de diferentes doenças benignas e malignas consequentes da ação de agentes etiológicos ambientais ou endógenos. Tais doenças apresentam-se principalmente sob a forma de hipertiroidismo, hipotiroidismo e de um aumento da glândula conhecido como bócio. De acordo com Cotran *et al.* (1994), o hipertiroidismo é resultante da produção elevada de T3 e T4, sendo comumente causado por hiperplasia difusa da glândula (doença de Graves). Menos frequentemente, pode ser consequência de um foco hiperfuncionante dentro de um bócio colóide, de um tumor benigno ou maligno com capacidade de elaborar hormônio tiroideano e, raramente, da doença autoimune tiroidite de



Hashimoto. Intolerância ao calor, aumento da sudorese, perda de peso e nervosismo, entre outros sintomas, são as principais manifestações clínicas do hipertiroidismo. O hipotiroidismo, por outro lado, é causado pela deficiência de T3 e T4 e, em geral, os efeitos são opostos aos do hipertiroidismo, sendo caracterizados por sonolência extrema, atividade muscular lenta, frequência cardíaca baixa e aumento de peso. De qualquer modo, a gravidade do quadro clínico depende da concentração de hormônio presente e da idade na qual a deficiência apareceu pela primeira vez. Quando a falta do hormônio é congênita ou presente no período neonatal o quadro clínico é severo resultando em cretinismo. Por outro lado, quando ocorre na infância ou na vida adulta ele é menos severo, podendo causar pouca ou nenhuma manifestação clínica ou ainda, nos casos mais graves, levar ao desenvolvimento de um aspecto edematoso em todo corpo conhecido como mixedema (Cotran *et al.*, 1994; Guyton & All, 1997).

A tiróide pode sofrer processos inflamatórios conhecidos como tiroidites que, embora tendo a inflamação como componente comum, revelam diferenças acentuadas nas suas apresentações clínicas e etiológicas. Existem três tipos de tiroidites, as agudas, as subagudas e as crônicas. As agudas são consequentes de infecção bacteriana, as subagudas decorrem de infecção viral e têm manifestações de hipertiroidismo e as formas crônicas compreendem a tiroidite de Riedel e de Hashimoto. A tiroidite de Riedel, de incidência rara e causa desconhecida, manifesta hipotiroidismo por infiltração fibrosa esclerosante. A de Hashimoto trata-se de doença aparentemente auto-imune, estreitamente relacionada à doença de Graves, cujo sintoma mais importante costuma ser o hipertiroidismo (Larsen, 1993).



Um outro tipo de hipotireoidismo ocorre frequentemente associado com hiperplasia da glândula e é conhecido como bócio. Compreende lesões benignas cuja etiologia está ligada a diversos fatores, destacados por Woeber (1991), Larsen (1993) e Guyton & All (1997) como alterações no suprimento dietético de iodo, no nível das demandas metabólicas dos tecidos periféricos ou nos níveis de TSH e de globulina de conjugação da tireóide (TBG), além de alterações nas enzimas ou receptores teciduais relacionados com os hormônios da tireóide. Nessas condições, as concentrações de tiroxina e de triiodotironina, inferiores às exigidas, resultam na secreção de quantidades excessivas da tireoglobulina nos folículos e no consequente aumento de tamanho da glândula.

Três tipos principais de bócios podem ser descritos, o colóide multinodular, o familiar e o iatrogênico. Todos constituem lesões proliferativas múltiplas ou isoladas caracterizadas por hiperplasia circunscrita de folículos. Embora tenham caráter benigno, alguns experimentos realizados em rato, referidos por Roque *et al.* (1998), demonstraram que uma terapia indutora de bócio pode levar ao desenvolvimento de nódulos e adenomas e, posteriormente, de carcinomas. Os estudos desenvolvidos por Galanti *et al.* (1995) também indicaram que o risco de câncer de tireóide no homem aumenta após a exposição a ambientes com deficiência moderada a severa de iodo e sugerem dois padrões diferentes dessa associação, dependendo do carcinoma. No tipo folicular, a duração da carência é provavelmente o determinante mais importante enquanto, no tipo papilar, parece haver relação do aumento do risco quando o período de deficiência ocorre por ocasião da adolescência, ou seja, no início da atividade endógena dos hormônios sexuais.

Em relação aos processos neoplásicos, os tumores tiroideanos podem ser benignos ou malignos, sendo esses últimos de especial importância por serem causa de morbidade e mortalidade na população geral. Os benignos ou adenomas são classificados em três tipos principais, o folicular, o papilar e o atípico, e apresentam um potencial cancerígeno muito pequeno (Wartofsky & Ingbar, 1991). No grupo folicular, são colocados todos os adenomas que produzem padrões glandulares simples ou acinares, sendo divididos em duas categorias, aqueles que produzem quantidades significativas de hormônios e os não funcionais, que são mais comuns. Esses tumores podem ocorrer em qualquer porção da tiróide e em qualquer grupo etário, sendo mais comumente detectados em adultos. As formas papilares são bastante variáveis e incluem lesões bem diferenciadas e ordenadas. Apesar da aparência benigna, alguns podem apresentar recidiva após tratamento ou disseminar-se aos glânglios regionais. No grupo dos atípicos são incluídos todos os adenomas que não se encaixam em qualquer dos dois padrões acima mencionados (Larsen, 1993; Cotran *et al.*, 1994).

Virtualmente, todos os tumores malignos da tiróide são de origem epitelial e, portanto, carcinomas. Segundo Wartofsky & Ingbar (1991) são classificados conforme aspectos histopatológicos e comportamento clínico em dois grupos, aqueles que surgem das células C ou medulares e aqueles originados do epitélio folicular da tiróide. Esses últimos são subdivididos em papilar, folicular e anaplásico ou indiferenciado. Os papilares constituem a categoria mais benigna e comum, sendo as mulheres mais frequentemente afetadas. Variam grandemente em tamanho, podendo apresentar-se sob a forma de focos microscópicos, encontrados na glândula ou em linfonodos cervicais, ou de nódulos com cerca de



10 centímetros de diâmetro. Em nível microscópico, exibem epitélio bem diferenciado cobrindo projeções papilares e, em alguns casos, mostram elementos foliculares. De modo geral, o carcinoma papilar é facilmente curável por excisão do lobo tiroideano comprometido e dos linfonodos aumentados (Larsen, 1993).

O segundo padrão de carcinoma tiroideano, o folicular, é também mais frequente em mulheres e sua incidência tende a aumentar com a idade. Apresenta desde formas bem diferenciadas, com tecido tiroideano de aspecto praticamente normal, até camadas quase sólidas de epitélio folicular com pouca evidência de formação de folículos (Larsen, 1993). Como salientado por Cotran *et al.* (1994), assemelha-se aos papilares pelo fato de exibir crescimento lento e ser frequentemente curável, mas difere pela ausência de estruturas papilares e tendência de disseminar-se pela corrente sanguínea para locais mais distantes que os glânglios regionais. O prognóstico e a sobrevivência dos pacientes com esses neoplasmas dependem grandemente da extensão da invasão dentro e fora da lesão primária.

O carcinoma anaplásico ou indiferenciado constitui uma forma altamente maligna de câncer de tiróide que cresce com padrão histológico totalmente indiferenciado, com células gigantes ou fusiformes. Usualmente, esses tumores ocorrem na sétima e oitava décadas da vida e estão entre os neoplasmas mais agressivos do homem (Wartofsky & Ingbar, 1991).

Um outro tipo de carcinoma às vezes descrito é o insular, que constitui uma forma intermediária entre aqueles bem diferenciados e os indiferenciados ou anaplásicos (Hassoun *et al.*, 1997).



Os carcinomas das células C são denominados medulares e representam uma forma rara de câncer tiroideano, podendo ocorrer sob a forma esporádica ou familiar (Bergholm *et al.*, 1997). Caracterizam-se por camadas de células tumorais separadas por estroma hialino contendo amilóide. Também podem produzir prostaglandinas e antígeno carcinoembrionário (Larsen, 1993). Entre as formas familiares, alguns constituem manifestação de síndromes geneticamente determinadas como, por exemplo, a Síndrome de Sipple ou neoplasia endócrina múltipla (MEN), também referida como MEN 2A e 2B para indicar a ausência ou a presença de neuromata de mucosa, respectivamente. Essa síndrome apresenta padrão de herança autossômico dominante com penetrância completa e o gene encontra-se mapeado no braço longo do cromossomo 10.

I. 3. Alterações cariotípicas das lesões tireoideanas

As análises citogenéticas clássicas de hiperplasias e neoplasias tiroideanas benignas têm frequentemente revelado constituição diplóide (Bartnizke *et al.*, 1989; Olah *et al.*, 1990). No entanto, alguns trabalhos referem diferentes tipos de aberrações cromossômicas estruturais nesse grupo envolvendo, com certa frequência, as bandas 2p12; 2q12-13; 3p24-25; 5q13-15; 7p21-22 e principalmente a banda 19q13; (Bartnizke *et al.*, 1989; Bondenson *et al.*, 1989; Teyssier *et al.*, 1990; Dal Cin *et al.*, 1992; Sozzi *et al.*, 1992; Antonini *et al.*, 1993; Roque *et al.*, 1993a; Belge *et al.*, 1994, 95, 98b). Entre as numéricas, são citados muitos casos de trissomia 7 e 12 e alguns de trissomia ou monossomia 22, de hiperdiploidia e de perda de um cromossomo sexual (Teyssier *et al.*, 1990; Gama



et al., 1991; Antonini *et al.*, 1993; Roque *et al.*, 1993b; Criado *et al.*, 1995; Belge *et al.*, 1994; 98a). Segundo Roque *et al.* (1993a), os achados cariotípicos sugerem a existência de três subgrupos citogeneticamente distintos, o primeiro deles caracterizado por cariótipo normal, o segundo por cariótipo hiperdiplóide com números cromossômicos modais variando de 50 a 70, e o terceiro subgrupo formado por adenomas com cariótipo pseudodiplóide ou próximo ao diplóide.

É importante observar que, embora diferentes histopatologicamente, tanto as hiperplasias como os adenomas apresentam, frequentemente, trissomia 7 como única alteração ou em combinação com ganhos de outros cromossomos (Teyssier *et al.*, 1990; Gama *et al.*, 1991; Belge *et al.*, 1998a) e rearranjos estruturais do cromossomo 19 (Dal Cin *et al.*, 1992; Belge *et al.*, 1998b, entre outros), o que sugere uma relação biológica caracterizada pelo desenvolvimento contínuo de bócios para adenomas.

Em relação aos carcinomas de tiróide, vários autores têm observado alterações estruturais distintas entre as formas diferenciadas. Nos papilares, as regiões mais frequentemente observadas envolvem as bandas 2p22-23, 7q34-36 e 10q21 e, nos foliculares, as regiões 7p15, 11q13 e 14p11 (Antonini *et al.*, 1989; Jenkins *et al.*, 1990; Teyssier *et al.*, 1990; Hermann *et al.*, 1991; Antonini *et al.*, 1992; Pierotti *et al.*, 1992; Sozzi *et al.*, 1994; Lehmann *et al.*, 1997; Roque *et al.*, 1998). As análises moleculares também mostram rearranjos em diferentes regiões como, por exemplo, perda de heterozigosidade em 4q, 5p, 7p, 10q e 11p nos carcinomas papilares e em 3p, 3q, 10p, 11p, 13q e 22q nos foliculares (Tung *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998).



A maior frequência de rearranjos do braço longo do cromossomo 10 sugere que tal região deve conter genes relacionados com a tumorigênese das neoplasias tiroideanas. Realmente, já foi demonstrado que as quebras em 10q11.2 são responsáveis pelo truncamento do protooncogene *RET* e que, em alguns casos, o seu domínio da quinase da tirosina é justaposto à região 5' de um outro gene, o *H4*, em 10q21, próximo ao loco *MEN 2*, como será descrito mais adiante (Pierotti *et al.*, 1992).

Outras alterações, como as trissomias 7 e 12 e as monossomias 18 e 20, também foram descritas (Hermann *et al.*, 1991;92; Roque *et al.*, 1998) e, de modo geral, sugerem que tanto a perda de genes supressores de tumor quanto a ativação de oncogenes podem representar eventos importantes no desenvolvimento ou progressão do câncer tiroideano (Roque *et al.*, 1993c).

I.4. Alterações moleculares das lesões de tiróide

Na tiróide, a célula folicular, que produz hormônio e concentra iodo, constitui o principal alvo durante o processo de tumorigênese. Sua transformação, que envolve estágios múltiplos e bem caracterizados morfológicamente, é consequência de dois mecanismos básicos: o estímulo não genotóxico para a proliferação e o acúmulo de mutações em genes relacionados com o controle do crescimento (Williams, 1995). O primeiro deles efetua-se geralmente via hormônio tireotrófico da hipófise e, em função da elevação da taxa de divisão celular, aumenta a probabilidade de ocorrência de mutações genéticas. O segundo é decorrente da sensibilidade da glândula a fatores genotóxicos ambientais, tais

como a radiação, especialmente após dano vascular (Mizuno *et al.*, 1997; Nikiforov *et al.*, 1997; Nagataki *et al.*, 1998).

O estímulo para crescimento, atuando isoladamente, leva ao desenvolvimento apenas de tumores benignos. Sua combinação com eventos mutagênicos, entretanto, em especial em oncogenes e genes supressores específicos, pode resultar na aquisição de fenótipos malignos que incluem proliferação excessiva, comportamento invasivo e metástase. A identificação dos genes alterados, da natureza das mutações e de seus efeitos sobre a estrutura e função da célula pode levar a um modelo de carcinogênese na tiróide semelhante àquele desenvolvido por Cho & Vogelstein (1992) para a sequência adenoma-carcinoma colorretal.

A tiróide oferece uma oportunidade única para desenvolvimento de um modelo desse tipo. Apresenta um grande número de lesões, seu epitélio é homogêneo na organização, no comportamento e na diferenciação e oferece rotas alternativas de progressão neoplásica que levam a patologias clinicamente distintas: o carcinoma papilar, o folicular e o medular (Wynford-Thomas, 1993; Pierotti *et al.*, 1996).

A proliferação das células foliculares da tiróide é regulada, primariamente, por sinais externos estimuladores, como o TSH, o IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) e outros fatores de crescimento e por sinais inibidores, como o TGF β (*transforming growth factor β*). Além disso, a presença ou ausência de substâncias que, secundariamente, interferem com a síntese ou com o metabolismo do hormônio tiroideano, como o iodo, podem também estar envolvidas. A mensagem

iniciada por esses sinais converge para um mecanismo central regulador do ciclo celular, do qual participam muitos componentes responsáveis pela passagem das células de um estágio a outro do ciclo, como as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas (cdks), a proteína pRB, os inibidores de complexos cdk/ciclinas, as proteínas relacionadas com a manutenção da integridade do genoma e muitos fatores de transcrição (Wynford-Thomas, 1997).

Na tiróide normal, os sinais extracelulares estimuladores e inibidores atuam de forma equilibrada regulando a taxa de divisão celular (Figura 1). Nas neoplasias, ocorre um distúrbio irreversível desse equilíbrio através de mutações em um grupo de moléculas, que inclui os receptores de membrana para fatores de crescimento, as proteínas citoplasmáticas transdutoras de sinais e os fatores nucleares (Romano *et al.*, 1993; Challeton *et al.*, 1995; Oyama *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 1995; Komminoth, 1997; Wynford-Thomas & Blaydes, 1998).

Os principais receptores de fatores de crescimento envolvidos no câncer de tiróide não são aqueles previstos pela fisiologia normal da glândula, isto é, o receptor do TSH, do fator de crescimento epidérmico (EGF) e do IGF-1. Ao contrário, os genes preferencialmente atingidos são o *NTRK1* e o *RET* (Wynford-Thomas, 1993, para referências).

O gene *NTRK1* ou *TRKA* foi mapeado na banda cromossômica 1q22 (Valent *et al.*, 1997) e codifica um receptor para fatores neurotróficos (NGF), que são importantes na sobrevivência e na manutenção de células nervosas (Klein *et al.*, 1991). O gene contém 17 exons responsáveis pela codificação de uma proteína transmembrânica de 140 Kd, que possui um domínio citoplasmático de

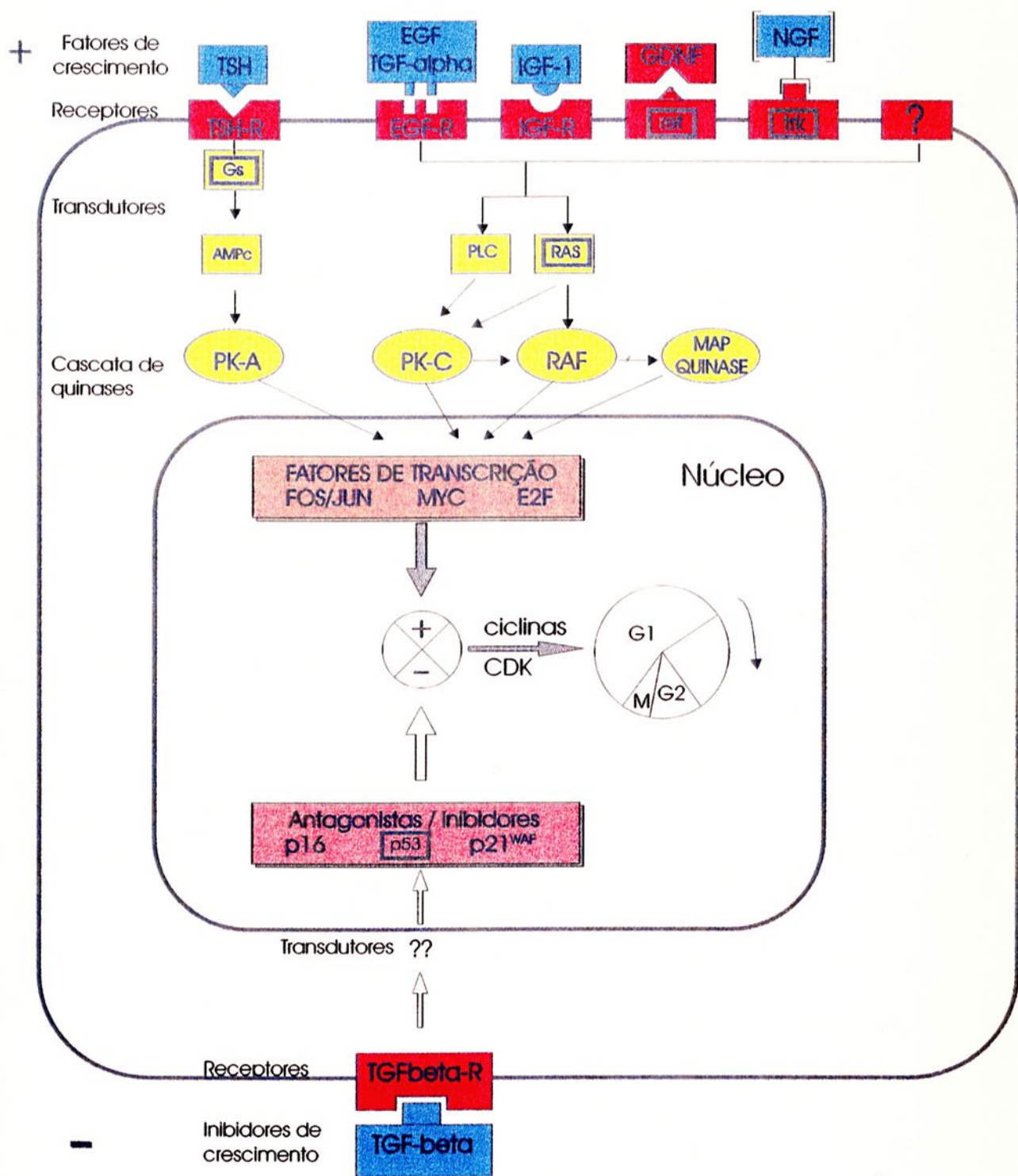


Figura 1. Modelo representativo da interação de sinais estimuladores e inibidores envolvidos na expressão de genes que atuam no ciclo celular das células foliculares da tireóide. (segundo Wynford - Thomas, 1993)

tirosina quinase e uma região extracelular com um motivo rico em leucina flanqueado por resíduos de cisteína (Greco *et al.*, 1996). Recentemente, mutações constitucionais em ponto nesse gene foram descritas em uma doença autossômica recessiva que se caracteriza por insensibilidade congênita à dor com anidrose (Indo *et al.*, 1996).

O gene *RET* (*rearranged during transfection*) está localizado na banda cromossômica 10q11.2 (Ishizaka *et al.*, 1989) e apresenta uma sequência formada por 21 exons com 4726 nucleotídeos (Takahashi *et al.*, 1988; Myers *et al.*, 1995). Codifica três isoformas de uma proteína de membrana semelhante ao receptor do fator de crescimento epidérmico, que diferem entre si por terem 51, 43 ou 9 aminoácidos na sua extremidade carboxila, em virtude de processamento alternativo do RNA mensageiro (RET51, RET43 ou RET9). As isoenzimas são caracterizadas por três diferentes domínios: o extracelular, com uma região rica em cisteína e um sítio com homologia a caderinas, o transmembrânico e o citoplasmático, com atividade quinase (Tahira *et al.*, 1990; Takahashi *et al.*, 1993; Myers *et al.*, 1995; Ponder & Smith, 1996). A presença do sítio com homologia a caderinas sugere a possibilidade de sua interação com Ca^{++} e de sua relação com adesão celular (Takahashi *et al.*, 1993).

O ligante da proteína ret é o fator neurotrófico derivado de linhagem celular de glia (GDNF), um membro distante do fator $\text{TGF}\beta$ (Durbec *et al.*, 1996). A resposta fisiológica a esse fator requer a presença de uma outra proteína, a $\text{DNFR}\alpha$, que forma um complexo com GDNF e com ret induzindo a dimerização e a autofosforilação dessa última, com consequente fosforilação de tirosinas no

substrato citoplasmático correspondente (Jing *et al.*, 1996). Várias proteínas são fosforiladas, ativadas ou associadas com a ret, entre elas a p21^{ras}, a PLC γ , a Shc e a Grb2 (Ponder & Smith, 1996). Tanto o gene *GDNF* como o *RET* têm sido associados ao desenvolvimento da doença de Hirschsprung, uma malformação congênita causada pela ausência de neurônios no intestino, que afeta 1 em 5000 recém-nascidos (Robertson *et al.*, 1997). A presença de uma mutação constitucional que leva à perda de função do *RET* sugere que esse gene, além de um papel na tumorigênese, está envolvido no desenvolvimento do sistema nervoso entérico.

Os genes *RET* e *NTRK1* codificam receptores com expressão elevada em células derivadas da crista neural que, na tiróide, são representadas pelas células C. Essas células são localizadas adjacentes às foliculares e ajudam a regular os níveis de cálcio sérico através da síntese e secreção de calcitonina. As mutações em ponto no gene *RET* são consistentes nas formas hereditárias e esporádicas dos tumores medulares (Fink *et al.*, 1996; Learoyd *et al.*, 1997; Hofstra *et al.*, 1997), que são provenientes das células C, enquanto alterações cromossômicas resultando em rearranjos do domínio quinase dos dois genes parecem ser um dos principais mecanismos de malignização da célula folicular, especialmente no carcinoma papilar (Pierotti *et al.*, 1996).

Nesse último tipo de carcinoma, a ativação do gene *RET* ocorre por inversões ou translocações que originam diferentes oncogenes quiméricos, inicialmente designados por *PTC* (*papillary thyroid carcinoma*) ou, mais precisamente, por *RET/PTC1*, 2 e 3. No *RET/PTC1*, o domínio quinase e o

terminal 3' do *RET* são fundidos, após inversão, com a sequência 5' de um outro gene, o *H4/D10S170*, localizado na banda 10q21. O ponto de quebra no *RET* ocorre em uma sequência intrônica localizada entre os exons 11 e 12 e, no *H4/D10S170*, a quebra pode ocorrer em várias posições diferentes ao longo de um intron com aproximadamente 30 Kb (Grieco *et al.*, 1990; Bongarzone *et al.*, 1994). No *RET/PTC2* e 3, os rearranjos envolvem, respectivamente, um gene mapeado em 17q23 e responsável pela subunidade reguladora $Rl\alpha$ da proteína quinase A ($Rl\alpha$ PKA) receptora do AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) do tipo I (Bongarzone *et al.*, 1993) e um gene ainda não conhecido chamado de *RFG* (*RET-fused gene*) ou *ELE1*, localizado em 10q11.2 (Bongarzone *et al.*, 1994). Fugazzola *et al.* (1996) descreveram o rearranjo *RET/PTC4*, que também envolve o gene *ELE1* mas com ponto de quebra diferente daquele observado no *PTC3*.

A frequência dos rearranjos *RET/PTC* varia significativamente em regiões geográficas distintas, o que pode ser explicado por diferentes fatores ambientais e genéticos atuando nas populações estudadas (Wajjwalku *et al.*, 1992; Zou *et al.*, 1994). A ativação do protooncogene *RET/PTC4*, por exemplo, tem sido observada com frequências elevadas na população que foi exposta à radioatividade durante o acidente de Chernobyl (Bounacer *et al.*, 1997; Nikiforov *et al.*, 1997; Nagataki, *et al.*, 1998; Pisarchik *et al.*, 1998).

A relevância clínica dos rearranjos citados em carcinomas papilares não está bem esclarecida. Alguns autores têm sugerido sua ligação com comportamento agressivo da lesão, enquanto outros, mostram dados contrários a

essa hipótese ou, então, associação com manifestação precoce e envolvimento linfático (Komminoth, 1997). Wirtschafter *et al.* (1997), por exemplo, demonstraram níveis elevados do RNAm dos genes *RET/PTC1* e *RET/PTC3* em pacientes portadores de tiroidite de Hashimoto.

No caso do gene *NTRK1*, sua ativação é realizada por mecanismos semelhantes aos observados para o gene *RET* como, por exemplo, a inversão que gera o oncogene *TRK* (*tropomyosin receptor kinase*), resultante da ligação do domínio quinase com as sequências de um gene da tropomiosina, o *TPM3*, localizadas na banda 1q31 (Bongarzone *et al.*, 1989). Em alguns casos, esse domínio quinase é translocado para sequências do gene *TPR* (*translocated promoter region*) mapeadas em 1q25, que foram originalmente identificadas como parte do oncogene *MET* e, nos últimos anos, como o gene codificador de um componente do complexo do poro nuclear. Tal rearranjo é conhecido como *TRK-T1* e outros rearranjos envolvendo os mesmos dois genes, *TPR* e *NTRK1*, têm sido observados em carcinomas papilares e designados, respectivamente, *TRK-T2* e *TRK-T4* (Greco *et al.*, 1992; 97; 98). Embora, nesses dois últimos, os pontos de quebras sejam diferentes, eles ocorrem dentro do mesmo intron, tanto do *TPR* como do *NTRK1*. Em consequência, ambos transcrevem o mesmo RNAm que é traduzido em uma oncoproteína de 1323 aminoácidos. A caracterização molecular desses últimos rearranjos evidenciou que, da mesma forma que o *TRK-T1*, uma inversão do braço longo do cromossomo 1 é o mecanismo de ativação oncogênica. Os estudos realizados por Greco *et al.* (1997) demonstraram que os oncogenes *TRK-T2* e *TRK-T1* são estruturalmente muito diferentes. A porção

TPR no *TRK-T2* apresenta 3073 nucleotídeos, enquanto no *TRK-T1* são observados apenas 598 nucleotídeos.

Além desses, um quarto tipo de ativação foi descrito, o *TRK-T3*, que apresenta o domínio quinase do *NTRK1* precedido por sequências do gene *TFG* (*TRK fused gene*) mapeado no cromossomo 3 (Greco *et al.*, 1995; 98).

A análise comparativa dos oncogenes acima descritos em carcinomas papilares permite algumas conclusões. Na maioria dos casos, o rearranjo ativador é uma inversão e parecem existir regiões mais frequentemente envolvidas nas quebras. Após a fusão do domínio quinase desses genes, *RET* e *NTRK1*, com a extremidade 5' terminal de um outro, sua expressão, que é normalmente restrita a células neurais, passa a ocorrer nas células epiteliais mutantes da tireóide. Como consequência, ocorre autofosforilação constitutiva dos domínios citoplasmáticos do receptor, que induz sinais mitogênicos contínuos (Pierotti, *et al.*, 1996). Os carcinomas papilares com oncogenes *RET* e *NTRK1* rearranjados são indistinguíveis, tanto do ponto de vista morfológico como clínico. Os padrões de sinalização citoplasmáticos iniciados pelos seus dois produtos devem, então, ser superpostos em muitos passos, como mostram os estudos sobre a ligação desses receptores com o domínio SH2 das proteínas Shc e Grb2, que leva, possivelmente, à ativação de moléculas ras próximas à membrana celular (Borrello *et al.*, 1994).

Ao contrário dos rearranjos citados, as mutações pontuais têm sido verificadas somente no gene *RET* e apenas em carcinomas medulares de tireóide, tanto esporádicos como familiares isolados ou como parte da síndrome de neoplasia endócrina múltipla-MEN 2 (Fink *et al.*, 1996; Marsh *et al.*, 1996). As

síndromes MEN incluem as formas MEN1, 2A e 2B. A primeira é caracterizada por tumores da pituitária e pancreáticos, hiperplasia da paratireóide e, ocasionalmente, por adenomas tiroideanos e da adrenal. A forma MEN2A manifesta predisposição ao câncer medular da tiróide (MTC), feocromocitoma, e hiperplasia da paratireóide, enquanto a MEN2B exibe MTC e feocromocitoma, além de fácies típica, neuromas de mucosa, megacólon e neuromegalia. Os pacientes com a forma familiar isolada (FMTC) desenvolvem apenas carcinoma medular, o que ocorre em fases tardias da vida, ao contrário dos afetados por MEN, cujo MTC tem início na infância ou na adolescência. Todas essas condições apresentam padrão de herança autossômico dominante com expressividade variável e penetrância completa. Nos casos esporádicos, os tumores são geralmente unilaterais enquanto, nos familiares (MEN 2A, 2B e FMTC), os tumores são multifocais e bilaterais, indicando nesses últimos a presença de mutações constitucionais (Moley, 1997).

A variedade de fenótipos observados nos carcinomas medulares tem sido associada ao tipo de alteração envolvida. Por exemplo, no subtipo B da síndrome MEN2, a alteração atinge, em 94% dos pacientes, o códon 918 do domínio quinase do gene *RET* e modifica a especificidade do receptor, enquanto no subtipo MEN 2A e no FMTC atinge qualquer um dos seis códons para cisteína nos exons 10 (códons 609, 611, 618 e 620) e 11 (630 e 634) do domínio extracelular, causam dimerização aberrante da molécula e ativação permanente (Borrello *et al.*, 1995; Komminoth, 1997).

Alterações somáticas no códon 918, idênticas às observadas nos casos MEN 2B familiar, também têm sido detectadas nas formas esporádicas do

carcinoma medular (Eng *et al.*, 1994; Hosftra *et al.*, 1994; Blaugrund *et al.*, 1994; Eng *et al.*, 1995, Marsh *et al.*, 1996; Bugalho *et al.*, 1997).

É provável que as mutações em ponto no *RET* não sejam suficientes para a tumorigênese. Como a maioria dos pacientes com MEN2 assintomáticos manifestam hiperplasia da célula C, a ativação herdada do gene deve levar apenas à proliferação celular na tiróide, sendo necessários eventos adicionais para o desenvolvimento do câncer (Kolibaba & Druker, 1997). Os padrões de sinalização citoplasmática desencadeados pelas várias proteínas ret mutantes não devem ser os mesmos e resultar em valores prognósticos diferentes (Marshall *et al.*, 1997; Pasini *et al.*, 1997). Realmente, em pacientes com MEN2A, alteração em codons distintos parece indicar riscos diversos de desenvolvimento de feocromocitomas e hiperparatiroidismo ou, então, de associação com o fenótipo Hirschsprung (Mulligan *et al.*, 1994, Pasini *et al.*, 1997). De maneira geral, as mutações no códon 918, que são associadas algumas vezes com fenótipos agressivos, podem ter um efeito importante após o desenvolvimento embrionário e fetal, dado que são vistas tanto nos casos esporádicos como em MEN2B. A presença apenas em casos familiares daquelas que afetam regiões da molécula ricas em cisteína deve ser crítica para a tumorigênese durante o desenvolvimento mas não em tecidos adultos (Eng *et al.*, 1994; Fink *et al.*, 1996; Komminoth, 1997).

Além dessas considerações, deve ser salientado que a investigação de mutações no gene *RET* pode ser valiosa em indivíduos assintomáticos de famílias com câncer medular de tiróide. Uma conduta cirúrgica profilática, que tem morbidade baixa, é uma proposição importante durante o acompanhamento e o aconselhamento genético dos afetados (Wells & Skinner, 1998).

Além do *RET* e do *TRK*, as lesões da tiróide podem apresentar mutações em outros genes que codificam proteínas de membrana. Seria esperado que ativações constitutivas do receptor do hormônio tireotrófico (TSHR) agissem como oncogênicas, dado que esse receptor representa o mecanismo principal pelo qual o TSH regula proliferação e diferenciação do tecido tiroideano (Uyttersprot *et al.*, 1997). Entretanto, mutações em ponto no gene do TSHR têm sido descritas em adenomas hiperfuncionantes, que não são precursores do câncer de tiróide, e em alguns poucos carcinomas diferenciados que exibem uma resposta deficiente ao hormônio (Russo *et al.*, 1995; Spambalg *et al.*, 1996; Russo *et al.*, 1997). Esses achados indicam que sua ativação ou de proteínas associadas podem participar da indução de processos proliferativos benignos ou conferir vantagem seletiva em clones com alterações genéticas adicionais.

Como citado anteriormente, o TSH atua sobre a tiróide através do AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) e de uma série de reações que ele desencadeia, resultando na síntese de proteínas características do estado diferenciado, entre elas a tireoglobulina. Na verdade, as células da tiróide respondem a dois diferentes mecanismos: as cascatas iniciadas pela ligação do TSH-TSHR-AMPc e as cascatas induzidas por fatores de crescimento. Ambos envolvem passos sucessivos de sinais intracelulares, fosforilação de substratos, transcrição gênica e síntese protéica, com superposição de algumas etapas (Figura 1). As principais diferenças entre eles resumem-se no efeito final, ou seja, em diferenciação e proliferação no caso do primeiro e em proliferação com perda de diferenciação no segundo (Uyttersprot *et al.*, 1997).

Na cascata induzida pelo TSH, o seu receptor ativa as proteínas G e, em sequência, o AMPc, as quinases dependentes do AMPc e outras proteínas alvo não conhecidas mas diferentes daquelas envolvidas nos eventos iniciados pelos fatores de crescimento. O sinal converge para a indução de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas e qualquer alteração em uma das etapas terá as mesmas consequências, ou seja, proliferação e diferenciação (Uyttersprot *et al.*, 1997). Por exemplo, mutações em ponto que suprimem a atividade das proteínas G resultando em estimulação contínua (Bourne *et al.*, 1991) levam a tumores tiroideanos hiperfuncionantes, os chamados adenomas tóxicos, e também aos carcinomas papilares com produção aumentada de hormônio tiroideano (Wynford-Thomas, 1993).

Os sinais desencadeados pelos fatores de crescimento iniciam-se com a dimerização de seus receptores seguida também da ativação de proteínas G e RAS ou hidrólise de substratos pela fosfolipase C (PLC), ativação de quinases MAP (*mitogen-activated protein*), fosforilação de fatores de transcrição, indução de protooncogenes *c-jun*, *c-fos*, *c-myc* e outros, fosforilação de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (cdks) e da proteína pRb e, finalmente, liberação de fatores de transcrição E2F (Rozengurd *et al.*, 1995). A ativação constitutiva de qualquer dos fatores estimuladores dessa cascata leva a um aumento na proliferação celular. Do mesmo modo, a inativação de fatores inibidores, como os genes supressores de tumor *Rb* e *TP53*, produz o mesmo resultado (Lewin, 1996).

As mutações nos genes *RAS* são encontradas em cerca de 50% de tumores foliculares benignos e malignos desde suas fases mais precoces, mas em frequência baixa nos carcinomas papilares, o que indica sua participação como



iniciador da oncogênese em alguns grupos de lesões tiroideanas (Wynford-Thomas, 1993; Du Villard *et al.*, 1995; Rochefort *et al.*, 1996).

As mutações no gene *TP53*, por outro lado, são extremamente raras em ambas as formas de câncer diferenciado, o papilar e o folicular, mas são comuns nos tipos anaplásicos e pobremente diferenciados, o que sugere serem elas eventos finais da tumorigênese, com participação na progressão e na agressividade das lesões (Ito *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1992; Donghi *et al.*, 1993; Fagin *et al.*, 1993; Nikiforov *et al.*, 1996; Pollina *et al.*, 1996; Grebe *et al.*, 1997). A favor dessa hipótese, estão os resultados obtidos por Moretti *et al.* (1997) em uma linhagem celular de carcinoma anaplásico positiva para a *p53* mutada que, após a transfecção do gene selvagem, demonstrou supressão da agressividade e do fenótipo indiferenciado.

Em relação aos tumores medulares, que também representam formas diferenciadas do câncer tiroideano, os poucos dados sobre o papel do gene *TP53* na sua iniciação e evolução são contraditórios, alguns destacando a importância da sua participação, enquanto outros sugerindo um pequeno ou nenhum envolvimento no desenvolvimento desses tumores (Herfarth *et al.*, 1997, para referências).

De maneira geral, é pouco provável que o gene *TP53* seja o único supressor que participe do processo neoplásico na tiróide (Ho *et al.*, 1996). Existem alguns dados, nem sempre confirmados, mostrando que outras proteínas inibidoras estão envolvidas, como por exemplo a *p21^{WAF1}* e a *p16* (Jones *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1996; Yane *et al.*, 1996). Ambas são responsáveis pelo bloqueio do ciclo celular em G1 através da inibição dos complexos ciclina/quinase

dependente de ciclina (Serrano *et al.*, 1993; Sherr, 1994; Graña & Reddy, 1995) e mutações nos seus genes ou alterações da sua expressão certamente podem ter efeitos importantes no controle da proliferação celular.



II. OBJETIVOS

Considerando a importância dos dados citogenéticos e moleculares no rastreamento de genes envolvidos na iniciação e progressão do processo neoplásico e, também, a necessidade de informação prognóstica, foi proposto o presente trabalho que teve os seguintes objetivos:

1. Estabelecer a técnica de isolamento de núcleos de tecidos emblocados em parafina para hibridação *in situ* fluorescente (FISH) no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto-SP.
2. Pesquisar a ocorrência de anomalias numéricas dos cromossomos 7, 10 e 17 em núcleos interfásicos de tecidos tiroideanos normais e neoplásicos frescos ou arquivados através da técnica de FISH.
3. Comparar, quando possível, os resultados citogenéticos obtidos com os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes.
4. Fornecer subsídios para diagnóstico e prognóstico nos casos em que isso for possível.

III. MATERIAL PARA PUBLICAÇÃO

III. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

A rapid technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by fluorescent *in situ* hybridization with alpha-satellite probes

Nilce Barril, Andrea Borduchi Carvalho-Sales and Eloiza Helena Tajara

IBILCE, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Departamento de Biologia, UNESP, Caixa Postal 136, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil. Send correspondence to E. H. T.

ABSTRACT

We describe a rapid procedure for preparing archival tissues for interphase FISH analysis. The present protocol differs from others previously described because it allows the obtention of nuclei in satisfactory number and quality without using special equipments, adhesive-treated slides or solutions for chromatin decondensation. The method is low cost and useful for retrospective analyses of formalin-fixed, paraffin embedded samples.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is a reliable technique for detecting chromosomal aberrations and has found increasing applications in pathology diagnosis and cancer research. Contrary to conventional cytogenetic techniques, FISH can be used to elucidate karyotypic abnormalities in interphase nuclei, avoiding the need to culture the cells. Interphase cytogenetics is especially important for retrospective analysis of rare tumors, tissues with low mitotic index or comparison of samples from patients in different stages of a disease.

We describe here a modified technique previously described by Harris *et al.* (1995) and Hyytinen *et al.* (1994) for interphase FISH analysis of tissues that have been fixed in formalin and embedded in paraffin, as follows (*The commentaries of other authors are included in parentheses and in italics*).

Isolation of nuclei from tissue sections. Three 30-50 μm tissue sections were deparaffinized with 5 mL of xylene, twice for 10 min each, and washed in 5 mL of 100% ethanol, twice 10 min each, and 5 mL of deionized water (*phosphate buffered saline*), twice 10 min each. Samples were transferred to a Petri dish and, after drying, were minced with scalpel and resuspended in pepsin - Sigma No. P6887 - 5 mg/mL in 0.2M NaCl pH 1.5 (*pepsin - 0.7mg/mL in 3% polyethylene glycol pH 1.5*). The mixture was transferred to a tube, vortexed vigorously and incubated for one hour at 37°C. The digested material was rinsed three times using 5 mL of 60% acetic acid (*rinsed repeatedly through a 45 micro filter with Hank's basic salt solution -HBSS- until the pH in the solution had returned to approximately pH 7*) and centrifuged for 10 min at 1,200 RPM. After the final rinse, the pelleted nuclei were resuspended in 5 mL of 60% acetic acid (HBSS) and dropped onto cold, wet slides (*adhesive-treated slides*) which were stored at room temperature for 48 hours (*the slides were fixed in 3:1 methanol/acetic acid for 10 min, incubated in protease K 1mg/mL in HBSS for 30 min and soak in fresh fix*).

Denaturation and hybridization. Immediately before use in FISH, (*the slides were incubated in a water bath for three min at 90°C in a 50% glycerol/0.1XSSC pH 7.5 solution*) cellular DNA was denatured in 70% formamide/2XSSC solution pH 7.0 (1XSSC is 0.15M NaCl, 0.015M Na Citrate) for four min at 74°C. The slides were dehydrated for two min each in 70%, 85% and

100% ethanol, followed by treatment with proteinase K - Sigma P-6911-8 μ g/mL in 20 mM Tris/2mM CaCl₂ buffer pH 7.5 - for three min at 37°C and ethanol dehydration.

The hybridization and the detection procedures were performed with probes from ONCOR and avidin/FITC system from VECTOR and followed the manufacture's instructions with modifications. Three μ l of the probe to be used and 60 μ l of Hybrisol VI buffer - ONCOR No. S1340-3 - were mixed in a 0.5 mL microcentrifuge tube and spun briefly to consolidate the mixture. The hybridization mixture was denatured for five min at 74°C, cooled on ice, and applied to denatured cells on slides. A coverslip was added and sealed with rubber cement. An overnight hybridization was carried out in a humid chamber at 37°C. The coverslips were removed and the slides were subsequently washed in 0.5XSSC for four min at 74°C, followed by immunostaining with 60 μ l of avidin-FITC for 30 min at 37°C. The slides were washed three times for two min each in buffer II (0.1M Tris-HCl; 0.15M NaCl and 0.05% v/v Tween 20, pH 7.0) at 37°C and FITC signal was amplified using 60 μ l of biotinylated anti-avidin antibody, followed by another layer of 60 μ l of avidin-FITC. After three buffer II washes (two min each), the nuclei were counterstained by adding propidium iodade (1 μ g/mL) in an antifade solution - SIGMA NO. 6001. Figure 1 illustrates nuclei obtained through this procedure.

This method was developed in order to reduce the costs and the work time and proved to be valuable for interphase cytogenetic analyses of archival rare tumors and tissues with low mitotic index.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. James Robert Coleman for reviewing the text and Fapesp and CNPq for financial support.



RESUMO

Descrevemos aqui um procedimento rápido para obtenção de núcleos interfásicos a partir de amostras arquivadas que podem ser utilizados para análise citogenética através da técnica de FISH. Este procedimento difere de outros previamente descritos porque permite a obtenção de núcleos em número e qualidade satisfatórios sem a utilização de equipamentos ou lâminas especiais e soluções para descondensação da cromatina. O método é de baixo custo e possibilita estudos retrospectivos de tecidos fixados em formol e emblocados em parafina.

REFERENCES

- Harris C., Robinson,T., Michalski,K. and Meisner,L.(1995). Specimen salvage with FISH. *Applied Cytogenetics* 21:66-70.
- Hyytinen,E., Visakorpli T., Kallioniemi,A., Kallioniemi,O-P and Isola, J.J.(1994). Improved technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence *in situ* hybridization. *Cytometry* 16:93-99.

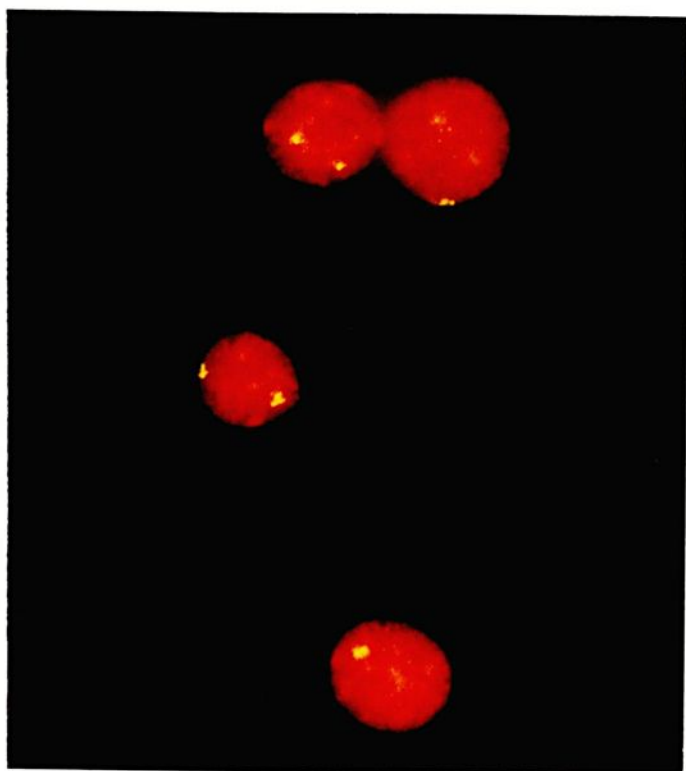


LEGENDS:

Figure 1 - Photomicrograph of nuclei prepared from a formalin-fixed, paraffin-embedded sample of a thyroid cancer specimen. FISH was done with a chromosome 7 centromeric probe. Nuclei were counterstained with propidium iodide.



FIGURE 1



Interphase cytogenetic analysis of normal tissue of thyroid gland by fluorescence *in situ* hybridization

Nilce Barril, Andrea Borduchi Carvalho-Sales and Eloiza Helena Tajara

From Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto-SP, Brazil.

ADDRESS REPRINT REQUESTS TO: Eloiza H. Tajara, Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, Caixa Postal 136. 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

tajara@bio.ibilce.unesp.br



Trisomy 7 as the sole clonal chromosomal aberration is a relatively common finding in short-term cultures of different epithelial neoplasms including malignant tumors of thyroid, ovary, lung, kidney, prostate, bladder and pheocromocitomas (for review, see 1) and also benign lesions such as thyroid hyperplasias and adenomas (2,3), colonic polyps (4), rheumatoid arthritis (5), steatosis of the liver (6), chronic pyelonephritis (7,8) and atherosclerotic plaques (9). It has also been demonstrated in macroscopically normal cells from lung (10), brain (11) and kidney tissues (8), although other authors have not found trisomy 7 in normal or gliotic brain tissue by interphase cytogenetics (12-15).

The significance of trisomy 7 is not well understood and needs investigation because important genes are mapped on this chromosome such as the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene, calcitonin receptor (*CALCR*) gene, platelet derived growth factor chain A (*PDGF A*) gene and the cellular protooncogenes *ras* and *MET* (16). Considering this question, we present here our data on quantification of numerical aberrations using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in non cultured cells of normal thyroid. In addition to biotinylated alpha-satellite probes for chromosome 7, probes for chromosomes 10 and 17 were also chosen because of the previous reports of aneusomy of these chromosomes in benign and malignant thyroid neoplasms (3,17). Samples from 10 patients were obtained at autopsy of eight males and two females, aged from 10 days to 82 years, who died of non-thyroid related disease. We also used nuclei from normal skin as control. Evaluation of results was done by counting at least 250 nuclei per slide, as described by Brock *et al.* (1996) (18). Whenever the hybridization

efficiency was less than 80%, the experiment was repeated until that level was obtained. However, most of cases had hybridization efficiency around 90%. By definition, monosomy and trisomy were diagnosed only when the percentage of cells with one or three spots, respectively, was greater than the mean+4XSD of the controls (19). Accordingly, in our study, monosomy was diagnosed whenever the percentage of nuclei with one spot was greater than 36.5%, 34.6% and 32.5%, and trisomy if more than 3.7%, 3.2% and 4% of nuclei exhibited three spots for chromosomes 7, 10 and 17, respectively (Table 1). Tetrasomy was absent in the control samples; thus 5% was arbitrarily taken as the cutoff value. In normal skin cells, the range of loss was 10-24%, 21-27%, 15-24% for chromosomes 7, 10 and 17, respectively (Table 2) and the range of gain was 0-2% for three chromosomes. Overall, in normal thyroid cells, the range of loss was 10-21%, 21-30%, 20-30% and the range of gain was 0-3%, 0-2%, 0-2% for chromosomes 7, 10 and 17, respectively (Table 3). Therefore, according to the criteria above, we could not detect numerical aberration for chromosomes 7, 10 and 17 in normal thyroid gland.

Trisomy 7 has been suggested to be a primary abnormality in a wide variety of tumors types but cytogenetic data of solid tumors, nonneoplastic lesions and macroscopically normal tissue now question the attribution of such aberration as an indicator of a neoplastic process. Most solid tumors in which clonal trisomy 7 has been detected as the only change have also exhibited other, cytogenetically unrelated clones which apparently evolved from cells without trisomy 7. Such mosaicism could indicate that the neoplasm is polyclonal or that the clone with +7 does not represent the tumor parenchyma (1). Multiple clones could also reflect

genetic instability caused by a mutation involved in the development of the tumor and trisomy 7 may be a neutral abnormality. Another interpretation of this aberration is a cell culture artefact giving to trisomic cells a selective advantage during *in vitro* culture (20). However, cells with trisomy 7 have been observed in noncultured normal and neoplastic samples using fluorescence *in situ* hybridization and, therefore, should be present *in vivo* (17,21,22) and may belong to a particular cell type. In fact, some studies combining *in situ* hybridization technique and immunocytochemistry found that clones with +7 represent an specific lineage (7,8,23,24).

Huebner *et al.* (1989) (25) proposed that on the way to terminal differentiation, cells within a particular lineage must present specific genome rearrangements in order to switch off or on genes for that differentiation program. Trisomy 7 could be such rearrangement necessary to for differentiation of various cell types spreading within the body or occurring in specific organs.

Our results showing absence of +7 in noncultured normal thyroid cells suggest that specific lineages +7 are no present in this gland and, when observed in thyroid tumor cells, may represent a true neoplastic aberration.

References

1. Johansson B, Heim S, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F (1993): Trisomy 7 in nonneoplastic cells. *Genes Chromosom Cancer* 6:199-205.
2. Gama NB, Gama R, Thome JA, Tajara EH (1991): Cytogenetic analyses of one multinodular goiter of thyroid. *Cancer Genet Cytogenet* 55:73-77.
3. Belge G, Roque L, Soares J, Bruckmann S, Thode B, Fonseca E, Clode A, Bartnitzke S, Castedo S, Bullerdiek J (1998): Cytogenetic investigation of 340 thyroid hyperplasias and adenomas revealing correlations between cytogenetic and histology. *Cancer Genet Cytogenet* 101:42-48.
4. Longy M, Saura R, Schoule L, Mauhin C, Goussot JF, Grison O, Gouzigou P (1990): Chromosomal analysis of colonic adenomatous polyps. *Cancer Genet Cytogenet* 42:249-257.
5. Mertens F, Orndal C, Mandahl N, Heim S, Bauer H, Rydholm A, Tufvesson A, Willen H, Mitelman F (1993): Chromosome aberrations in tenosynovial giant cell tumors nontumorous synovial tissue. *Genes Chromosom Cancer* 6:212-217.
6. Bardi G, Johansson B, Pandis N, Heim S, Mandahl N, Hasgerstrand I, Holmin T, Andren-Sandberg, Mitelman F (1992): Trisomy 7 in nonneoplastic focal steatosis of the liver. *Cancer Genet Cytogenet* 63:22-24.
7. Knuutila S, Larramendy ML, Elfving P, El Rifai W, Mitelman F (1995): Trisomy 7 in neoplastic tubular epithelial cells of the kidney. *Human Genet* 95:149-156.
8. Elfving P, Aman P, Mandahl N, Lundgren R, Mitelman F (1995): Trisomy 7 in nonneoplastic epithelial kidney cells. *Cytogenet Cell Genet* 69:90-96.
9. Vanni R, Cossu L, Lecheri S (1990): Atherosclerotic plaque as a benign tumor? *Cancer Genet Cytogenet* 47:273-274.
10. Lee JS, Pathak S, Hopwood V, Tomasovi B, Mullins TD, Baker FL, Spitzer G, Neidhart JA (1987): Involvement of chromosome 7 in primary tumor and nonmalignant normal lung tissue. *Cancer Res* 47:6349-6352.



11. Heim S, Mandahhien N, Jin Y, Strmblad S, Lindstrom E, Salford LG, Mitelman F (1989): Trisomy 7 and sex chromosome loss in human brain tissue. *Cytogenet Cell Genet* 52:136-138.
12. Arnoldus EPJ, Peters ACB, Bots GTAM, Raap AK, Van der Ploeg M (1989): Somatic pairing of chromosome 1 centromeres in interphase nuclei of human cerebellum. *Human Genet* 83:231-234.
13. Arnoldus EPJ, Noordermeer IA, Peters AC, Raap AK, Van Der Ploeg M (1991): Interphase cytogenetics reveals somatic pairing of chromosome 17 centromeres in normal human brain tissue, but no trisomy 7 or sex-chromosome loss. *Cytogenet Cell Genet* 56:214-216.
14. Dalrymple SJ, Herath JF, Borell TJ, Moertel CA, Jenkins RB (1994): Correlation of cytogenetic and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) studies in normal and gliotic brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:448-456.
15. Wernick C, Thiel G, Lozanova T, Vogel S, Witkowski (1997): Numerical aberrations of chromosomes 1, 2, and 7 in astrocytomas studied by interphase cytogenetics. *Genes Chromosom Cancer* 19:6-13.
16. Tsui LC, Donis-Keller H, Grzeschil KH (1995): Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 7 Mapping 1994. *Cytogenet Cell Genet* 71:2-21.
17. Hermann ME & Lalley PA (1992): Significance of trisomy 7 in thyroid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 62:144-149.
18. Brock J-AK, Liu, W-H, Smith, ST, Young, R (1996): Detection of numerical chromosome anomalies in interphase cells of ovarian carcinomas using fluorescence *in situ* hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 16:120-129.
19. Taruscio D, Carcangiu, ML, Ried, T, Ward (1994): Numerical chromosomal aberrations in thyroid tumors detected by double fluorescence *in situ* hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 9:180-185.
20. Kovacs PR & Brusa P (1989): Clonal chromosome aberrations in normal kidney tissue from patients with renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 37:289-290.

21. Emanuel A, Szucs S, Weier HG, Kovacs G (1992): Clonal aberrations of chromosomes X, Y, 7 and 10 in normal kidney tissue of patients with renal cell tumors. *Genes Chromosom Cancer* 4:75-77.
22. Jones E, Zhu XL, Rohr R, Stephenson RA, Brothman AR (1994): Aneusomy of chromosome 7 and 17 detected by FISH in prostate cancer and the effects of selection *in vitro*. *Genes Chromosom Cancer* 11:163-170.
23. Dal Cin P, Sneyers W, Sayed Aly M, Segers A, Ostijn F, Van Damme B, Van Den Berghe H (1992): Involvement of 19q13 in follicular thyroid adenoma. *Cancer Genet Cytogenet* 60:99-101.
24. Herbergs J, Bruine A, Vallinga M, Ramaekers FCS de Goeij AFPM, ten Kate J, Hopman AHN (1992): Chromosome 7 aberrations in adenomas of the colon (Abstract). Porto, Portugal: 3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors: p 19.
25. Huebner K, Nowell PC, Croce CM (1989): Lineage-specific gene rearrangement/deletion: a nonconservative model. *Cancer Res* 49:4071-4074.

Table 1: Hybridization data of the control sample

Chromosome	Number of spots per nucleus (+SD)		
	1	2	3
7	16.72+4.95	82.48+4.34	1.05+0.65
10	23.94+2.98	75.48+2.70	0.62+0.65
17	19.62+3.24	79.32+3.48	1.10+0.74

Table 2: Distribution of chromosome 7, 10 and 17 copy number in six samples of normal skin

Case	% cells with chromosome 7					% cells with chromosome 10					% cells with chromosome 17				
	Number of copies					Number of copies					Number of copies				
	1	2	3	4	No. of cells	1	2	3	4	No. of cells	1	2	3	4	No. of cells
PN1	24.1	75.9	1.5	0	340	ND	ND	ND	ND	ND	20.4	79.3	1.4	0	348
PN2	15.3	83.1	1.6	0	307	26.1	74.2	0	0	306	ND	ND	ND	ND	ND
PN3	18.4	81.0	0,6	0	309	21.1	78.2	0,6	0	317	22.3	76.1	1.6	0	305
PN4	19.0	81.0	0	0	327	27.4	71.6	1.0	0	303	15.3	82.9	1.8	0	333
PN5	13.8	85.2	1.0	0	291	22.3	77.7	0	0	314	23.8	75.6	0.7	0	303
PN6	9.7	88.7	1.6	0	310	22.8	75.7	1.5	0	325	17.3	82.7	0	0	300

ND=not done

Table 3: Distribution of chromosome 7, 10 and 17 copy number in 10 samples of normal thyroid gland

Case	% cells with chromosome 7					% cells with chromosome 10					% cells with chromosome 17				
	Number of copies					Number of copies					Number of copies				
	1	2	3	4	No. of cells	1	2	3	4	No. of cells	1	2	3	4	No. of cells
N1	17.7	81.0	1.3	0	311	26.2	72.2	1.7	0	302	27.3	72.7	0	0	300
N2	12.0	88.0	0	0	300	28.0	71.1	1.0	0	301	28.3	71.7	0	0	300
N3	11.4	86.6	2.0	0	306	25.0	75.0	0	0	300	26.5	73.5	0	0	298
N4	20.6	77.1	2.3	0	310	29.6	70.4	0	0	304	29.7	70.3	0	0	300
N5	12.3	87.7	0	0	279	29.1	70.8	0	0	247	27.7	72.3	0	0	303
N6	21.0	77.5	1.5	0	300	23.3	75.7	1.0	0	317	20.2	78.2	1.6	0	316
N7	12.9	87.1	0	0	303	21.5	75.9	2.6	0	311	21.9	78.1	0	0	292
N8	11.7	88.3	0	0	300	24.8	74.3	1.0	0	303	26.7	73.3	0	0	300
N9	10.4	86.6	3.0	0	298	21.4	76.6	2.0	0	304	28.3	69.7	2.0	0	300
N10	9.6	88.7	1.7	0	301	26.7	73.4	0	0	316	24.7	75.3	0	0	304

Detection of numerical chromosome anomalies in interphase cells of benign and malignant thyroid lesions using fluorescence *in situ* hybridization

Nilce Barril, Andrea Borduchi Carvalho-Sales and Eloiza Helena Tajara

From Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto-SP, Brazil.

ADDRESS REPRINT REQUESTS TO: Eloiza H. Tajara, Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, Caixa Postal 136. 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

tajara@bio.ibilce.unesp.br

ABSTRACT

Benign and malignant thyroid tumors constitute a wide range of neoplasias showing recurrent chromosome abnormalities. In attempt to characterize specific numerical chromosome abnormalities in thyroid tissues we present here the findings from a study of archival samples depicted by 10 malignant tumors and 30 benign lesions and 10 normal thyroid tissues. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) staining were performed on noncultured samples using biotinylated centromere specific probes for chromosomes 7, 10 and 17. Trisomy or tetrasomy 7 were present in 19 benign and in 7 malignant tumors. Trisomy 10 or 17 were observed in 18 adenomas or goiters and in 9 carcinomas and monossomy 17 was seen in two carcinomas. Our findings suggest that such abnormalities are an *in vivo* phenomenon and may be important to neoplastic proliferation in thyroid gland.

INTRODUCTION

Nodules in the thyroid are frequent in man and constitute a wide variety of conditions which range from benign lesions as goiters and adenomas to malignant tumors including differentiated and anaplastic carcinomas. In most cases, the neoplastic nodules are adenomas and, less commonly, are diagnosed as carcinomas (1).

Usually it is difficult to differentiate nonneoplastic from neoplastic nodules and benign from malignant conditions. In fact, neoplastic lesions differ considerably in their biological and clinical behaviors. A very rare group comprises medullary carcinomas which rise from parafollicular calcitonin-secreting C-cells. Tumors derived from follicular cells include most adenomas which have a small but clear cancerous potential, the well differentiated papillary and follicular carcinomas, and the aggressive and uncommon anaplastic carcinoma. Papillary and follicular carcinomas are the most common thyroid cancers accounting for about 75% and 20%, respectively, of all morphologic malignant variants. Both are indolent but the latter carry a more significant long-term mortality rate (1,2).

There are recent data suggesting that thyroid lesions do not represent independent entities but different steps of a histologic sequence – from normal follicular cell to adenoma to follicular or papillary carcinoma to anaplastic carcinoma (3). It is even possible that this pathway includes goiters, a simple hormone-dependent proliferative condition of follicular cells. In fact, some adenomas and goiters share the same cytogenetic abnormalities (4). For example, polysomies of chromosomes 7 and 12 or structural aberrations involving 19q13

have been observed in a subgroup of thyroid follicular adenomas and in some cases of thyroid goiters (4-9,11-14). These findings indicate that, at least in these cases, there could be a biological continuum between goiters and adenomas and gain of chromosomes might play an important role in the pathogenesis of these two types of lesions (11). It is interesting that trisomies 7 and 12 have also been observed in papillary carcinomas with a poor clinical outcome (7,14-16) and in follicular carcinomas (7,17).

To gain a better understanding of numerical abnormalities related to thyroid cell proliferation and to test whether molecular cytogenetics could give useful diagnostic information, we performed FISH analyses using probes for chromosomes 7, 10 and 17 in interphase nuclei of archival and fresh samples of adenomas, goiters and papillary and follicular carcinomas of thyroid.

Chromosome 7 and 10 were chosen because their trisomies have been described in thyroid diseases and the significance of such abnormalities is controversial (4,17). Chromosome 17 was chosen because of the known tumor suppressor genes on this chromosome, as well the reports of loss of chromosome 17 by studies on benign and malignant thyroid lesions (10).

MATERIALS AND METHODS

In the present study, formalin-fixed, paraffin-embedded samples of 10 goiters, 10 adenomas, 7 papillary and 3 follicular carcinomas, and fresh samples of 10 goiters were analysed. As controls, experiments were performed on 10 fresh samples of thyroid tissues obtained at autopsy from persons who died of non-thyroid related diseases.

The archival samples were processed as previously described by Barril *et al.* (1998) (19). In brief, the paraffin blocks were sectioned at 30-50 μ m and deparaffinized with xylene. Tissue sections were suspended in pepsin 0,9% and incubated at 37°C for one hour. The digested material was rinsed using Hank's basic salt solution and the pelleted nuclei were resuspended in acetic acid 60%. Slides were prepared and stored at -70°C until used. The fresh tissues were minced with scissors, treated with hypotonic solution, fixed in methanol-acetic acid (3:1) and disaggregated with acetic acid.

Slides were pretreated with proteinase K (8 μ g/ml) at 37°C and denatured at 74°C, dehydrated and hybridized overnight in a moist chamber at 37°C. Slides were subsequently washed in 0,5XSSC at 74°C and the detection was performed using avidin-FITC, counterstained by adding propidium iodide. For each probe, signals of about 300 intact nuclei were evaluated by two independent observers. For analysis, the guidelines described by Brock *et al.* (1996) (20) were followed: only nonoverlapping nuclei were counted, damaged nuclei were not included,

signals had to be completely separated to be scored individually, and bilobed signals that were not completely separated were counted as one. Only slides that displayed hybridization efficiency of 80% or more were scored. The evaluation of centromere copy numbers in 10 normal fresh thyroid samples was used to define the criteria of aneusomy. The average percentage of control nuclei with 2 signals of chromosomes 7, 10 and 17 ranged from 77 to 89%, from 70 to 77% and from 70 to 78%, respectively. Ranges of the average percentage of nuclei with 1 signal of these chromosomes were 10-21%, 21-30%; 20-30% and with 3 signals were 0-3%, 0-3% and 0-2%, respectively. These results were concordant with previous experiments performed on fresh normal skin from healthful persons (21). By definition, monosomy or trisomy were diagnosed only when the percentage of cells with one or three spots, respectively, was greater than the mean +4XSD of the controls (15). Accordingly, in our study, monosomy was diagnosed whenever the percentage of nuclei with one spot was greater than 30.7%, 37.2% and 38.2%, and trisomy if more than 5.6%, 4.7% and 3.4% of nuclei exhibited three spots for chromosomes 7, 10 and 17, respectively (Table 1). Tetrasomy was absent in the control samples; thus, 5% was arbitrarily taken as the cutoff value.



RESULTS:

Tables 2, 3, 4 and 5 summarize the morphological aspects and FISH findings for 40 thyroid lesions analyzed in the present study. Representative FISH results are shown in Figure 1. Cells from samples presumed to be trisomic for chromosomes 7 and 10, and tetrasomic and monosomic for chromosomes 7 and 17 are illustrated in Figure 1 A, B, C and D, respectively.

The overall percentage of nuclei with excess copies of chromosomes 7, 10 and 17 reached 43.4%, 47.2% and 49.1%, respectively. Two cases showing monosomy 17 were papillary carcinomas (cases F2 and F9). The predominant cell populations were trisomic for chromosome 7 in case F27, for chromosome 10 in cases F17, F27 and F77 and for chromosome 17 only in case F78.

Goiters

Using criteria defined and described in "Materials and Methods", we identified trisomy 7 in seven of the 10 fresh samples and in four of the 10 archival samples of goiters and, in eight of them, additional cell populations with trisomy 10 or 17 were also detected. Trisomy 10, as the sole anomaly, was found in two cases. The case F34 was previously analysed by Gama *et al.* (1991) (8) after short-term culture and also showed trisomy 7, 10 and 17.

No numerical abnormality was detected in goiters smaller than 4 cm.

Adenomas

Trisomy 7 was observed in eight of the 10 adenomas and, in four of them, both trisomy and tetrasomy were detected. Trisomy 10 were also observed in seven samples, two of them with additional tetrasomic cell populations. Besides other aneusomies, trisomy 17 was revealed in cases F15, F16, F17, F20 and F27.

When comparing the histological appearance with the presence of aneusomy, no apparently significant association was found in adenomas.

Carcinomas

Trisomy 7 was observed in seven of the 10 papillary and follicular carcinomas, and all presented other aneusomies. Seven samples showed trisomy 10, two of them with tetrasomy for this chromosome. Trisomy 17 was frequent and detected in eight cases. In two papillary carcinomas associated with Hashimoto's thyroiditis (F2 and F9), we observed monosomy 17. The case F2 was the only one among the malignant tumors which had metastasis: two out of four lymph nodes examined were positive for carcinoma.

DISCUSSION

FISH was used to analyse numerical centromere abnormalities in nuclei of 40 thyroid lesions and showed chromosomal aberrations in 60-70% (6/10 fresh and 7/10) of the goiters, in 90% (9/10) of the adenomas and in 100% (10/10) of the papillary or follicular carcinomas. Aneusomy frequencies were apparently similar in fresh and paraffin embedded goiter samples and lower than in benign or malignant neoplasias. If such neoplastic and nonneoplastic nodules do represent related steps of a continuous process, as suggested by Roque *et al.* (1993a) (11), these findings are in agreement with the notion that, during neoplastic development, genetic instability commonly increases.

Our FISH results revealed that 65% (26/40) and 57.5% (23/40) of thyroid lesions showed polysomy 7 and 10, respectively. Different genes are located on such chromosomes and related to cell proliferation or thyroid function such as the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) (22), the transforming sequence thyroid 1 (*TST1*), the thyroid stimulating hormone receptor-like 3 (*TSHRL3*), cell division cycle 2 (*CDC2*) (23), and the proto-oncogenes *c-erb A* homologs encoding proteins with different T3 binding properties (24), *MET* and *ra1* (22). Thus, trisomies 7 and 10 may be connected with the mechanism of thyroid diseases through genes related to cell proliferation. If an extra chromosome 7 or 10 are present, excess products could stimulate cell growth and be an initial step in malignant transformation or even in differentiation (27,28).

In thyroid gland, gains of chromosome 7 were previously described either as the sole cytogenetic change or as one of several numerical abnormalities in papillary and follicular carcinomas and in benign lesions such as multinodular goiters and adenomas (4,7,8,11-13,17). However, no trisomic clone has been identified in normal thyroid tissues using FISH technique (21). It appears, therefore, that such aneusomy is a legitimate abnormality in hyperlasia and neoplasia. However, we cannot rule out the possibility that this chromosome has higher susceptibility for non-disjunction and the extra 7 may be a neutral abnormality with growing advantage (29).

Some studies on thyroid carcinomas have concluded that trisomy 7 is correlated with poor clinical outcome (7,15,18). Conversely, Belge *et al.* (1994) (18) suggested that such abnormality may be the initial event in neoplastic process and lead to proliferation and clonal expansion due to overexpression of growth factors and receptor genes (30). Trisomic cells could become less differentiated leading to microfollicular areas and, when further genetic alterations occur, morphological changes as adenomatous goiters or adenomas could be recognizable. Indeed, in the present study, trisomy 7 as the sole aberration only appeared in thyroid hyperplasias in agreement with the idea that gain of this chromosome is an early event in the development of thyroid lesions. It is noteworthy the fact that no numerical abnormality could be detected in goiters with smaller diameters suggesting that an event earlier than trisomy 7 may be involved in thyroid tumorigenesis.

A diminished number of signal for chromosome 17 was observed in two carcinomas. Arnoldus *et al.* (1991) (31) and Brown *et al.* (1994) (32) have shown

that brain and prostate tissues display somatic pairing of chromosome 17 centromeres in interphase nuclei, resulting in a single FISH signal. We believe that our results reflect true loss of chromosome 17 because we rarely detected significantly larger signals representing somatic pairing of homologous chromosomes.

Chromosome 17 contains known and suspected tumor suppressor genes that have been implicated in the neoplastic process, including *TP53* (33) and *BRCA1* genes (32). Alterations of *TP53* gene in thyroid neoplasia have been found almost exclusively in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas (35-41). When the tumor is composed by areas with different degrees of differentiation, *TP53* gene mutation was restricted to the less differentiated area of the neoplasia (36). These observations indicate that abnormal p53 protein expression may be correlated to the loss of the differentiated properties of the thyrocyte and to high invasive and aggressive behavior of thyroid carcinomas (42). In agreement with this hypothesis, our results revealed monosomy 17 in only two papillary carcinomas associated with Hashimoto's thyroiditis showing large diameters or poorly differentiated areas and metastasis.

Our findings suggest that FISH analysis may help in the understanding of biological and clinical behaviors of thyroid neoplastic lesions. In addition, it might also be valuable for developing new diagnostic criteria and for differentiating harmless thyroid nodules from those carrying cancerous potential and poor prognosis.

REFERENCES

- 1.Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (1994): Robbins: pathologic basis of disease. Ed. 5th., Edt W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pensylvania, p 1121-1142.
- 2.Fagin JA (1995): Tumor suppressor genes in human thyroid neoplasms: *p53* mutations are associated undifferentiated thyroid cancers. *J Endocrinol Invest* 18:140-142.
- 3.Williams ED (1995): Mechanisms and pathogenesis of thyroid cancer in animals and man. *Mutation Res* 333:123-129.
- 4.Belge G, Roque L, Soares J, Bruckmann S, Thode B, Fonseca E, Clode A, Bartnitzke S, Castedo S, Bullerdiek J (1998): Cytogenetic investigation of 340 thyroid hyperplasias and adenomas revealing correlations between cytogenetic and histogoly. *Cancer Genet Cytogenet* 101:42-48.
- 5.Bartnizke S, Hermann ME, Zuschneid W, Neuhaus P, Bullerdiek J (1989): Cytogenetics findings on eight follicular thyroid adenomas including one with a t(10;19). *Cancer Genet Cytogenet* 39:65-68.
- 6.Bondenson L, Bengtsson A, Bondenson A-G, Dahlenfors R, Grimelius L, Wedel B, Mark J (1989): Chromosome studies in thyroid neoplasia. *Cancer* 64:680-685.
- 7.Teyssier JR, Liautaud-Roger F, Ferre D, Patey M, Duffer J (1990): Chromosomal changes in thyroid tumors. Relation with DNA content, karyotypic features and clinical data. *Cancer Genet Cytogenet* 50:249-263.
- 8.Gama NB, Gama R, Thome JA, Tajara EH: (1991). Cytogenetic analyses of one multinodular goiter of thyroid. *Cancer Genet Cytogenet* 55:73-77.
- 9.Dal Cin P, Sneyers W, Sayed Aly M, Segers A, Ostijn F, Van Damme B, Van Den Berghe H (1992): Involvement of 19q13 in follicular thyroi adenoma. *Cancer Genet Cytogenet* 60:99-101.
- 10.Antonini P, Levy N, Caillou B, Venuat AM, Schlumberger M, Parmentier C, Bernheim A (1993): Numerical aberrations, including trisomy 22 as the sole

- anomaly, are recurrent in follicular thyroid adenomas. *Genes Chromosom Cancer* 8:63-66.
11. Roque L, Soares P, Correia C, Carredo C, Clode A, Castedo S, Soares J (1993a): Thyroid nodular hyperplasia: chromosomal studies in 14 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 69:31-34.
12. Roque L, Castedo S, Gomes P, Soares P, Clode A, Soares J (1993b): Cytogenetic findings in 18 follicular thyroid adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 67:1-6.
13. Criado B, Barros A, Suijkerbuijk RF, Weghuis DO, Seruca R, Fonseca E, Castedo S (1995): Detection of numerical alterations for chromosomes 7 and 12 in benign thyroid lesions by *in situ* hybridization. *American J Pathol* 147:136-144.
14. Hermann ME & Lalley PA (1992): Significance of trisomy 7 in thyroid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 62:144-149.
15. Taruscio D, Carcangiu, ML, Ried, T, Ward (1994): Numerical chromosomal aberrations in thyroid tumors detected by double fluorescence *in situ* hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 9:180-185.
16. Roque L, Clode AL, Gomes AL, Santos-Rosa J, Soares J, Castedo S (1995): Cytogenetic findings in 31 papillary thyroid carcinomas. *Genes Chromosom Cancer* 23:157-162.
17. Roque L, Clode A, Belge G, Pinto A, Bartnitzke S, Santos JR, Thode B, Bullerdiek J, Castedo S, Soares J (1998): Follicular thyroid carcinoma: chromosome analysis of 19 cases. *Genes Chromosom Cancer* 21:250-255.
18. Belge G, Thode B, Rippe V, Bartnitzke S, Bullerdiek (1994): A characteristic sequence of trisomies starting with trisomy 7 in benign thyroid tumors. *Human Genet* 94:198-202.
19. Barril N, Carvalho-Salles AB, Tajara EH (1998): A rapid technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by fluorescence *in situ* hybridization with alpha satellite probes. *Genet Mol Biol*, in press.

20. Brock J-AK, Liu, W-H, Smith, ST, Young, R (1996): Detection of numerical chromosome anomalies in interphase cells of ovarian carcinomas using fluorescence *in situ* hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 16:120-129.
21. Barril N, Carvalho-Salles AB, Tajara, EH (1998): Intherphase cytogenetic analysis of normal tissue of thyroid gland by *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, Submitted.
22. Tsui LC, Donis-Keller H, Grzeschil KH (1995): Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 7 Mapping 1994. *Cytogenet Cell Genet* 71:2-21.
23. Simpson NE & Cann HM (1991): Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 10. *Cytogenet Cell Genet* 58:428-458.
24. Miyajima N, Horiuchi R, Shibuya Y, Fukushima S, Matsubara K, Toyoshima K, Yamamoto T (1989): Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite strands of the same genetic locus. *Cell* 57:31-39.
25. Taruscio D, Danesi R, Montaldi, A, Cerasoli S, Cenacchi G, Giangaspero F (1997): Nonrandom gain chromosome 7 in central neurocytoma: a chromosomal analysis and fluorescence *in situ* hybridization study. *Virchows Arch* 430:47-51.
26. Alers, JC, Krijtenburg, PJ, Rosenberg, C, Hop WC, Verkerk, AM, Schroder, FH, van der Kwast, TH, Bosman, FT, van Dekken, H (1997): Interphase cytogenetics of prostatic tumor progression: specific chromosomal abnormalities are involved in metastasis to the bone. *Lab Invest* 77:437-448.
27. Huebner K, Nowell PC, Croce CM (1989): Lineage-specific gene rearrangement/deletion: a nonconservative model. *Cancer Res* 49:4071-4074.
28. Johansson B, Heim S, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F (1993): Trisomy 7 in nonneoplastic cells. *Genes Chromosom Cancer* 6:199-205.

29. Tharapel AS, Qumsiyeh MB, Photopulos G (1991): Numerical chromosome abnormalities with early clinical stages of gynecologic tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 55:89-96.
30. Aasland R, Lillehaug JR, Male R, Josendal O, Varhaug JE, Kleppe K (1988): Expression of oncogenes in thyroid tumours: coexpression of c-erbB2/neu and c-erbB. *Br J Cancer* 57:358-363.
31. Arnoldus EPJ, Noordermeer IA, Peters ACB, Raap AK, Van Der Ploeg M (1991): Interphase cytogenetics reveals somatic pairing of chromosome 17 centromeres in normal human brain tissue, but no trisomy 7 or sex-chromosome loss. *Cytogenet Cell Genet* 56:214-216.
32. Brown JA, Alcaraz A, Takahashi S, Persons DL, Lieber MM, Jenkins RB (1994): Chromosomal aneusomies detected by fluorescence *in situ* hybridization analysis in clinically localized prostate carcinoma. *J Urol* 152:1157-1162.
33. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM (1986): Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17q13. *Nature* 320:84-85.
34. Wertheim I, Tangir J, Welch WR, Berkowitz RS, Chen WY, Mok SC (1996): Loss of heterozygosity of chromosome 17 in human borderline and invasive epithelial ovarian tumors. *Oncogene* 12:2147-2153.
35. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti MA (1993): Gene p53 are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin Invest* 91:1753-1760.
36. Nakamura T, Yana I, Kobayashi T, Shin E, Karakawa K, Fujita S, Miya A, Mori T, Nishiho I, Takai S-I (1992): p53 gene mutations associated with anaplastic transformation of human thyroid carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 83:1293-1298.
37. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang S-H, Koeffler HP (1993): High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 91:170-184.

38. Pollina L, Pacini F, Fontanini G, Vignati S, Bevilacqua G, Basolo F (1996): bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 73:139-143.
39. Ito, T.; Ishizaka, Y.; Tahira, T.; Yamoto, M.; Miya, A.; Imaik, K.; Iachi, A.; Takai, S.; Sugimura, T.; Magao, M (1992): Identification and analysis of the ret proto-oncogene promoter region in neuroblastoma cell lines and medullary thyroid carcinomas from MEN 2A patients. *Oncogene* 7:1201-1206.
40. Nikiforov YE, Nikiforova MN, Gnepp DR, Fagin JA (1996): Prevalence of mutations of ras and p53 in benign and malignant thyroid tumors from children exposed to radiation after the Chernobyl nuclear accident. *Oncogene* 13:687-693.
41. Grebe SKG, Mciver B, Hay ID, Wu P S-C, Maciel LMZ, Drabkin HÁ, Goellner JR, Grant CS, Jenkins RB, Eberhart ML (1997): Frequent loss of heterozygosity on chromosome 3p and 17p without *VHL* or *p53* mutations suggest involvement of unidentified tumor supressor genes in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metabolism* 82:3684-3691.
42. Moretti F, Farsetti A, Soddu S, Misiti S, Crescenzi M, Filetti S, Andreoli M, Pontecorvi A (1997): *p53* re-expression inhibs proliferation and restores differentiation of human thyroid anaplastic carcinoma cells. *Oncogene* 14:729-740.

Table 1: Hybridization data of the control sample

Chromosome	Number of spots per nucleus (+SD)		
	1	2	3
7	13.96+4.2	84.86+4.53	1.18+1.11
10	25.56+2.91	73.54+2.29	0.93+0.94
17	26.13+3.01	73.44+2.97	0.36+0.76

Table 2: Distribution of chromosome 7, 10 and 17 copy number in samples of 20 goiters and 10 adenomas

Case	% cells with chromosome 7					% cells with chromosome 10					% cells with chromosome 17				
	Number of copies					Number of copies					Number of copies				
	1	2	3	4	No. of cells	1	2	3	4	No. of cells	1	2	3	4	No. of cells
Goiters – Fresh samples															
F72	15.9	83.2	1.0	0	302	26.3	70.6	3.0	0	307	30.4	69.6	0	0	300
F74	11.5	66.1	20.4	2.0	339	28.0	64.8	7.2	0	290	20.6	77.7	1.6	0	301
F75	8.9	47.7	43.4	0	380	29.2	63.7	7.1	0	308	20.3	79.7	0	0	296
F81	14.3	83.8	2.0	0	314	30.3	66.9	2.7	0	330	20.0	80.0	0	0	300
F82	14.1	84.3	1.8	0	285	31.9	68.1	0	0	307	20.0	80.0	0	0	300
F83	14.7	78.8	6.6	0	306	25.8	69.4	4.8	0	310	20.8	79.2	0	0	303
F84	16.6	83.4	0	0	300	25.0	63.6	11.4	0	300	19.7	80.3	0	0	305
F86	16.1	80.3	3.6	0	311	26.6	45.0	24.4	4.0	300	21.3	75.4	3.2	0	310
F87	14.7	74.2	11.1	0	307	25.0	53.0	22.0	0	300	27.2	72.8	0	0	323
F88	14.4	82.5	2.7	0	304	26.6	73.4	0	0	300	20.0	80.0	0	0	300
Goiters – Archival samples															
F28	8.4	70.6	14.5	6.4	296	26.4	73.6	0	0	300	28.3	71.6	0	0	222
F29	9.4	81.2	9.3	0	203	24.3	65.8	9.8	0	304	22.3	77.7	0	0	301
F30	8.6	56.3	35.1	0	302	29.9	68.1	2.0	0	301	21.0	75.5	3.6	0	310
F31	16.4	67.0	16.6	0	300	27.6	72.5	0	0	294	21.6	78.4	0	0	300
F32	14.7	77.7	7.6	0	300	9.4	63.9	26.5	0	316	25.0	75.0	0	0	300
F33	16.4	79.6	4.0	0	300	30.0	70.0	0	0	300	26.6	73.4	0	0	300
F34	8.4	59.0	28.1	4.3	298	19.1	50.8	30.1	0	319	20.4	69.7	9.8	0	294
F35	6.9	93.1	0	0	322	26.6	72.8	2.0	0	301	20.6	76.4	3.0	0	300
F36	9.0	90.9	0	0	209	27.6	70.4	2.1	0	298	15.6	84.3	0	0	204
F37	7.3	86.3	7.1	0	327	18.3	80.3	1.4	0	355	21.3	78.7	0	0	292
Adenomas															
F14	9.0	84.5	13.1	0	298	18.4	81.4	0	0	300	24.0	74.3	1.7	0	287
F15	8.4	56.3	29.9	5.4	204	18.4	56.6	20.7	4.2	289	17.4	67.2	15.5	0	265
F16	9.8	75.5	14.7	0	306	12.7	83.6	3.8	0	317	15.9	77.6	6.5	0	321
F17	8.4	64.7	21.1	5.8	308	6.7	21.1	47.2	21.9	339	19.8	71.4	8.8	0	307
F18	13.5	84.8	1.8	0	282	18.6	70.1	8.2	3.2	257	21.8	78.3	0	0	294
F19	10.2	79.8	9.9	0	303	18.1	72.1	10.0	0	322	21.1	77.3	1.7	0	309
F20	7.1	65.8	24.0	3.1	322	8.2	60.6	26.6	2.9	304	15.6	80.7	3.6	0	306
F24	9.6	50.7	31.6	8.1	335	7.8	48.6	43.5	0	331	13.7	84.5	1.7	0	298
F26	11.9	82.9	5.2	0	310	10.9	85.6	3.4	0	321	18.2	79.2	2.6	0	303
F27	6.5	30.9	42.9	19.5	342	13.1	32.8	40.3	14.0	330	19.9	73.6	7.0	0	300

Table 3: Distribution of chromosome 7, 10 and 17 copy number in 10 samples of thyroid carcinomas

Case	% cells with chromosome 7						% cells with chromosome 10						% cells with chromosome 17					
	Number of copies					No. of cells	Number of copies					No. of cells	Number of copies					No. of cells
	1	2	3	4	1		2	3	4	1	2		3	4				
F1	15.3	70.2	14.5	0	221	24.7	75.3	0	0	323	20.5	66.6	13.0	0	302			
F2	12.2	60.1	27.5	0	319	23.5	34.2	22.8	19.5	307	55.6	44.4	0	0	333			
F3	14.4	58.0	27.6	0	300	23.0	73.4	3.6	0	300	19.9	44.3	33.1	2.8	312			
F7	15.4	56.6	28.1	0	346	24.0	64.0	12.0	0	300	33.7	57.5	8.8	0	327			
F9	13.8	82.4	3.8	0	317	28.6	66.6	4.6	0	300	50.8	49.2	0	0	331			
F10	13.0	85.3	1.6	0	301	26.4	67.5	6.3	0	304	23.7	69.7	6.6	0	330			
F12	13.6	56.0	30.5	0	325	24.1	69.0	7.0	0	303	17.6	66.4	16.0	0	300			
F13	14.1	75.7	10.2	0	304	24.4	63.7	12.0	0	300	33.5	55.0	11.5	0	313			
F77	12.7	82.3	5.1	0	316	23.2	28.1	37.7	10.9	302	18.7	44.9	36.4	0	325			
F78	14.2	44.1	39.0	2.8	254	21.4	69.6	23.4	0	300	16.8	34.3	49.1	0	304			

Table 4: Summary of the clinical, histological and FISH data of goiters and adenomas

Case/Sex/Age (years)	Histology	Morphological aspect	Other features	Diameter (cm)	Material	FISH results
Goiters						
F72/F/52	NG	Macrofollicular	-	2.5	F	-
F74/M/56	NG	Macrofollicular	-	10	F	+7,+10
F75/M/76	NG	Macrofollicular	-	15	F	+7,+10
F81/F/30	NG	Macrofollicular	-	3	F	-
F82/F/33	NG	Macrofollicular	-	5	F	-
F83/M/43	NG	Macrofollicular	Hashimoto's thyroiditis	5	F	+7,+10
F84/F/53	MG	Macrofollicular	-	8	F	+10
F86/F/22	MG	Macrofollicular	-	6	F	+10
F87/F/43	NG	Macrofollicular	-	6	F	+7,+10
F88/F/54	NG	Macrofollicular	-	5.5	F	-
F28/F/68	MG	Macrofollicular	-	8	P	+7,+7X2
F29/F/61	NG	Macrofollicular	-	6	P	+7,+10
F30/F/33	NG	Macrofollicular	-	7	P	+7,+17
F31/M/41	NG	Macrofollicular	-	6	P	+7
F32/M/31	NG	Macrofollicular	-	5	P	+7,+10
F33/F/25	MG	Macrofollicular	-	3.5	P	-
F34/F/43	NG	Macrofollicular	-	5	P	+7,+10,+17
F35/M/41	NG	Macrofollicular	-	5	P	-
F36/F/45	NG	Macrofollicular	-	5	P	-
F37/F/14	NG	Macrofollicular	-	4	P	+7
Adenomas						
F14/F/38	FA	Macro+microfollicular	-	4	P	+7
F15/F/51	FA	Macro+microfollicular	-	5	P	+7/+7X2,+10,+17
F16/F/42	FA	Macro+microfollicular	-	4	P	+7,+17
F17/F/46	FA	Microfollicular	Hurthle cell features	3.5	P	+7/+7X2,+10/+10X2,+17
F18/F/48	FA	Macrofollicular	-	4	P	+10
F19/F/49	FA	Macrofollicular	-	5	P	+7,+10
F20/M/45	FA	Macrofollicular	-	6	P	+7,+10,+17
F24/F/54	FA	Macro+microfollicular	-	3.5	P	+7/+7X2,+10
F26/M/38	FA	Macrofollicular	-	3.5	P	-
F27/F/46	FA	Microfollicular	Hurthle cell features	3	P	+7/+7X2,+10/+10X2,+17

MG=multinodular goiter; NG=nodular goiter; FA=follicular adenoma; P=parafin; F=fresh

Table 5: Summary of the clinical, histological and FISH data of archival carcinomas

Case/Sex/Age (years)	Histology	Poorly differentiated areas	Other features	Diameter (cm)	Metastasis at diagnosis	FISH results
F1/F/13	PC	No	Follicular variant	3	0	+7,+17
F2/F/34	PC	Yes	Hashimoto's thyroiditis	3	Lymph nodes	+7,+10/+10X2,-17
F3/M/40	PC	No	Follicular variant	2.5	0	+7,+17
F7/M/47	FC	No	Hurthle cell features	3.5	0	+7,+10,+17
F9/M/37	PC	No	Follicular variant/ Hashimoto's thyroiditis	5	0	-17
F10/F/31	PC	No	Follicular variant	4	0	+10,+17
F12/F/27	FC	No	-	4	0	+7,+10,+17
F13/F/28	PC	No	Follicular variant	4.5	0	+7,+10,+17
F77/F/42	MPC	No	-	2.5	0	+10/+10X2,+17
F78/F/48	FC	No	Hurthle cell features	6	0	+7,+10,+17

PC=papillary carcinoma; FC=follicular carcinoma; MPC=micropapillary carcinoma

Legends:

Figure 1: Representative photomicrographs showing FISH with of alpha satellite sequences. **A:** Nucleus with three-signal score of chromosome 7. **B:** Nucleus with three copies of chromosome 10. **C:** Cell with four signal of chromosome 10 (arrow). **D:** Nuclei showing one copy of chromosome 17.

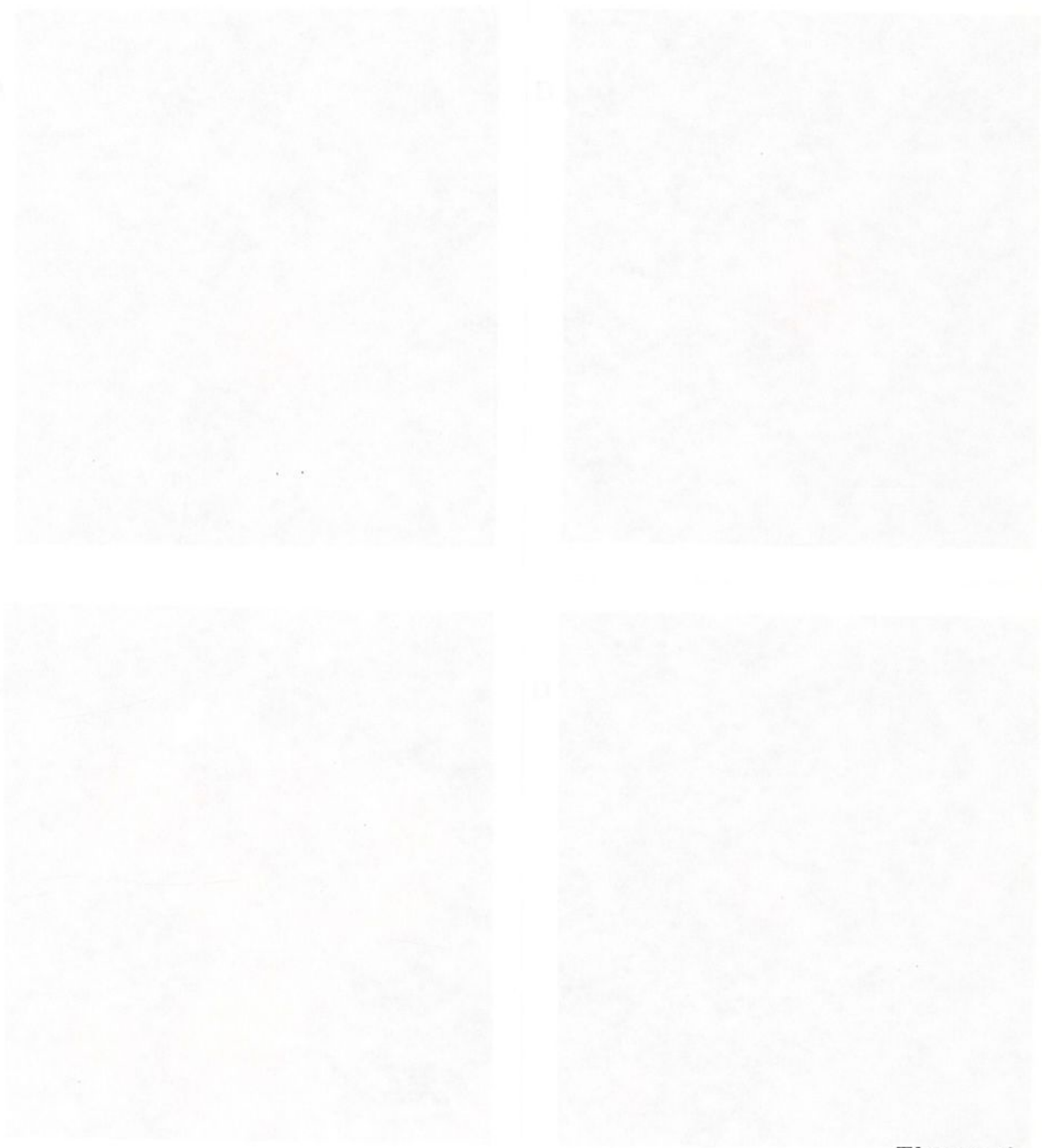
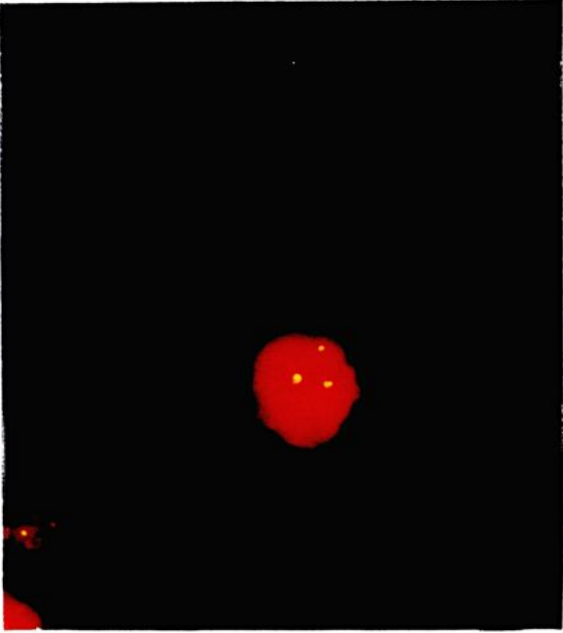
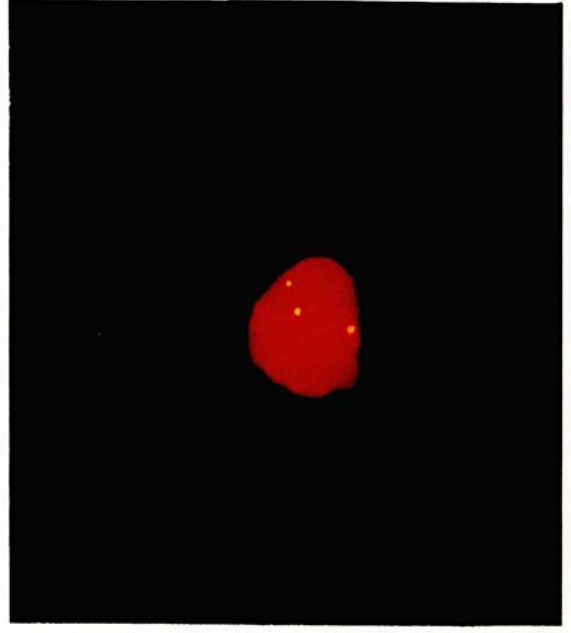


Figure 1

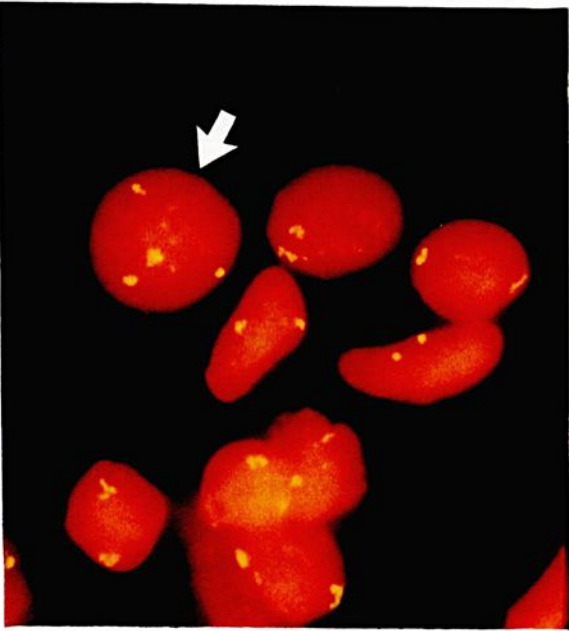
A



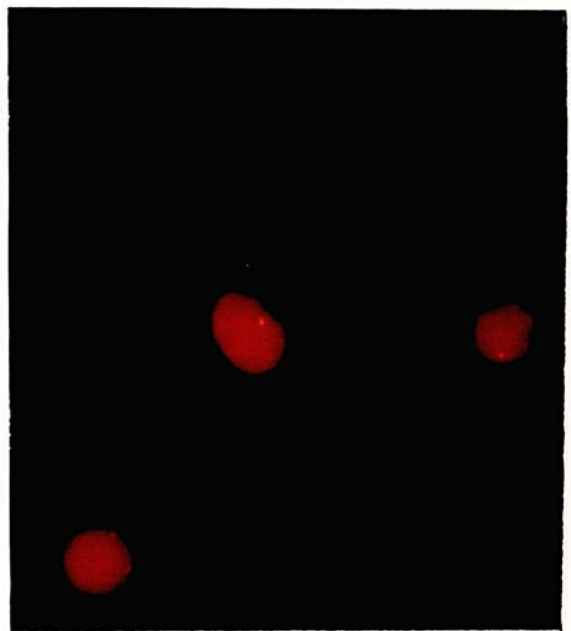
B



C



D



IV. Discussão e conclusões

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente tem sido utilizada na detecção de alterações cromossômicas em metáfases ou núcleos interfásicos tanto de células cultivadas como de preparações frescas ou de material arquivado (Baretton *et al.*, 1994). Um grande número de sondas e estratégias de marcação tem sido empregado com diferentes objetivos como, por exemplo, sondas para a região centromérica ou pericentromérica, que são úteis na caracterização de aneuploidias e também de quebras induzidas por agentes químicos. A facilidade e a velocidade de análise e a sua aplicação em núcleos interfásicos de material arquivado e de células que não se dividem *in vitro* ou não resultam em boas preparações cromossômicas têm tornado essa metodologia valiosa no estudo de muitos tecidos. Entretanto, alguns problemas são inerentes à técnica e podem influenciar na interpretação dos resultados. Como exemplos podem ser citados os sinais inespecíficos decorrentes de hibridação da sonda com várias regiões do genoma, o número de células em fase G2 e S que exibem duplicação de cromátides ou descondensação do DNA, a separação prematura das cromátides, a contracoloração excessiva ou a extringência das lavagens resultando em perda de sinais, as regiões satélites com polimorfismo, etc. Apesar dessas dificuldades, não há dúvidas de que essa técnica é um complemento valioso à análise citogenética convencional na detecção de aneuploidias (Eastmond *et al.*, 1995).

O presente trabalho utilizou núcleos isolados a partir de tecidos frescos e arquivados em parafina para a realização da técnica de FISH. Esses últimos permitiram a análise retrospectiva de tumores, em especial de tipos com

incidência baixa na população. Os resultados indicaram alterações numéricas dos cromossomos 7, 10 e 17 no grupo das lesões tiroideanas benignas e malignas.

Apesar dos dados obtidos estarem de acordo com aqueles já referidos pela literatura e dos critérios de aneuploidia usados serem estridentes, não é possível descartar a hipótese de que núcleos com três ou quatro sinais na verdade refletem células na fase G2 ou S do ciclo celular ou separação cromatídica prematura em um ou nos dois homólogos (Eastmond *et al.*, 1995).

Nossos resultados mostraram que 65% (26/40) e 57.5% (23/40) das lesões estudadas apresentaram polissomia 7 e 10, respectivamente. Diferentes genes relacionados com a proliferação ou com a função tiroideana encontram-se mapeados nesses cromossomos, tais como o do *epidermal growth factor receptor* (EGFR), da *transforming sequence thyroid 1* (TST1), do *thyroid stimulating hormone receptor-like 3* (TSHRL3), da quinase *cell division cycle 2* (CDC2), além dos protooncogenes *MET* e do *c-erb A* e *ra1* que codifica proteínas com diferentes propriedades de ligação do T3 (Miyajima *et al.*, 1989; Simpson & Cann, 1991; Tsui *et al.*, 1994). Assim, as aneussomias 7 e 10 podem estar relacionadas com o mecanismo das doenças tiroideanas através de genes envolvidos com a proliferação celular.

A trissomia do cromossomo 7 é frequentemente observada em células cultivadas de tumores malignos da tireóide (Roque *et al.*, 1998) e de outros órgãos e, em alguns casos, tem sido correlacionada com prognóstico sombrio (Jordan *et al.*, 1989; Berrozpe *et al.*, 1990; Presti *et al.*, 1991, Jones *et al.*, 1994, Diebold *et al.*, 1996, Testa *et al.*, 1997). Essa trissomia também é detectada em lesões benignas tais como hiperplasias e adenomas tiroideanas (Gama *et al.*, 1991;

Belge *et al.*, 1998a), pólipos colônicos (Longy *et al.*, 1990), artrite reumatóide (Mertens *et al.*, 1993), esteatose hepática (Bardi *et al.*, 1992), pielonefrite crônica (Elfving *et al.*, 1990) e placas ateroscleróticas (Vanni *et al.*, 1990). Como tem sido observada em células aparentemente normais de vários tecidos (Lee *et al.*, 1987, Heim *et al.*, 1989, Elfving *et al.*, 1990; Knuutila *et al.*, 1995) seu papel no processo neoplásico tem sido questionado.

A maioria dos tumores em que a trissomia 7 é observada como alteração clonal apresenta também outros clones citogeneticamente não relacionados que parecem ser originados de células sem cópias extras do cromossomo 7. Esse mosaicismo sugere policlonalidade e instabilidade genética causada por mutação envolvida na tumorigênese, sendo a trissomia 7 apenas uma alteração neutra que resulta em vantagens proliferativas (Johansson *et al.*, 1993). Outras interpretações referem que essa aneuploidia na verdade está presente em células distintas do parênquima tumoral ou representa um artefato de cultura em decorrência de pressões seletivas das condições *in vitro* (Kovacs & Brusa, 1989; Johansson *et al.*, 1993). Por outro lado, o fato de preparações citogenéticas diretas e núcleos interfásicos submetidos à técnica de hibridização *in situ* fluorescente exibirem essa anomalia torna essa última hipótese pouco provável (Hermann & Lalley, 1992; Emanuel *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1994 e o presente trabalho).

De acordo com Huebner *et al.* (1989), o processo de diferenciação celular é caracterizado por rearranjos genômicos específicos que ativam ou desativam genes envolvidos nesse processo. Segundo essa hipótese, a trissomia 7 poderia representar um rearranjo necessário para a diferenciação de vários tipos celulares. Entretanto, pelo menos no caso da tireóide, esse não parece ser o caso pois

amostras de glândulas normais estudadas pelo presente trabalho não revelaram essa aneussomia.

Em relação à monossomia 17, alguns poucos trabalhos da literatura observaram perda desse cromossomo em carcinomas medulares e foliculares (Wuster-Hill *et al.*, 1986; Teyssier *et al.*, 1990) e em adenomas (Antonini *et al.*, 1993; Belge *et al.*, 1998a) e, mesmo assim, geralmente associada a várias outras alterações numéricas. A sua trissomia bem como a trissomia 10 também é raramente citada e, muitas vezes, em células hiperdiplóides (Gama *et al.*, 1991; Roque *et al.*, 1993; Belge *et al.*, 1998).

O pareamento homólogo do cromossomo 17 em núcleos interfásicos tem sido relatado em tecidos normais de cérebro e de próstata, resultando em um único sinal após a utilização da técnica de FISH e em falsa monossomia (Arnoldus *et al.*, 1991, Brown *et al.*, 1994). Um fenômeno similar pode ter acontecido em alguns dos tumores estudados no presente trabalho. No entanto, durante as análises realizadas, os tamanhos dos sinais observados foram criteriosamente comparados entre si, de modo que os núcleos que apresentavam um único sinal com o dobro do tamanho daqueles observados nas demais células foram considerados diplóides.

O cromossomo 17 apresenta genes supressores de tumor envolvidos no processo neoplásico, tais como o *TP53* (Isobe *et al.*, 1986) e o *BCRA1* (Wertheim *et al.*, 1996). Alterações do gene *TP53* têm sido descritas exclusivamente nas formas indiferenciadas e anaplásicas do câncer tiroideano (Ito *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1992; Donghi *et al.*, 1993; Fagin *et al.*, 1993; Pollina *et al.*, 1996; Nikiforov *et al.*, 1996; Grebe *et al.*, 1997) ou em regiões menos diferenciadas

desses tumores (Nakamura *et al.*, 1992). Essas observações indicam que a expressão da proteína p53 pode ser correlacionada com perda das propriedades de diferenciação do tireócito e comportamento agressivo e invasivo dos carcinomas (Moretti *et al.*, 1997). Em concordância com essa hipótese, nossos resultados mostraram monossomia 17 em apenas dois tumores malignos associados a tiroidite de Hashimoto tumores esses que apresentavam grandes diâmetros ou áreas pobremente diferenciadas e metástases. Aparentemente, uma outra correlação entre os dados citogenéticos e histopatológicos foi observada no grupo das hiperplasias. Entre elas, aquelas com diâmetros menores não exibiram qualquer uma das alterações cariotípicas investigadas, sugerindo a presença de outros eventos nos estágios mais iniciais dessas lesões.

Esses dados mostram que a técnica de FISH pode auxiliar no entendimento do comportamento clínico e biológico das lesões tiroideanas. Além disso, pode também representar uma nova estratégia para o desenvolvimento de novos critérios para diferenciação de nódulos benignos daqueles com potencial maligno e prognóstico sombrio.

V. RESUMO

Os nódulos tiroideanos são frequentes no homem e constituem uma ampla gama de condições que variam desde lesões benignas, como os bócios e adenomas, até tumores malignos incluindo os carcinomas diferenciados e anaplásicos. Em muitos casos, os nódulos neoplásicos são adenomas e, menos frequentemente, são diagnosticados como carcinomas.

Dados recentes sugerem que as lesões tiroideanas não representam entidades independentes mas diferentes etapas de uma sequência histológica – desde células foliculares normais, bócios e adenomas até carcinomas papilares, foliculares ou anaplásicos. De fato, algumas lesões benignas e malignas apresentam as mesmas anomalias citogenéticas que podem desempenhar um importante papel na patogênese dessas lesões.

O presente trabalho analisou núcleos isolados de 20 amostras de tecidos tiroideanos frescos (10 tiróides normais e 10 bócios) e 30 amostras arquivadas em parafina (10 bócios, 10 adenomas, 7 carcinomas papilares e 3 foliculares) utilizando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas centroméricas para os cromossomos 7, 10 e 17.

As análises realizadas mostraram aberrações cromossômicas em 60-70% (6/10 frescos e 7/10 arquivados) dos bócios, em 90% (9/10) dos adenomas e em 100% (10/10) dos carcinomas papilares ou foliculares. Nenhuma alteração foi observada nos tecidos tiroideanos normais analisados. As frequências de aneussomias foram aparentemente similares nas amostras frescas e emblocadas de bócios e menor do que nas neoplasias benignas ou malignas. Esses achados

estão de acordo com a hipótese de que durante o desenvolvimento neoplásico ocorre aumento da instabilidade genética.

Nossos resultados mostraram que 65% (26/40) e 57.5% (23/40) das lesões estudadas apresentaram polissomia 7 e 10, respectivamente. Diferentes genes relacionados com a proliferação ou com a função tiroideana encontram-se mapeados nesses cromossomos. Assim, cópias extras de tais genes podem estar envolvidas no mecanismo das doenças tiroideanas e da transformação maligna estimulando a divisão celular.

A monossomia do cromossomo 17 foi observada em dois carcinomas. O cromossomo 17 apresenta genes supressores de tumor envolvidos no processo neoplásico, tais como o *TP53* e o *BCRA1*. Alterações do gene *TP53* têm sido descritas exclusivamente nas formas indiferenciadas e anaplásicas do câncer tiroideano ou em regiões menos diferenciadas desses tumores. Essas observações indicam que a expressão da proteína p53 pode ser correlacionada com perda das propriedades de diferenciação do tireócito e comportamento agressivo e invasivo dos carcinomas. Em concordância com essa hipótese, nossos resultados mostraram monossomia 17 em apenas dois tumores malignos associados a tiroidite de Hashimoto e exibindo diâmetros grandes ou áreas pobremente diferenciadas e metástases.

Esses dados mostram que a técnica de FISH pode auxiliar no entendimento do comportamento clínico e biológico das lesões tiroideanas. Além disso, pode também representar uma nova estratégia para o desenvolvimento de novos critérios para diferenciação de nódulos benignos daqueles com potencial maligno e prognóstico sombrio.

VI. SUMMARY

Nodules in the thyroid gland are frequent in man and constitute a wide variety of conditions which range from benign lesions as goiters and adenomas to malignant tumors including differentiated and anaplastic carcinomas. In most cases, the neoplastic nodules are adenomas and, less commonly, are diagnosed as carcinomas.

There are recent data suggesting that thyroid lesions do not represent independent entities but different steps of a histologic sequence – from normal follicular cell to goiter or adenoma to follicular or papillary carcinoma to anaplastic carcinoma. In fact, some benign and malignant lesions share the same cytogenetic abnormalities which might play an important role in the pathogenesis of these conditions.

In the present study, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) staining were performed on noncultured samples using biotinylated centromere specific probes for chromosomes 7, 10 and 17 we analyzed formalin-fixed, paraffin-embedded samples from 10 goiters, 10 adenomas, 7 papillary and 3 follicular carcinomas, and fresh samples from 10 goiters and 10 normal thyroid tissues.

Our FISH results showed chromosomal aberrations in 60-70% (6/10 fresh and 7/10) of the goiters, in 90% (9/10) of the adenomas and in 100% (10/10) of the papillary or follicular carcinomas, but no numerical aberration in normal thyroid gland. Aneusomy frequencies were apparently similar in fresh and paraffin embedded goiter samples and lower than in benign or malignant neoplasias. If such neoplastic and nonneoplastic nodules do represent related steps of a

continuous process these findings are in agreement with the notion that, during neoplastic development, genetic instability commonly increases.

Our results revealed that 65% (26/40) and 57.5% (23/40) of thyroid lesions showed polysomy 7 and 10, respectively. Different genes are located on such chromosomes and related to cell proliferation or thyroid function. Thus, extra copies of such genes may be connected with the mechanism of thyroid diseases and with malignant transformation by stimulating cell growth.

A diminished number of signal for chromosome 17 was observed in two carcinomas. Chromosome 17 contains known and suspected tumor suppressor genes that have been implicated in the neoplastic process, including *TP53* and *BRCA1* genes. Alterations of *TP53* gene in thyroid neoplasia have been found almost exclusively in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. These observations indicate that abnormal p53 protein expression may be correlated to the loss of the differentiated properties of the thyrocyte and to high invasive and aggressive behavior of thyroid carcinomas. In agreement with this hypothesis, our results revealed monosomy 17 in only two papillary carcinomas associated with Hashimoto's thyroiditis showing large diameters or poorly differentiated areas and metastasis.

Our findings suggest that FISH analysis may help in the understanding of biological and clinical behaviors of thyroid neoplastic lesions. In addition, it might also be valuable for developing new diagnostic criteria and for differentiating harmless thyroid nodules from those carrying cancerous potential and poor prognosis.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antonini, P.; Vernuat, A.M.; Linares, G.; Gaillou, B.; Berger, R.; Parmentier, C.. A translocation (7;10)(q53;q21) in a differentiated papillary carcinoma of the thyroid, **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 41, p.139-, 1989.
- Antonini, P.; Vernuat, A.M.; Caillou, B.; Schlumberger, M.; Parmentier, C.; Bernheim, A. Cytogenetic studies of 19 cases of thyroid papillary carcinomas. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 5, p. 206-211, 1992.
- Antonini, P.; Levy, N.; Caillou, B.; Vernuat, A.M.; Schlumberger, M.; Parmentier, C.; Bernheim, A.. Numerical aberrations, including trisomy 22 as the sole anomaly, are recurrent in follicular thyroid adenomas. **Gene Chromosom. Cancer**, v. 8, p. 63 – 66, 1993.
- Arnoldus, E.P.J.; Noordermeer, I.A.; Peters, A.C.B.; Raap, A.K.; Van Der Ploeg, M.. Interphase cytogenetics reveals somatic pairing of chromosome 17 centromeres in normal human brain tissue, but no trisomy 7 or sex-chromosome loss. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 56, p. 214-216, 1991.
- Bardi, G.; Hohansson, B.; Pandis, N.; Heim, S.; Mandahl, N.; Hasgerstrand, I.; Holmin, T.; Andrén-Sandberg; Mitelman, F.. Trisomy 7 in nonneoplastic focal steatosis of the liver. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 63, p. 22-24, 1992.
- Baretton, G.B., Valina, C., Vogt, T., Schneiderbanger, K., Diebold, J., Lohrs, U.. Interphase cytogenetic analysis of prostatic carcinomas by use of nonisotopic *in situ* hybridization. **Cancer Res.**, v. 54, p. 4472-4480, 1994.
- Bartnitzke, S.; Hermann, M.E.; Zuschneid, W.; Neuhaus, P.; Bullerdiek, J.. Cytogenetics findings on eight follicular thyroid adenomas including one with a t(10;19). **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 39, p. 65-68. 1989.
- Belge, G.; Thode, B.; Bartnitzke, S.; Bullerdiek, J.. Cytogenetic biclonality corresponding to multiphasic differentiation in an atypical thyroid adenoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 78, p. 102-104, 1994
- Belge, G.; Garcia, E.; De Jong, P.; Bartnitzke, S.; Bullerdie, J.. FISH analyses of a newly established thyroid tumor cell line showing a t(1;19)(p35 or p36.1;q13)

- reveal that the breakpoint lies between 19q13.3-13.4 and 19q13.4. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 69, p. 220-222, 1995
- Belge, G.; Roque, L.; Soares, J.; Bruckmann, S.; Thode, B.; Fonseca, E.; Clode, A.; Bartnitzke, S.; Castedo S.; Bullerdiek, J.. Cytogenetic investigation of 340 thyroid hyperplasias and adenomas revealing correlations between cytogenetic and histology. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 101, p. 42-48, 1998a.
- Belge, G.; Garcia, E.; Rippe, V.; Fusco, A.; Bartnitzke, S.; Bullerdiek, J.. Breakpoints of 19q13 translocations of benign thyroid tumors map within a 400 kilobase region. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 20, p. 201-203, 1998b.
- Bergholom, U.; Bergström, R.; Ekbom, A.. Long term follow-up of patients with medullary carcinoma of the thyroid. **Cancer**, v. 79, p. 132-138, 1997.
- Berrozpe, G.; Miro, R.; Caballin, M.R.; Salvador, J.; Egozcue, J.. Trisomy 7 may be a primary change in non-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 50, p.9-14, 1990.
- Blaugrund, J.E.; Johns, M.M.; Eby, Y.B.; Ball, D.W.; Bayli, S.B.; Hruban, R.H.; Sidrensky, D.. RET proto-oncogene mutations in inherited and sporadic medullary thyroid cancer. **Hum. Molec. Genet.**, v. 3, p. 1895-1897, 1994.
- Bondenson, L.; Bengtsson, A.; Bondenson, A-G; Dahlenfors, R.; Grimelius, L.; Wedel, B.; Mark, J.. Chromosome studies in thyroid neoplasia. **Cancer**, v. 64, p. 680-685, 1989.
- Bongarzone, I.; Pierotti, M.A.; Monzini, N.; Mondellini, P.; Manenti, G.; Donghi, R.; Pilotti, S.; Grieco, M.; Santoro, M.; Fusco, A.. High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. **Oncogene**, v. 4, p. 1457-1462, 1989.
- Bongarzone, I.; Monzini, N.; Borrello, M.G.; Carcano, C.; Ferraresi, G.. Molecular characterization of a thyroid tumour-specific transforming sequence formed by the fusion of ret tyrosine kinase and the regulatory subunit alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase-A. **Mol. Cell Biol.**, v. 13, p. 358-366, 1993.
- Bongarzone, I.; Butti, M.G.; Coronelli, S.; Borrello, M.G.; Mondellini, P.; Pilotti, S.; Fusco, A.; Della Porta, G.; Pierotti, M.A.. Frequent activation of ret

- protooncogene by fusion with a new activating gene in pappillary thyroid carcinomas. **Cancer Res.**, v. 54, p. 2979-2985, 1994.
- Borrello, M.G.; Pelicci, G.; Arighi, E.; De Filippis, L.; Greco, A.; Bongarzone, I.; Rizzetti, M.G.; Pelicci P.G.; Pierotti, M.A.. The oncogenic versions of the RET and Trk tirosine kinases bind Shc and Grb2 adaptor proteins. **Oncogene**, v. 9, p. 1661-68, 1994.
- Borrello, M.G.; Smith, D.P.; Pasini, B.; Bongarzone, I.; Greco, A.; Lorenzo, M.J.; Arighi, E.; Miranda, C.; Eng, C.; Alberti, L.. RET activation by germline MEN2A and MEN 2B mutations. **Oncogene**, v. 11, p. 2419-2427, 1995.
- Bounacer, A.; Wicher, R.; Schlumberger, M.; Sarasin, A.; Suárez H.G.. Oncogenic rearrangements of *ret* proto-oncogene in thyroid tumors induced after exposure to ionizing radiation. **Biochimie**, v. 79, p. 619-623, 1997.
- Bourne, H.R.; Sanders, D.A.; McCormick, F.. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature**, v. 349, p. 117-127, 1991.
- Brown, J.A. Alcaraz, A; Takahashi, S.; Persons, D.L.; Lieber, M.M.; Jenkins, R.B... Chromosomal aneusomies detected by fluorescence *in situ* hybridization analysis in clinically localized prostate carcinoma. **J. Urol.**, v. 152, p. 1157-1162, 1994.
- Bugalho, M.J.; Frade, J.P.; Santos, J.R.; Limbert, E.; Sobrinho, L.. Molecular analysis of the RET proto-oncogene in patients with sporadic medullary thyroid carcinomas: a novel point mutation in the extracellular cysteine-rich domain. **European J. Endocrinol.**, v. 136, p. 423-426, 1997.
- Challeton, C.; Bounacer, A.; Du Villard, J.; De Vathaire, F.; Monier, R.; Schlumberger, M.; Suárez, H.G.. Pattern of *ras* and *gsp* oncogene mutations in radiation-associated human thyroid tumors. **Oncogene**, v. 11, p. 601-603, 1995.
- Cho, K.R. & Vogelstein, B.. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. **Cancer**, v. 70, p. 1727-1731, 1992.
- Cotran, R.S.; Kumar, V.; Robbins, S.L.. **Robbins: pathologic basis of disease**. Ed. 5th., Edt W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pensylvania, p. 1121-1142, 1994.

- Criado, B.; Barros, A.; Suijkerbuijk, R.F.; Weghuis, D.O.; Seruca, R.; Fonseca, E.; Castedo, S.. Detection of numerical alterations for chromosomes 7 and 12 in benign thyroid lesions by *in situ* hybridization. **Am. J. Pathol.**, v. 147, p. 136-144, 1995.
- Dal Cin, P.; Sneyers, W.; Sayed Aly, M.; Segers, A.; Ostijn, F.; Van Damme, B.; Van Den Berghe, H.. Involvement of 19q13 in follicular thyroid adenoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 60, p. 99-101, 1992.
- Diebold, J.; Deisenhofer, I.; Baretton, G.B.; Blasenbre, S.; Suchy, B.; Schneiderbanger, K.; Meier, W.; Haas, C.J.; Lohrs, U.. Interphase cytogenetic analysis of serous ovarian tumors of low malignant potential: comparison with serous cystadenomas and invasive serous carcinomas. **Lab. Invest.**, v. 75, p. 473-485, 1996.
- Donghi, R.; Longoni, A.; Pilotti, S.; Michieli, P.; Della Porta, G.; Pierotti, M.A.. Gene p53 are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 1753-1760, 1993.
- Du Villard, J.A.; Schlumberger, M.; Wicker, R.; Caillou, B.; Rochefort, P.; Feunteun, J.; Monier, R.; Parmentier, C.; Suarez, H.G.. Role of *ras* and *gsp* oncogenes in human epithelial thyroid tumorigenesis. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 18, p. 124-126, 1995.
- Durbec, P.; Marcos-Gutierrez, C.V.; Kilkenny, C.; Grigoriou, M.; Wartiovaara, K.; Suvanto, P.; Smith, D.; Ponder, B.; Costantini, F.; Saarma, M.. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. **Nature**, v. 381, p. 789-793, 1996.
- Eastmond, D.A.; Schuler, M.; Rupa, D.S.. Advantages and limitations of using fluorescence *in situ* hybridization for detection of aneuploidy in interphase human cells. **Mutat. Res.**, v. 348, p. 153-162, 1995.
- Elfving, P.; Aman, P.; Mandahl, N.; Lundgren, R.; Mitelman, F.. Trisomy 7 in nonneoplastic epithelial kidney cells. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 69, p. 90-96, 1990.



- Emanuel, A.; Szucs, S.; Weier, H.G.; Kovacs, G.. Clonal aberrations of chromosomes X, Y, 7 and 10 in normal kidney tissue of patients with renal cell tumors. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 4, p. 75-77, 1992.
- Eng, C.; Smith, D.P.; Mulligan, L.M.; Nagal, M.A.; Healey, C.S.; Ponder, M.A.; Gardner, E.; Scheumann, F.W.; Jackson, C.E.; Tunnacliffe, A.; Ponder B.A.J.. Point mutation within the tyrosine kinase domain of the *ret* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours. **Hum. Molec. Genet.**, v. 3, p. 237-241, 1994.
- Eng, C.; Mulligan, L.M.; Smith, D.P.; Hesley, C.S.; Frilling, A.; Raue, F.; Neumann, H.P.H.; Fagner, R.; Behmel, A.; Lorenzo, M.J.; Stonehouse, T.J.; Ponder, M.A., Ponder, B.A.J.. Mutation of the RET protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 12, p. 209-212, 1995.
- Fagin, J.A.; Matsuo, K.; Karmakar, A.; Chen, D.L.; Tang, S-H; Koeffler, H.P.. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 170-184, 1993.
- Fink, M.; Weinhausel, A.; Niederle, B.; Haas, O.A.. Distinction between sporadic and hereditary medullary thyroid carcinoma (MTC) by mutation analysis of the RET proto-oncogene. **Int. J. Cancer**, v. 69, p. 312-316, 1996.
- Fugazzola, L.; Pierotti, M.A.; Vigano, E.; Pacini, F.; Vorontsova, T.V.; Bongarzone, I.. Molecular and biochemical analysis of RET/PTC4, a novel oncogenic rearrangement between RET and ELE1 genes, in a post-Chernobyl papillary thyroid cancer. **Oncogene**, v. 13, p. 1093-1097, 1996.
- Galanti, M.R.; Sparen, P.; Karlsoon, A.; Grimelius, L.; Ekbom, A.. Is residence in areas of endemic goiter a risk gactor for thyroid cancer? **Int. J. Cancer**, v. 61, p. 615-621, 1995.
- Gama, N.B.; Gama, R.; Thome, J.A.; Tajara, E.H.. Cytogenetic analyses of one multinodular goiter of thyroid. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 55, p. 73-77, 1991.

- Graña, X. & Reddy, P.. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclins dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). **Oncogene**, v. 11, p. 211-219, 1995.
- Grebe, S.K.G.; Mciver, B.; Hay, I.D.; Wu, P., S-C; Maciel, L.M.Z.; Drabkin, H.A.; Goellner, J.R.; Grant, C.S.; Jenkins, R.B.; Eberhart, M.L.. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 3p and 17p without *VHL* or *p53* mutations suggest involvement of unidentified tumor supressor genes in follicular thyroid carcinoma. **J Clin. Endocrinol. Metabolism**, v. 82, p. 3684-3691, 1997.
- Greco, A.; Pierotti, M.A.; Bongarzone, I.; Pagliardini, S.; Lanzi, C.; Della Porta, G.. TRK1-T1 is a novel oncogene formed by the fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. **Oncogene**, v. 7, p. 237-242, 1992.
- Greco, A.; Mariani, C.; Miranda, C.; Lupas, A.; Pagliardini, S.; Pomati, M.; Pierotti, M.A.. The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. **Mol. Cell Biol.**, v. 15, p. 6118-6127, 1995.
- Greco, A.; Villa, R.; Pierotti, M.A.. Genomic organization of the human NTRK1 gene. **Oncogene**, v. 13, p. 2463-2466, 1996.
- Greco, A.; Miranda, C.; Pagliardini, S.; Fusetti, L.; Bongarzone, I.; Pierotti, M.A.. Chromosome 1 rearrangements involving the genes TPR and NTRK1 produce structurally different thyroid-specific TRK oncogene. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 19, p. 112-123, 1997.
- Greco, A.; Fusetti, L.; Miranda, C.; Villa, R.; Zanotti, S.; Pagliardini, S.; Pierotti, M.A.. Role of the TFG N-terminus and coiled-coil domain in the transforming activity of the thyroid TRK-T3 oncogene. **Oncogene**, v. 16, p. 809-816, 1998.
- Grieco, M.; Santoro, M.; Berlingieri, M.T.; Melillo, R.M.; Donghi, R.; Bongarzone, I.; Pierotti, M.A.; Della Porta, A.F.; Vecchio, G.. PTC is a novel rearranged form of the *ret* proto-oncogene and is frequently detected *in vivo* in human thyroid papillary carcinomas. **Cell**, v. 60, p. 557-563, 1990.
- Guyton, A.C. & All, J.. **Tratado de Fisiologia Médica**. Edt Guanabara Koogan S/A, Rio de Janeiro, 1014 p., 1997.

- Hassoun, A.A.K.; Hay, I.D.; Goellner, J.R.; Zimmerman, D.. Insular thyroid carcinoma in adolescents: A potentially lethal endocrine malignancy. **Cancer**, v. 79, p. 1044-1048, 1997.
- Heim, S.; Mandahen, N.; Jin, Y.; Stromblad, S.; Lindstrom, E.; Salford, L.Gl.; Mitelman, F.. Trisomy 7 and sex chromosome loss in human brain tissue. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 52, p. 136-138, 1989.
- Herfarth, K.K.F.; Wick, M.R.; Marshall, H.N.; Gartner, E.; Lum, S.; Moley, J.F.. Absence of *TP53* alterations in pheochromocytomas and medullary thyroid carcinomas. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 20, p. 24-29, 1997.
- Hermann, M.E. & Lalley, P.A.. Significance of trisomy 7 in thyroid tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 62, p. 144-149, 1992.
- Hermann, M.E.; Mohamed, A.; Talpos, G.; Wolman, S.R.. Cytogenetic study of a papillary thyroid carcinoma with a rearranged chromosome 10. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 57, p. 231-236, 1991.
- Hetts, S.W.. To die or not to die-an overview of apoptosis and its role in disease. **JAMA**, v. 274, p. 300-307, 1998.
- Ho, Y.S.; Tseng, S.C.; Chin, T.Y.; Hsieh, L.L.; Lin, J.D.. p53 gene mutation in thyroid carcinoma. **Cancer Lett**, v. 103, p. 57-63, 1996.
- Hosftra, R.M.W.; Landsvater, R.M.; Ceccherini, I.; Stulp, R.P.; Stelwagen, T.; Luo, Y.; Pasini, B.; Hoppener, J.W.M.; Amstel H.K.P.V.; Romeo, G.; Lips, C.J.M.; Buys, C.H.H.C.M.. A mutation in the *ret* proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinomas. **Nature**, v. 367, p. 375-376, 1994.
- Hosftra, R.M.W.; Fattoruso, O.; Quadro, L.; W. Y.; Libroia, A.; Verga, U.; Colantuoni, V.; Buys, C.H.C.M.. A novel point mutation in the intracellular domain of the *ret* protooncogene in a family with medullary thyroid carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metabolism**, v. 82, p. 4176-78, 1997.
- Huebner, K.; Nowell, P.C.; Croce, C.M.. Lineage-specific gene rearrangement/deletion: a nonconservative model. **Cancer Res.**, v. 49, p. 4071-4074, 1989.

- Indo, Y.; Tsuruta, M.; Hayashida, Y.; Karim, M.A.; Ohta, K.; Kawano, T.; Mitsub, U.H.. Mutations in the TRKA/GNDF receptor gene in patients with congenita insensitivity to pain with anhidrosis. **Nat. Genet.**, v. 13, p. 485-488, 1996.
- Ishizaka, Y.; Ito, H.F.; Tahira, T.; Ikeda, I.; Sugimura, T.; Tucker, J.; Fertitta, A.. Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. **Oncogene**, v. 4, p. 1519-1521, 1989.
- Isobe, M.; Emanuel, B.S.; Givol, D.; Oren, M.; Croce, C.M.. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17q13. **Nature**, v. 320, p. 84-85, 1986.
- Ito, T.; Ishizaka, Y.; Tahira, T.; Yamoto, M.; Miya, A.; Imaik, K.; Iachi, A.; Takai, S.; Sugimura, T.; Magao, M.. Identification and analysis of the ret proto-oncogene promoter region in neuroblastoma cell lines and medullary thyroid carcinomas from MEN 2A patients. **Oncogene**, v. 7, p. 1201-1206, 1992.
- Jenkins, R.B.; Hay, I.D.; Herath, J.F.; Schultz, C.G.; Spurbeck, J.L.; Grant, C.S.; Goellner, J.R.; Dewald, G.W.. Frequent occurrence of cytogenetic abnormalities in sporadic nonmedullary thyroid carcinoma. **Cancer**, v. 66, p. 1213-1220, 1990.
- Jing, S.; Wen, D.; Yu, Y.; Holst, P.L.; Luo, Y.; Fang, M.; Tamir, R.; Antonio, L.; Hu, Z.; Cupples, R.; Louis, J.C.; Hu, S.; Altrock, B.W.; Fox, G.M.. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. **Cell**, v. 85, p. 1113-1124, 1996.
- Johansson, B.; Heim, S.; Mandahl, N.; Mertens, F.; Mitelman, F.. Trisomy 7 in nonneoplastic cells. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 6, p. 199-205, 1993.
- Jones, E.; Zhu, X.L.; Rohr, R.; Stephenson, R.A.; Brothman, A. R.. Aneusomy of chromosome 7 and 17 detected by FISH in prostate cancer and the effects of selection *in vitro*. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 11, p. 163-170, 1994.
- Jones, C.J.; Shaw, J.J.; Wyllie, F.S.; Gaillard, N.; Schlumberger, M.; Wynford-Thomaz, D.. High frequency deletion of the tumour suppressor gene P16INK4a(MTS1) in human thyroid cancer cell lines. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 116, p. 115-119, 1996.

- Jordan, D.K.; Patil, S.R.; Divelbiss, J.E.; Vemuganti, S.; Headley, C.; Waziri, M.H.; Gurll, N.J.. Cytogenetic abnormalities in tumors of patients with von Hippel-Lindau disease. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 42, p. 227-241, 1989.
- Klein, R.; Jing, S.Q.; Nanduri, V.; O'rourke, E.; Barbacid, M.. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. **Cell**, v. 65, p. 189-197, 1991.
- Knuutila, S.; Larramendy, M.L. ; Elfving, P. ; El Rifai,W. ; Mitelman, F.. Trisomy 7 in neoplastic tubular epithelial cells of the kidney. **Hum. Genet.**, v. 95, p. 149-156, 1995.
- Kolibaba, K.S. & Druker, B.J.. Protein tyrosine kinases and cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1333, p. 217-248, 1997.
- Komminoth, P. 1997. The *ret* proto-oncogene in medullary and papillary thyroid carcinoma. Molecular features, pathophysiology and clinical implications. **Virchows Arch.**, v. 431, p. 1-9, 1997.
- Kovacs, C. & Brusa, P.. Clonal chromosome aberrations in normal kidney tissue from patients with renal cell carcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 37, p. 289-290, 1989.
- Larsen, P.R.. A tiróide.In: **Cecil-Tratado de medicina Interna**. Edt. 19a., Ed. Guanabara Koogan S/A, rio de Janeiro, p. 1272-1296, 1993.
- Learoyd, D.L.; Marsh, D.J.; Richardson, A-L.. Genetic testing for familial cancer. **Arch. Surg.**, v. 132, p. 1022-25, 1997.
- Lee, J.S.; Pathak, S.; Hopwood, V.; Tomasovi, B.; Mullins, T.D.; Baker, F.L.; Spitzer, G.; Neidhart, J.A.. Involvement of chromosme 7 in primary tumor and nonmalignant normal lung tissue. **Cancer Res.**, v. 47, p. 6349-6352, 1987.
- Lehmann, L.; Greulich, K.M.; Negele, T.; Spelsberg, F.; Bauchinger, M.; Weier, H.U.. Cytogenetic and molecular genetic characterization of a chromosome 2 rearrangement in a case of human papillary thyroid carcinoma with radiation history. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 96, p. 30-36, 1997.
- Lewin, B.. **Gene V**. Ed. 1a,; Edt. Oxford Universitu Press Inc, New York, 1996.



- Longy, M.; Saura, R.; Schouler, L.; Mauhin, C.; Goussot, J.F.; Grison, O.; Couzigou, P.. Chromosomal analysis of colonic adenomatous polyps. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 42, p. 249-257, 1990.
- Marsh, D.J.; Andrew, S.D.; Eng, C.; Learoyd, D.L.; Capes, D.G.; Pojer, R.; Richardson, A-L; Houghton, C.; Mulligan, L.M.; Pnder, D.A.J.; Robison, B.G.. Germiline and somatic mutations in an oncogene: *ret* mutations in inherited medullary thyroid carcinoma. **Cancer Res.**, v. 56, p. 1241-1243, 1996.
- Marshall, G.M.; Peaston, A.E.; Hocker, J.E.; Smith, S.A.; Hanford, L.M.; Tobias, V.; Norris, M.D.; Haber, M.; Smith, D.P.; Lorenzo, M.J.; Ponder, B.A.J.; Hancock, J.F.. Expression of multiple endocrine neoplasia 2B *ret* in neuroblastoma cells alters cell adhesion in vitro, enhances metastatic behavior in vivo, and activates jun kinase. **Cancer Res.**, v. 57, p. 5399-5405, 1997.
- Mertens, F.; Orndal, C.; Mandahl, N.; Heim, S.; Bauer, H.; Rydholm, A.; Tufvesson, A.; Willen, H.; Mitelman, F.. Chromosome aberrations in tenosynovial giant cell tumors and nontumorous synovial tissue. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 6, p. 212-217, 1993.
- Miyajima, N.; Horiuchi, R.; Shibuya, Y.; Fukushige, S.; Matsubara, K.; Toyoshima, K.; Yamamoto, T. Two *erbA* homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite strands of the same genetic locus. **Cell**, v. 57, p. 31-39, 1989.
- Mizumo, T.; Kyoizumi, S.; Suzuki, T.; Iwamoto, K.S.; Seyama, T.. Continued expression of a tissue specific activated oncogene in the early steps of radiation-induced human thyroid carcinogenesis. **Oncogene**, v. 15, p. 1455-1460, 1997.
- Moley, J.F.. The molecular genetics of multiple endocrine neoplasia type 2A and related syndromes. **Annu. Ver. Med.**, v. 48, p. 409-420, 1997.
- Moretti, F.; Farsetti, A.; Soddu, S.; Misiti, S.; Crescenzi, M.; Filetti, S.; Andreoli, M.; Sacchi, A.; Pontecorvi, A.. p53 re-expression inhibits proliferation and restores differentiation of human thyroid anaplastic carcinoma cells. **Oncogene**, v. 14, p. 729-740, 1997.

- Mulligan, L.M.; Eng, C.; Healey, C.S.; Clayton, D.; Kwok, J.B.; Gardner, E.; Ponder, M.A.; Frilling, A.; Jackson, C.E.; Lehnert, H.. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. **Nat. Genet.**, v. 6, p. 70-74, 1994.
- Myers, S.M.; Eng, C.; Ponder, B.A.J.; Mulligan, L.M.. Characterization of *ret* proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. **Oncogene**, v. 11, p. 2039-45, 1995.
- Nagataki, S.; Ashizawa, K.; Yamashita, S.. Cause of childhood thyroid cancer after the Chernobyl accident. **Thyroid**, v. 8, p. 115-117, 1998.
- Nakamura, T.; Yana, I.; Kobayashi, T.; Shin, E.; Karakawa, K.; Fujita, S.; Miya, A.; Mori, T.; Nishiho, I.; Takai, S-I. p53 gene mutations associated with anaplastic transformation of human thyroid carcinomas. **Jnp. J. Cancer Res.**, v. 83, p. 1293-1298, 1992.
- Nikifirov, Y.E.; Nikiforova, M.N.; Gnepp, D.R.; Fagin, J.A.. Prevalence of mutations of ras and p53 in benign and malignant thyroid tumors from children exposed to radiation after the Chernobyl nuclear accident. **Oncogene**, v. 13, p. 687-693, 1996.
- Nikifirov, Y.E.; Rowland, J.M.; Bove, K.E.; Monforte-Munoz, H.; Fagin, J.A.. Distinct pattern of *ret* oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. **Cancer Res.**, v. 57, p. 1690-1694, 1997.
- Olah, E.; Balogh, E.; Bojan, F.; Juhasz, F.; Stenszky, V.; Farid, N.R.. Cytogenetic analysis of three papillary carcinomas and a follicular adenoma of the thyroid. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 44, p. 119-129, 1990.
- Oyama, T.; Suzuki, T.; Hara, F.; Lino, Y.; Ishida, T.; Sakamoto, A.; Nakajima, T.. *N-ras* mutation of thyroid tumor with special reference to the follicular type. **Pathol. Int.**, v. 45, p. 45-50, 1995.
- Pasini, A.; Genest, O.; Legrand, P.; Schlumberger, M.; Rossel, M.; Fournier, L.; Rudkin, B.B.; Schuffenecker, I.; Lenoir, G.M.; Billaud, M.. Oncogenic activation of *ret* by two distinct *FMTC* mutations affecting the tyrosine kinase domain. **Oncogene**, v. 15, p. 393-402, 1997.

- Pierotti, M.A.; Santoro, M.; Jenkins, R.B.; Sozzi, G.; Bongarzone, I.; Grieco, M.; Monzini, N.; Miozzo, M.; Hermann, M.A.; Fusco, A.; Hay, I.D.; Della-Porta, G.; Vecchio, G.. Characterization of an inversion on the arm long of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and *RET* and creating the oncogenic sequence *RET/PTC*. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 89, p. 1616-1620, 1992.
- Pierotti, M.A.; Bongarzone, I.; Borrello, M.G.; Greco, A.; Pilotti, S.; Sozzi, G.. Cytogenetics and molecular genetics of carcinomas arising from thyroid epithelial follicular cells. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 16, p. 1-14, 1996.
- Pisarchik, A. V.; Ermak, G.; Fomicheva, V.; Kartel, N.A.; Figge, J.. The *ret/PTC1* rearrangement is a common feature of Chernobyl-associated papillary thyroid carcinomas from Belarus. **Thyroid**, v. 8, p. 133-139, 1998.
- Pollina, L.; Pacini, F.; Fontanini, G.; Vignati, S.; Bevilacqua, G.; Basolo, F.. *bcl-2*, *p53* and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. **Br. J. Cancer**, v. 73, p. 139-143, 1996.
- Ponder, B.A. & Smith, D.. The MEN II syndromes and the role of the *ret* proto-oncogene. **Adv. Cancer Res.**, v. 70, p. 180-222, 1996.
- Presti, J.C.; Rao, P.H.; Chen, Q.; Reuter, V.E.; Li, F.P.; Fair, W.R.; Jhanwar, S.C.. Histopathological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors. **Cancer Res.**, v. 51, p. 1544-1552, 1991.
- Robertson, K.; Mason, I.; Hall, S.. Hirschsprung's disease: genetic mutations in mice and men. **Gut**, v. 41, p. 436-441, 1997.
- Rochefort, P.; Caillou, B.; Michiels, F.M.; Ledent, C.; Talbot, M.; Schlumberger, M.; Lavelle, F.; Monier, R.; Feuteun, J.. Thyroid pathologies in transgenic mice expressing a human activated *ras* gene driven by a thyroglobulin promoter. **Oncogene**, v. 12, p. 111-118, 1996.
- Romano, M.I.; Grattone, M.; Karner, M.P.; Moiguer, S.; Tetelbaum, F.; Romano, L.A.; Illescas, E.; Padin, R.; Cueva, F.; Burdman, J.A.. Relationship between the level of *c-myc* mRNA and histologic aggressiveness in thyroid tumors. **Horm. Res.**, v. 39, p. 161-165, 1993.

- Roque, L.; Castedo, S.; Gomes, P.; Soares, P.; Clode, A.; Soares, J.. Cytogenetic findings in 18 follicular thyroid adenomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 67, p.1-6, 1993a.
- Roque, L.; Soares, P.; Correia, C.; Carredo, C.; Clode, A.; Castedo, S.; Soares, J.. Thyroid nodular hyperplasia:chromosomal studies in 14 cases. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 69, p. 31-37, 1993b.
- Roque, L.; Castedo, S.; Clode, A. ; Soares, J.. Deletion of 3p25->pter in a primary follicular thyroid carcinoma and its metastasis. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 8, p. 199-203, 1993c.
- Roque, L.; Clode, A.L.; Gomes, A.L.; Santos-Rosa, J.; Soares J.; Castedo, S.. Cytogenetic findings in 31 papillary thyroid carcinomas. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 23, p. 157-162, 1995.
- Roque, L.; Clode, A.; Belge, G.; Pinto, A.; Bartnitzke, S.; Santos, J.R.; Thode, B.; Bullerdiek, J.; Castedo, S.; Soares, J.. Follicular thyroid carcinoma: chromosome analysis of 19 cases. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 21, p. 250-255, 1998.
- Rozengurt, E.; Smith-Sinnett, J.; Va-Lint, J.; Valverde, A.M.. Protein kinase D(PKD): a novel target for dicyaglycerol and phorbol esters. **Mutat. Res.**, v. 333, p. 153-160, 1995.
- Russo, D.; Arturi, F.; Schlumberger, M.; Caillou, B.; Monier, R.; Filetti, S.; Suárez, H.G.. Activating mutations of the TSH receptor in differentiated thyroid carcinomas. **Oncogene**, v. 11, p. 1907-1911, 1995.
- Russo, D.; Tumino, S.; Anturi, F.; Vigneri, P.; Grasso G.; Pntecorvi, A.; Filetti, S.; Belfiore, A.. Detection of an activating mutation of the thyrotropin receptor in a case of an autonomously hyperfunctioning thyroyd insular carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metabolism**, v. 82, p. 735-738, 1997.
- Serrano, M.; Hannon, G.J.; Beach, D.. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, v. 366, p. 704-707, 1993.
- Sherr, C.J.. G1 phase progression: cycling on cue. **Cell**, v. 79, p. 551-555, 1994.

- Shi, Y.; Zou, M.; Farid, N.R.. Evidence of gene deletion of p21 (WAF1/CIP1), a cyclin-dependent protein kinase inhibitor, in thyroid carcinomas. **Br. J. Cancer**, v. 74, p. 1336-1341, 1996.
- Simpson, N.E. & Cann, H.M.. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 10. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 58, p. 428-458, 1991.
- Sozzi, G.; Bongarzone, I.; Miozzo, M.; Cariani, C.T.; Mondellini, P.; Calderone, C.; Pilotti, M.A.; Della Porta, G.. Cytogenetic and molecular genetic characterization of papillary thyroid carcinomas. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 5, p. 212-218, 1992.
- Sozzi, G.; Bongarzone, I.; Miozzo, M.G.; Borello, M.G.; Butti, M.G.; Pilotti, S.; Della-Porta, G.; Pierotti, M.A.. A t(10;17) translocation creates the RET/PTC2 chimeric transforming sequence in papillary thyroid carcinoma. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 9, p. 244-250, 1994.
- Spambalg, D.; Sharifi, N.; Elisei, R.; Gross, J.L.; Medeiros-Neto, G.; Fagin, J.A.. Structural studies of the thyrotropin receptor and Gs alpha in human thyroid cancer. **J. Clin. Endocrinol. Metabolism**, v. 81, p. 3898-3901, 1996.
- Tahira, T.; Ishizaka, Y.; Itoh, F.; Sugimura, T.; Nagao, M.. Characterization of *ret* proto-oncogenes mRNAs encoding two isoforms of the protein product in human neuroblastoma cell line. **Oncogene**, v. 5, p. 97-102, 1990.
- Takahashi, M.; Buma, Y.; Iwamoto, T.; Inaguma, Y.; Ikeda, H. Hiai H.. Cloning and expression of the *ret* proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. **Oncogene**, v. 3, p. 571-578, 1988.
- Takahashi, M.; Asai, N.; Iwashita, T.; Isomura, T.; Miyazaki, K.; Matsuyama, M.. Characterization of the *ret* proto-oncogene products expressed in mouse L cells. **Oncogene**, v. 8, p. 2925-2929, 1993.
- Testa, J.R.; Liu, Z.; Feder, M.; Bell, D.W.; Balsara, B.; Cheng, J.Q.; Taguchi, T.. Advances in the analysis of chromosomes alterations in human lung carcinomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 95, p. 20-32, 1997.
- Teyssier, J.R.; Liautaud-Roger, F.; Ferre, D.; Patey, M.; Duffer, J.. Chromosomal changes in thyroid tumors. Relation with DNA content, karyotypic features and clinical data. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 50, p. 249-263, 1990.

- Tsui, L.C.; Donis-Keller, H.; Grzeschil, K.H.. Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 7 Mapping 1994. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 71, p. 2-21, 1995.
- Tung, W.S.; Shevlin, D.W.; Kaleem, Z.; Tribune, D.J.; Wells, S.A.Jr.; Goodfellow, P.J.. Allelotype of follicular thyroid carcinomas reveals genetic instability consistent with frequent nondisjunctional chromosomal loss. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 19, p. 43-51, 1997.
- Uyttersprot, N.; Allgeier, A.; Baptist, M.; Christophe, F.; Coppee, M.; Coulonval, K.; Depoortere, F.; Dremier, F.; Lamy, C.; Ledent, C.; Maenhaut, C.; Miot, F.; Panneels, V.; Parma, J.; Parmentier, M.; Pirson, I.; Pohl, V.; Roger, P.; Savanot, V.; Taton, M.; Tonacchera, M.; Van Sande, J.; Wilkin, F.; Vassart, G.; Dumont, J.E.. The cAMP in thyroid. **Signal Transduction in Health and Disease, Advances in Second Messenger and Phosphoprotein**, 31, Edt Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997.
- Valent, A. & Bernheim, A.. Mapping of the tyrosine kinase receptors trkA (NTRK1), trkB (NTRK2) and trkC (NTRK3) to human chromosomes 1q22, 9q22 and 15q25 by fluorescence in situ hybridization. **Eur. J. Human. Genet.**, v. 5, p. 102-104, 1997.
- Van den Berge, H.; Ooterhuis, W.; Jong, B.; Brust, J.; Vos, A.; Dam, A.; Vermey, B.. Cytogenetics of thyroid follicular adenomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 44, p. 217-222, 1990.
- Vanni, R.; Cossu, L.; Lecheri, S.. Atherosclerotic plaque as a benign tumor? **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 47, p. 273-274, 1990.
- Wajjwalku, W.; Nakamura, S.; Hasegawa, Y.; Miyazke, K.; Satoh, Y.; Funahashi, H.; Matsuyama, M.; Takahashi, M.. Low frequency of rearrangements if the *ret* and *trk* proto-oncogenes in japanese thyroid papillary carcinomas. **Jnp. J. Cancer Res.**, v. 83, p. 671-675, 1992.
- Wang, X.W. & Harris, C.C.. It p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. **J. Cellular Physiol.**, v. 173, p. 247-255, 1997.

- Wartofsky, L. & Ingbar, S.H.. Diseases of thyroid. In: **Harrisons principles of internal medicine**. Edt Wilson JD, Ed 12a., New York, Mcgraw-Hill Inc, p 1692-1712, 1991.
- Wells, S.A.Jr & Skinner, M.A.. Prophylactic thyroidectomy, based on direct genetic testing in patients at risk for the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v. 106, p. 29-34, 1998.
- Wertheim, I.; Tangir, J.; Welch, W.R.; Berkowitz, R.S.; Chen, W.Y.; Mok, S.C.. Loss of heterozygosity of chromosome 17 in human bordeline and invasive epithelial ovarian tumors. **Oncogene**, v. 1, p. 2147-2153, 1996.
- Williams, E.D.. Mechanisms and pathogenesis of thyroid cancer in animals and man. **Mutat. Res.**, v. 333, p. 123-129, 1995.
- Wirtschafter, A.; Schimdt, R.; Rosen, D.; Kund, N.; Santoro, M.; Fusco, A.; Mulhaupt, H.; Atkins, J.P.; Rosen, M.R.; Keane, W.M.; Rothstein, J.L.. Expression of the *RET/PTC* fusion gene as a marker for papillary carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. **The Laryngoscope**, v. 107, p. 95-100, 1997.
- Woeber, K.A.. Iodine and thyroid disease. **Medical Clin. N. America**, v. 75, p. 169-178, 1991.
- Wuster-Hill, D.H.; Noll, W.W.; Bircher, L.Y.; Pettengill, O.S.; Grizzle, W.A.. Cytogenetics of medullary carcinoma of the thyroid. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 20, p. 247-253, 1986.
- Wynford-Thomas, D.. Molecular genetics of thyroid cancer. **Trends Endocrinol. Metabolism.**, v. 4, p. 224-232, 1993.
- Wynford-Thomas, D.. Origin and progression of thyroid epithelial tumours: cellular and molecular mechanisms. **Horm. Res.**, v. 4, p. 145-157, 1997.
- Wynford-Thomas, D. & Blaydes, J.. The influence of cell context on the seletion pressure for p53 mutation in human cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 29-36, 1998.
- Yane, K.; Konishi, N.; Kitahori, Y.; Naito, H.; Okaichi, K.; Ohnishi, T.; Miyahara, H.; Matsunaga, T.; Hiasa, Y.. Lack of p16/CDKN2 alterations in thyroid carcinomas. **Cancer lett**, v. 101, p. 85-92, 1996.

- Zhang, J.S.; Nelson, M.; Mciver, B.; Goellner, J.R.; Grat, C.S.; Eberhardt, N.L.; Smith, D.I.. Differential loss of heterozygosity at 7q31.2 in follicular and papillary thyroid tumors. **Oncogene**, v. 17, p. 789-793, 1998.
- Zou, M.; Shi, Y.; Farid, N.R.. Low rate of *ret* proto-oncogene activation (ptc/ret tpc) in papillary thyroid carcinomas from Saudi Arabia. **Cancer**, v. 73, p. 176-180, 1994.



