

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Caracterização molecular e funcional de variantes genéticas
em factores de transcrição da tiróide
em formas familiares de cancro da tiróide**

Joana Gomes da Silva

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Caracterização molecular e funcional de variantes genéticas
em factores de transcrição da tiróide
em formas familiares de cancro da tiróide**

Joana Gomes da Silva

DISSERTAÇÃO ORIENTADA POR:
DOUTORA BRANCA CAVACO
PROFESSOR DOUTOR OCTÁVIO PAULO

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2011

AGRADECIMENTOS

No final deste trabalho, quero agradecer a todas as pessoas que foram importantes para a sua concretização e, sem as quais, não seria possível realizá-lo.

À minha orientadora Doutora Branca Cavaco e ao Doutor Valeriano Leite pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Endocrinologia Molecular do Centro de Investigação e Patobiologia Molecular do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (CIPM/IPOLFG), neste projecto que me permitiu aprender imenso e onde pude desenvolver o gosto pela ciência. Em especial à Doutora Branca Cavaco pelo apoio e acompanhamento indispensável à concretização deste trabalho, pela sua disponibilidade e pelo seu incentivo imprescindíveis.

Ao meu orientador Professor Doutor Octávio Paulo, por ter aceite contribuir para a minha orientação neste trabalho.

Às famílias que se disponibilizaram a participar neste estudo. Sem elas, este trabalho não se teria realizado.

Aos meus colegas de grupo, Ana Luísa Silva, Jaime Pita, Margarida Moura, Rita Domingues e Rute Tomaz por todo o apoio que me deram durante este ano, pelo companheirismo e por me terem ajudado sempre que precisei. Em especial à Rute, por toda a motivação e optimismo e pela paciência com que transmitiste todo o teu conhecimento. Foste a minha “madrinha do lab”. Thank you VERY MUCH!

Ao Francisco e à Leonor pela ajuda e pelas idas ao FACS.

À equipa do “tupperware”, pelas nossas alegres horas de almoço. Aos restantes membros do CIPM que, directa ou indirectamente, me ajudaram e me apoiaram.

Aos meus amigos da faculdade, pelo apoio e carinho, pelas palavras encorajadoras e por tornarem os últimos 5 anos espectaculares e cheios de boas recordações. Obrigada às “tontas” pelos “encontros mensais” para reabastecimento de energias. Em especial à Andreia, à Inês e à Patrícia pelos desabafos que ouviram e leram nos momentos em que mais precisei. À minha madrinha, pela preciosa ajuda, principalmente no primeiro ano da faculdade.

À minha “mana” Susana por ... ser isso mesmo.

Aos meus pais, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse chegar onde cheguei, por me acompanharem sempre e por me apoiarem incondicionalmente em todas as minhas decisões. Aos meus irmãos, pelo amor e carinho que me transmitiram. Em especial à minha irmã, por estar sempre presente, mesmo a 8000 km de distância. Ao Telmo, pela preciosa ajuda na formatação da tese.

Quero dedicar esta tese ao meu tio Zé e às minhas primas Júlia e Luísa.

SUMÁRIO

As formas familiares de carcinomas não-medulares da tiróide (*Familial Nonmedullary Thyroid Carcinomas* – FNMTTC) representam cerca de 5% de todos os casos de cancro da tiróide. Estudos de *linkage*, que abrangeram todo o genoma, em famílias com FNMTTC, permitiram o mapeamento de 7 regiões cromossómicas de susceptibilidade, não tendo ainda sido identificados os genes responsáveis.

Genes que codificam factores de transcrição, envolvidos na diferenciação celular durante a embriogénese, quando desregulados podem contribuir para a tumorigénese. Os factores de transcrição NKX2-1, FOXE1, HHEX e PAX8 desempenham um papel crítico na morfogénese da tiróide e na manutenção da diferenciação da tiróide. Estudos de associação demonstraram correlações entre polimorfismos dos genes *NKX2-1* e *FOXE1* e o risco para o cancro da tiróide esporádico. Recentemente, foi identificada uma mutação germinal no gene *NKX2-1*, em duas famílias com FNMTTC, constituindo a primeira evidência do envolvimento deste gene no cancro da tiróide familiar.

Este projecto teve como objectivo o estudo do envolvimento dos factores de transcrição da tiróide em FNMTTC.

Procedeu-se à pesquisa de variantes genéticas nos genes *NKX2-1*, *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8*, através da sequenciação do DNA constitucional dos probandos de 60 famílias com FNMTTC. Nesta série, foram identificadas 15 variantes nos genes *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8*. Duas destas variantes, identificadas nos genes *FOXE1* (c.743C>G, p.A248G) e *HHEX* (c.361G>A, p.G121S), não foram descritas na literatura ou em bases de dados de variantes genéticas. Estas variantes segregavam com a doença nas famílias e afectavam resíduos de aminoácidos conservados na evolução, sugerindo que seriam patogénicas.

Estudos *in vitro* demonstraram que a variante p.A248G do gene *FOXE1* promovia a proliferação e a migração celular, em clones de células PCCL3. Estudos *in silico* da variante p.G121S do gene *HHEX* previram a abolição do *donor splice site*, que poderá alterar o mecanismo de *splicing*.

Neste estudo, foram identificadas duas variantes genéticas possivelmente patogénicas nos genes *FOXE1* e *HHEX*, que poderão constituir a primeira evidência do envolvimento destes factores de transcrição na susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar.

Palavras-Chave: tiróide, cancro, FNMTTC, NKX2-1, FOXE1, HHEX, PAX8, variante.

ABSTRACT

The familial forms of nonmedullary thyroid carcinomas (FNMTC) represent about 5% of all cases of thyroid cancer. Genome-wide linkage analyses in families with FNMTC have already mapped 7 chromosomal regions of susceptibility, although the causative genes have not yet been identified.

Genes encoding transcription factors involved in cell differentiation during embryogenesis, when deregulated, can contribute to tumorigenesis. The transcription factors NKX2-1, FOXE1, HHEX and PAX8 have a critical role in thyroid morphogenesis and in maintenance of the thyroid differentiation. Association studies have shown a correlation between *NKX2-1* and *FOXE1* polymorphisms and the risk to develop sporadic thyroid cancer. Recently, a germline mutation in the *NKX2-1* gene was identified in two families with FNMTC, representing the first evidence for the involvement of this gene in the susceptibility to familial thyroid cancer.

The aim of this project was to study the involvement of thyroid specific transcription factors in FNMTC.

We searched for molecular changes, in genes that encode the transcription factors NKX2-1, FOXE1, HHEX and PAX8, in 60 probands from Portuguese families with FNMTC. We identified 15 variants in the *FOXE1*, *HHEX* and *PAX8* genes. Two of these variants, identified in *FOXE1* (c.743C>G, p.A248G) and *HHEX* (c.361G>A, p.G121S), were not described in the literature or in genetic variants databases. These variants segregated with disease in the families and involved amino acid residues conserved in evolution, suggesting that they were pathogenic.

Functional *in vitro* assays showed that the variant p.A248G in the *FOXE1* gene was able to promote cellular proliferation and migration, in PCCL3 clones. *In silico* studies of variant p.G121S in the *HHEX* gene predicted the abolition of a donor splice site, which may affect the mechanism of splicing.

In this project, two possibly pathogenic variants were identified in the *FOXE1* and *HHEX* genes, which may represent the first evidence of the involvement of these transcription factors in the susceptibility to familial thyroid cancer.

Key Words: thyroid, cancer, FNMTC, NKX2-1, FOXE1, HHEX, PAX8, variant.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iii
SUMÁRIO.....	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS.....	x
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E CONVENÇÕES	xi
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Tumorigénese	1
1.1 Genes supressores de tumor e oncogenes.....	2
2. Novas tecnologias no estudo do cancro	3
3. A Glândula Tiroideia.....	4
3.1 Neoplasias da tiróide.....	5
4. Formas familiares de NMTC (FNMTC)	10
4.1. Síndromes neoplásicas hereditárias	10
4.2. Aspectos clínicos do FNMTC	11
4.3. Aspectos genético-moleculares do FNMTC	12
5. Factores de transcrição na tiróide	13
5.1 Factor de transcrição NKX2-1	15
5.2 Factor de transcrição FOXE1	16
5.3 Factor de transcrição PAX8	19
5.4 Factor de transcrição HHEX.....	20
5.5 Interações entre os factores de transcrição da tiróide	22
II. OBJECTIVOS	24
III. MATERIAIS E MÉTODOS	25
1. Amostras Biológicas.....	25
2. Extracção de DNA a partir de sangue periférico.....	26
3. Extracção de DNA a partir de saliva	26
4. Extracção de RNA.....	27
4.1. Extracção de RNA de células PCCL3	27
5. Quantificação espectrofotométrica do DNA e RNA.....	28
6. Amplificação de DNA por PCR	29
7. Transcrição reversa do RNA seguida de PCR (RT-PCR)	30
8. Electroforese dos produtos de PCR em gel de agarose	31

9. PCR quantitativo em tempo real.....	31
10. Sequenciação automática	33
10.1. Purificação dos produtos de PCR	34
10.2. Reacções de Sequenciação.....	34
10.3. Precipitação dos produtos de sequenciação	35
10.4. Análise dos produtos de sequenciação por electroforese capilar	35
11. Análise de sequências de microsatélites por electroforese capilar.....	36
12. Vectores recombinantes.....	37
12.1. Preparação do plasmídeo pcDNA3-FOXE1-14Ala e 16Ala	37
12.2. Preparação do plasmídeo pcDNA3-FOXE1-16Ala-A248G	37
12.3. Transformação de bactérias quimicamente competentes.....	38
12.4. Preparação de DNA plasmídico em larga escala (Maxiprep)	38
13. Cultura Celular	39
13.1. Descongelação de células	40
13.2. Propagação e expansão de células.....	40
13.3. Contagem de células	41
13.4. Criopreservação de células.....	41
13.5. Optimização das condições de transfecção das células PCCL3	41
13.6. Estabelecimento de <i>pools</i> e clones de células PCCL3 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3	42
13.7. Isolamento dos clones de células PCCL3 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3	43
14. Ensaio de Proliferação Celular	43
14.1. Contagem directa em hemocítmetro.....	43
14.2. Ensaio com BrdU	44
15. Ensaio de Viabilidade Celular.....	45
16. Ensaio de <i>Wound Healing</i>	45
17. Análise Estatística	46
IV. RESULTADOS	47
1. Caracterização fenotípica das famílias com FNMTC	47
2. Identificação de variantes genéticas nos genes <i>NKX2-1</i> , <i>FOXE1</i> , <i>HHEX</i> e <i>PAX8</i> em famílias com FNMTC	47
2.1. Polimorfismos nos genes <i>FOXE1</i> , <i>HHEX</i> e <i>PAX8</i>	47
2.2. Variantes raras nos genes <i>FOXE1</i> , <i>HHEX</i> e <i>PAX8</i>	49
3. Estudos funcionais da variante p.A248G do gene <i>FOXE1</i>	56
3.1. Optimização da confluência celular	56

3.2. Determinação da curva dose-resposta à geneticina.....	57
3.3. Optimização das condições de transfecção de células PCCL3	57
3.4. Preparação de <i>pools</i> de células PCCL3 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3	58
3.5. Isolamento de clones de células PCCL3 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3	59
3.6. Ensaio de Proliferação Celular	59
3.7. Ensaio de Viabilidade Celular.....	61
3.8. Ensaio de <i>Wound Healing</i>	62
3.9. Estudo do nível de expressão do gene <i>FOXE1</i> nas <i>pools</i> e clones com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3.....	64
V. DISCUSSÃO	66
VI. CONCLUSÃO.....	73
VII. BIBLIOGRAFIA	74
VIII. ANEXOS	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS CAPACIDADES ADQUIRIDAS DO CANCRO	1
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA UTILIZAÇÃO DE <i>CHIP</i> DE SNPs	4
FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO DA TIRÓIDE	4
FIGURA 4 - CLASSIFICAÇÃO DOS CARCINOMAS DA TIRÓIDE DERIVADOS DAS CÉLULAS FOLICULARES.	6
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROGRESSÃO ENTRE OS CARCINOMAS DA TIRÓIDE....	10
FIGURA 6 - IMAGEM REPRESENTATIVA DA SÍNTESE DAS HORMONAS T3 E T4	14
FIGURA 7 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS DOMÍNIOS FUNCIONAIS DA PROTEÍNA NKX2-1 HUMANA	15
FIGURA 8 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS DOMÍNIOS FUNCIONAIS DA PROTEÍNA FOXE1 HUMANA.....	16
FIGURA 9 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS DOMÍNIOS FUNCIONAIS DA PROTEÍNA PAX8 HUMANA	19
FIGURA 10 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS DOMÍNIOS FUNCIONAIS DA PROTEÍNA HHEX HUMANA.....	21
FIGURA 11 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA INTERACÇÃO ENTRE OS FACTORES DE TRANSCRIÇÃO.....	23
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA <i>SYBR GREEN</i>	32
FIGURA 13 - IMAGEM DO PLASMÍDEO pCDNA3	37
FIGURA 14 - DESENHO ILUSTRATIVO DO ISOLAMENTO DE CLONES EM PLACAS DE 60 MM.....	43
FIGURA 15 - DESENHO ILUSTRATIVO DAS PLACAS DE 35 MM, USADAS PARA O ENSAIO DE <i>WOUND HEALING</i>	45
FIGURA 16 - SEQUENCIAÇÃO DO EXÃO 1 DO GENE <i>FOXE1</i> NUM CONTROLO NORMAL E NO CASO ÍNDEX DA FAMÍLIA 25, PORTADOR DE UMA VARIANTE C.743 C>G.	51
FIGURA 17 - ÁRVORE GENEALÓGICA DA FAMÍLIA 25. RESULTADO DO ESTUDO DE SEGREGAÇÃO DE MARCADORES POLIMÓRFICOS DO LOCUS <i>FOXE1</i>	52
FIGURA 18 - ÁRVORE GENEALÓGICA DA FAMÍLIA 25A. RESULTADO DO ESTUDO DA SEGREGAÇÃO DE MARCADORES POLIMÓRFICOS DO LOCUS <i>FOXE1</i>	53
FIGURA 19 - SEQUENCIAÇÃO DO EXÃO 1 DO GENE <i>HHEX</i> NUM CONTROLO NORMAL E NO CASO ÍNDEX DA FAMÍLIA 55, PORTADOR DE UMA VARIANTE C.361 G>A.....	54
FIGURA 20 - ÁRVORE GENEALÓGICA DA FAMÍLIA 55.	55
FIGURA 21 - ESTUDO DA CONFLUÊNCIA CELULAR NUM PERÍODO DE 4 DIAS (24-96H), UTILIZANDO VÁRIAS QUANTIDADES INICIAIS DE CÉLULAS PCCL3.	56
FIGURA 22 - CURVA DOSE-RESPOSTA À GENETICINA DE CÉLULAS PCCL3, NUM PERÍODO DE 10 DIAS.	57
FIGURA 23 - EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO, APÓS 48H, PARA DIFERENTES QUANTIDADES DE PLASMÍDEO E DIFERENTES PROPORÇÕES DE LIPOFECTAMINA: PLASMÍDEO, DETERMINADA POR FACS. .	58
FIGURA 24 - EFEITO DA VARIANTE P.A248G NO GENE <i>FOXE1</i> NA PROLIFERAÇÃO CELULAR.	60
FIGURA 25 - EFEITO DA VARIANTE P.A248G NO GENE <i>FOXE1</i> NA PROLIFERAÇÃO CELULAR.	61
FIGURA 26 - EFEITO DA VARIANTE P.A248G NO GENE <i>FOXE1</i> NA VIABILIDADE CELULAR.....	62
FIGURA 27 - EFEITO DA VARIANTE P.A248G NO GENE <i>FOXE1</i> NA MIGRAÇÃO CELULAR.	63
FIGURA 28 - MIGRAÇÃO CELULAR (<i>IN VITRO</i>) DOS CLONES pCDNA3 #1, 14WT #2, 16 WT #2 E 16 MUT #9 APÓS A REALIZAÇÃO DA LESÃO (TEMPO 0) E ÀS 54H (FORMAÇÃO DA MONOCAMADA NO CLONE 16 MUT #9).....	64
FIGURA 29 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO RELATIVOS DO GENE <i>FOXE1</i> HUMANO EM <i>POOLS</i> E CLONES COM EXPRESSÃO ESTÁVEL DE DIFERENTES PLASMÍDEOS, CONTENDO O GENE <i>FOXE1</i> HUMANO. 65	
FIGURA I – ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PRÓXIMAS DO CODÃO 248 NA PROTEÍNA FOXE1 NAS ESPÉCIES <i>HOMO SAPIENS SAPIENS</i> (A), <i>MUS MULUSCUS</i> (B), <i>RATTUS NORVEGICUS</i> (C), <i>SUS SCROFA</i> (D) E <i>BOS TAURUS</i> (E), OBTIDO COM O SOFTWARE CLUSTALW2.	84
FIGURA II – ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PRÓXIMAS DO CODÃO 121 NA PROTEÍNA HHEX EM VÁRIAS ESPÉCIES, OBTIDO COM O SOFTWARE POLYPHEN	84

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – SÍNDROMES HEREDITÁRIAS COM MANIFESTAÇÃO DE TUMORES NA TIRÓIDE (NMTC)	11
QUADRO 2 - QUANTIDADES DE <i>BIG DYE</i> UTILIZADAS NA REACÇÃO DE SEQUENCIAÇÃO, DEPENDENDO DO TAMANHO DO PRODUTO DE PCR.	34
QUADRO 3 – CONDIÇÕES PARA OPTIMIZAÇÃO DA TRANSFECCÃO DE CÉLULAS PCCL3.....	42
QUADRO 4 – VARIANTES GENÉTICAS COMUNS IDENTIFICADAS EM PROBANDOS DE FAMÍLIAS COM FNMTc E RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS.....	48
QUADRO 5 – VARIANTES RARAS IDENTIFICADAS EM PROBANDOS DE FAMÍLIAS COM FNMTc E EFEITO FENOTÍPICO PREVISTO.....	49
QUADRO 6 - SEGREGAÇÃO DO HAPLOTIPO AFECTADO NO <i>LOCUS FOXE1</i> NAS FAMÍLIAS 25 E 25A.	54
QUADRO 7 – RESULTADO DA ANÁLISE DA VARIANTE C.361G>A, ATRAVÉS DE TRÊS <i>SOFTWARES</i> DE PREVISÃO DE SÍTIOS DE <i>SPLICING</i>	55
QUADRO 8 – CLONES COM EXPRESSÃO ESTÁVEL DOS DIFERENTES PLASMÍDEOS. ANÁLISE DE RT-PCR E SEQUENCIAÇÃO DO GENE <i>FOXE1</i>	59
QUADRO I – SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR UTILIZADOS NO ESTUDO DO <i>LOCUS NKX2-1</i>	81
QUADRO II – SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR UTILIZADOS NO ESTUDO DE MICROSSATÉLITES DO <i>LOCUS FOXE1</i>	81
QUADRO III – SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR UTILIZADOS NO ESTUDO DO <i>LOCUS FOXE1</i>	82
QUADRO IV – SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR UTILIZADOS NO ESTUDO DO GENE <i>HHEX</i>	82
QUADRO V – SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR UTILIZADOS NO ESTUDO DO GENE <i>PAX8</i>	82
QUADRO VI – FENÓTIPOS OBSERVADOS EM 144 DOENTES DE 60 FAMÍLIAS COM FNMTc.....	83

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E CONVENÇÕES

A	Resíduo de nucleótido contendo como base a adenina
ANOVA	Análise de variância (<i>Analysis of Variance</i>)
Arg	Resíduo de aminoácido arginina
ATC	Carcinoma anaplásico da tiróide (<i>Anaplastic Thyroid Carcinoma</i>)
bp	Número de pares de resíduos de nucleótidos (<i>base pairs</i>)
BRAF	<i>Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1</i>
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
C	Resíduo de nucleótido contendo como base a citosina
cDNA	DNA complementar (do mRNA) (<i>complementary DNA</i>)
CH	Hipotireoidismo congénito (<i>Congenital hypothyroidism</i>)
cM	Centimorgan
CO₂	Dióxido de carbono
cPTC	Carcinoma papilar da tiróide clássico (<i>classic Papillary Thyroid Carcinoma</i>)
Ct	Ciclo de <i>threshold</i> (<i>threshold cycle</i>)
ddNTP	Didesoxinucleótidos (<i>dideoxynucleotide</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato (<i>diethylpyrocarbonate</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido (<i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Trifosfato de desoxinucleótido (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
DTT	Ditiotreitól (<i>Dithiothreitol</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FACS	Citometria de fluxo (<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)
FAM	6-carboxi-fluoresceína
FBS	Soro fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FNMTC	Formas familiares de NMTC (<i>Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma</i>)
FTA	Adenoma folicular da tiróide (<i>Follicular Thyroid Adenoma</i>)
FTC	Carcinoma folicular da tiróide (<i>Follicular Thyroid Carcinoma</i>)
FTEN	Neoplasias do epitélio folicular da tiróide (<i>Familial Thyroid Epithelial Neoplasia</i>)
FOXE1	<i>Forkhead box E1</i>
fvPTC	Carcinoma papilar da tiróide de variante folicular (<i>follicular variant of Papillary Thyroid Carcinoma</i>)
g	Grama
G	Resíduo de nucleótido contendo como base a guanina
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescent protein</i>)
Gly	Resíduo de aminoácido glicina
GWAS	Estudos de associação que abrangem todo o genoma (<i>Genome-wide association studies</i>)
h	Hora

H₂O	Água
HHEX	<i>Hematopoietically Expressed Homeobox</i>
LB	Meio nutritivo utilizado para cultura de bactérias (<i>Lysogeny broth</i>)
Leu	Resíduo de aminoácido leucina
m-	Mili
M	Molar
MAPK	Cascata mitogénica activada por proteínas cinase (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
MEN	Neoplasia endócrina múltipla (<i>Multiple Endocrine Neoplasia</i>)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
MNG	Bócio multinodular (<i>Multinodular Goiter</i>)
mPTC	Carcinoma papilar da tiróide misto (<i>mixed Papillary Thyroid Carcinoma</i>)
mRNA	RNA mensageiro (<i>messenger RNA</i>)
MTC	Carcinoma medular da tiróide (<i>Medullary Thyroid Carcinoma</i>)
n-	Nano
NKX2-1	<i>NKX homeobox 1</i>
NMTC	Carcinoma não-medular da tiróide (<i>Non-medullary Thyroid Carcinoma</i>)
NTC	Controlo negativo, sem cDNA (<i>Non-template control</i>)
onc	Variante oncocítica
OPTI-MEM	Meio de cultura (<i>OPTI Modified Eagle's Minimum Essential Medium</i>)
OR	Razão de probabilidades (<i>Odds Ratio</i>)
p	Braço curto do cromossoma
PAX8	<i>Paired box gene 8</i>
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PDTC	Carcinoma pouco diferenciado da tiróide (<i>Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma</i>)
PK	Proteinase K (<i>Proteinase K</i>)
pmol	Picomol
PRN	Carcinoma papilar renal (<i>Papillary Renal Carcinoma</i>)
PTC	Carcinoma papilar da tiróide (<i>Papillary Thyroid Carcinoma</i>)
q	Braço longo do cromossoma
RAS	<i>Rat sarcoma vírus homolog</i>
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>
RET	<i>Rearranged during transfection</i>
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto

RT-PCR	Reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase após transcrição reversa (<i>Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction</i>)
Ser	Resíduo de aminoácido Serina
SNP	Polimorfismo de nucleótido simples (<i>Single Nucleotide Polimorphism</i>)
T	Resíduo de nucleótido contendo como base a timina
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
TAMRA	6-carboxitetrametil-rodamina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato-EDTA
TCO	Tumores da tiróide com células oxifílicas (<i>Thyroid Tumors with Oxyphilia</i>)
tcPTC	Carcinoma papilar da tiróide, variante de células altas (<i>tall cell variant of Papillary Thyroid Carcinoma</i>)
TD	Disgénese da tiróide (<i>Thyroid dysgenesis</i>)
TET	Tetracloro-6-carboxi-fluoresceína
TG	Tiroglobulina (<i>Thyroglobulin</i>)
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TPO	Tiroperoxidase (<i>Thyropoxidase</i>)
TSH	Tirotropina ou hormona estimuladora da tiróide (<i>Thyroid-stimulating hormone</i>)
U	Unidade de actividade enzimática
UTR	Região não traduzida (<i>Untranslated Region</i>)
UV	Ultravioleta
WDTC	Carcinoma da tiróide bem diferenciado (<i>Well Differentiated Thyroid Carcinoma</i>)
WT	Forma não mutada de um gene ou proteína (<i>wild type</i>)
% (v/v)	Percentagem expressa em volume por volume
% (p/v)	Percentagem expressa em peso por volume
°C	Grau centígrado
μ-	Micro

I. INTRODUÇÃO

1. Tumorigénese

Todas as células possuem mecanismos moleculares semelhantes de regulação de processos biológicos importantes para a homeostasia celular, tais como a proliferação, a diferenciação e a morte celular. A desregulação destes processos pode conduzir à tumorigénese, um processo multifásico resultante da acumulação de alterações genéticas que conduzem à transformação progressiva de uma célula normal numa célula potencialmente maligna (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011). Hanahan e Weinberg sugeriram que existem seis características comuns à maioria, senão a todos os tipos de tumores em humanos (Figura 1):

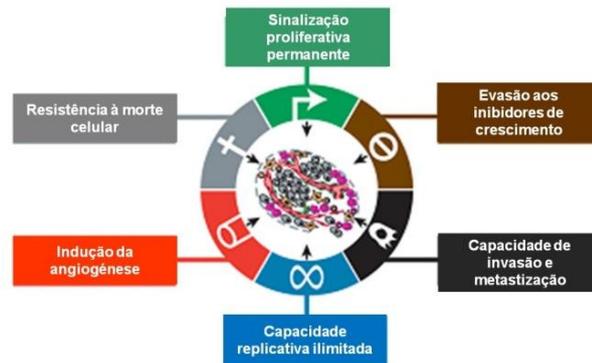


Figura 1 – Diagrama esquemático das capacidades adquiridas do cancro (adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).

- **sinalização proliferativa permanente.** As células normais requerem sinais de crescimento mitogénicos antes de passarem de um estado quiescente para um estado activo de proliferação. As células tumorais geram muitos dos seus próprios sinais de crescimento, reduzindo a sua dependência da estimulação do micro-ambiente. Estas células desenvolvem várias estratégias para evitar a diferenciação terminal, tornando-se mais aptas para proliferar. Os receptores de sinais de crescimento, muitas vezes com actividade de tirosina cinase nos seus domínios citoplasmáticos, estão sobre-expressos em vários tipos de cancro.
- **evasão aos inibidores de crescimento.** Num tecido normal, existem múltiplos sinais anti-proliferativos que actuam de forma a manter a homeostase das células e dos tecidos. As células tumorais desenvolvem mecanismos de evasão a estes sinais que bloqueiam a proliferação.
- **resistência à morte celular programada (apoptose).** A capacidade das células tumorais para se expandirem em número é determinada não só pela taxa de proliferação celular mas também pela taxa de apoptose. A resistência adquirida à apoptose é uma característica da maioria, senão de todos os tipos de cancro. A via PI3Kinase-AKT/PKB, que transmite sinais de sobrevivência anti-apoptótica, está envolvida em vários tipos de neoplasias.

- **capacidade replicativa ilimitada.** As características acima descritas não garantem a expansão do tumor. Mecanismos intrínsecos das células têm de ser inativados para que um clone celular se possa multiplicar indefinidamente. Um destes mecanismos é a inativação de genes supressores de tumor. A telomerase (uma transcriptase reversa), pelo contrário, é sobre-expressa na maioria das células do cancro, prevenindo a constante degradação das regiões terminais dos cromossomas (telómeros).
- **indução da angiogénese.** Uma rede de vasos sanguíneos que assegure as necessidades metabólicas (nutrição e oxigenação) é crucial para o desenvolvimento tumoral. A célula tumoral necessita de adquirir a capacidade de induzir a formação de novos vasos e capilares.
- **capacidade de invasão dos tecidos e metastização.** Durante o desenvolvimento da maioria dos tipos de cancro, o tumor primário invade os tecidos adjacentes e dissemina-se para outros locais, metastizando. A capacidade de invasão e metastização permite às células tumorais moverem-se para locais onde os nutrientes e os condicionamentos de espaço não são factores limitantes.

Cada uma destas alterações fisiológicas é adquirida durante o desenvolvimento do tumor e representa a inativação bem sucedida de um mecanismo de defesa anti-tumoral das células e tecidos. Esta multiplicidade de defesas pode explicar o facto do cancro ser um evento relativamente raro (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011).

1.1 Genes supressores de tumor e oncogenes

Os genes supressores de tumor regulam negativamente a proliferação celular (Weinberg, 1994; Loh, 1997). Estes genes codificam proteínas que permitem às células receber sinais externos de inibição de crescimento (Weinberg, 1994). A ausência ou inativação de um gene supressor de tumor traduz-se numa proliferação celular não controlada, conduzindo à tumorigénese (Weinberg, 1994; Loh, 1997). Entre os genes supressores de tumor encontram-se o *RB1* (*Retinoblastoma 1*) e o *TP53* (*Tumor protein 53*) (Weinberg, 1994; Hanahan & Weinberg, 2000).

A existência de genes supressores de tumor foi proposta pela primeira vez por Alfred Knudson, em 1971, o qual formulou a hipótese *two-hit* para a inativação destes genes (Knudson, 1971). De acordo com esta hipótese, em indivíduos que herdassem uma cópia mutada do gene (o primeiro *hit* presente nas células germinais e, consequentemente, em todas as células do indivíduo), seria apenas necessária uma mutação somática que inactivasse a segunda cópia do gene (o segundo *hit*) para

desencadear a tumorigénese. Em 1983, foram propostos alguns mecanismos para o segundo *hit* da hipótese de Knudson, nomeadamente, a perda de material cromossómico (perda de heterozigotia), a ocorrência de mutações intragénicas (Cavenee *et al.*, 1983) e, mais recentemente, a metilação de promotores (Jones, 1996). Desta forma, a detecção de perdas de heterozigotia em regiões específicas do genoma (onde ocorreu o segundo *hit*), sugere a existência de genes supressores de tumor que, quando inactivados, contribuem para o fenótipo tumoral.

Os proto-oncogenes codificam proteínas que permitem à célula normal responder a factores de crescimento exógenos (Weinberg, 1994; Loh, 1997). Os proto-oncogenes podem ser activados por alterações na sequência de DNA (Weinberg, 1994). Da sua alteração resulta uma forma mutante hiperactiva (oncogene), que mimetiza os sinais de crescimento normais, promovendo a transformação celular e contribuindo para a tumorigénese (Weinberg, 1994; Hanahan & Weinberg, 2000).

2. Novas tecnologias no estudo do cancro

Grande parte do genoma humano é não-codificante, sem função biológica conhecida. Estas regiões não-codificantes podem apresentar diferenças entre os vários indivíduos, tornando cada genoma único (Vineis *et al.*, 1999). Os polimorfismos são variantes genéticas, com uma frequência superior a 1% na população, sendo os mais comuns os polimorfismos de nucleótido único (SNPs) e os microssatélites. Estes polimorfismos podem ser utilizados como marcadores para a localização de genes responsáveis por doenças, uma vez que, sendo herdados segundo as leis de Mendel, a sua transmissão pode ser seguida em paralelo com a da doença (Strachan & Read, 2004).

Os polimorfismos mais frequentes são os SNPs. Até ao momento foram descritos cerca de 15 milhões (The 1000 Genomes Project Consortium, 2010). A grande abundância dos SNPs e a possibilidade de serem genotipados em grande escala, faz deles uma escolha óbvia como marcadores de DNA para estudos de *linkage* e estudos de associação (Syvanen, 2001; Sobrino *et al.*, 2005). Actualmente, existem bases de dados para estas variações comuns no genoma humano, que resultam do projecto HapMap, tais como a SNPedia ou dbSNP, contendo informações acerca da frequência de cada SNP nas diferentes populações.

Os GWAS (*Genome-wide association studies*) e os GWLA (*Genome-wide linkage analysis*) são estudos que abrangem todo o genoma. A nova tecnologia de *microarrays* (Figura 2), que permite genotipar milhares de SNPs (10.000 – 1.000.000), tem sido utilizada com sucesso nestes estudos.

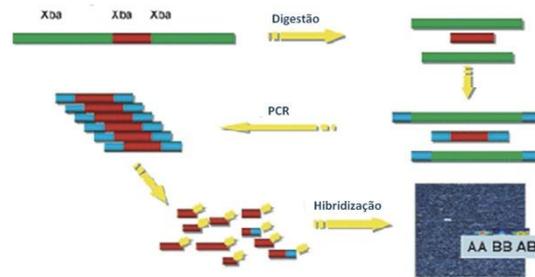


Figura 2 – Representação esquemática da utilização de *chip* de SNPs (adaptado de <http://www.gladstone.ucsf.edu/gladstone/site/genomicscore/section/1919>).

Uma outra abordagem importante para identificar variantes que conferem susceptibilidade para doenças é o *Candidate Gene Approach*, que envolve o estudo directo de SNPs ou da sequência de um gene candidato. Os genes são seleccionados como candidatos posicionais, que resultam de estudos de *linkage* prévios, ou como candidatos funcionais.

Com as novas tecnologias de sequenciação de DNA em larga escala (por exemplo a pirosequenciação), a sequenciação completa do genoma dos probandos de famílias com síndromes neoplásicas hereditárias ou a sequenciação do DNA de células tumorais, permitirá identificar alterações genéticas germinais e somáticas cruciais para a patogénese tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011).

3. A Glândula Tiroideia

A tiróide, localizada na região cervical junto à traqueia (Figura 3), é uma glândula endócrina composta por dois lobos unidos por um istmo (Muro-Cacho & Ku, 2000a). A tiróide sintetiza as hormonas tiroxina ou tetraiodotironina (T4) e triiodotironina (T3), essenciais para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos vertebrados (Nitsch *et al.*, 2010).

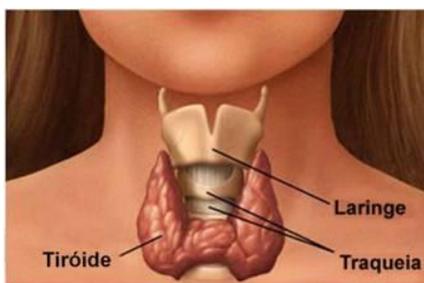


Figura 3 – Localização da tiróide (adaptado de <http://www.noteaqui.com/o-que-e-tiroide-e-tiroide-sintomas/>).

Na fase inicial da embriogénese, a tiróide desenvolve-se a partir da faringe primitiva, migrando até à sua localização final. Quando a migração termina, a tiróide é composta por uma massa sólida de células endodérmicas. Posteriormente, formam-se os lobos tiroideus, localizados em ambos os lados da traqueia, e na fase seguinte surgem as estruturas foliculares primitivas (Lazzaro *et al.*, 1991).

A tiróide é constituída por dois tipos de células: as células C (ou parafoliculares) e as células foliculares. As células C produzem a calcitonina (Muro-Cacho & Ku,

2000a) e as células foliculares formam estruturas esféricas preenchidas com colóide, onde é armazenado o iodo (Francis-Lang *et al.*, 1992; Muro-Cacho & Ku, 2000a).

3.1 Neoplasias da tiróide

Os tumores da tiróide são os tumores mais frequentes do sistema endócrino (DeLellis *et al.*, 2004). O cancro da tiróide ocorre principalmente em adultos, sendo raro em crianças (DeLellis *et al.*, 2004). Em 2010, estimou-se que nesse ano surgiriam cerca de 45.000 novos casos de cancro da tiróide e ocorreriam mais de 1600 mortes devido a esta doença nos Estados Unidos (Jemal *et al.*, 2010). As taxas de incidência de cancro da tiróide têm aumentado na maioria dos países desde 1970, mas a taxa de mortalidade associada a estas neoplasias tem diminuído, devido ao aumento do uso de métodos de diagnóstico mais sofisticados, que permitem a detecção de tumores de menores dimensões (DeLellis *et al.*, 2004). Cerca de 85% dos doentes apresentam um baixo risco de morte associado a carcinoma da tiróide (Schlumberger, 1998). As neoplasias da tiróide têm um bom prognóstico na maioria dos casos, principalmente devido à baixa taxa de proliferação celular (Biersack & Grünwald, 2005).

O desenvolvimento dos carcinomas da tiróide pode ser influenciado por factores ambientais, hormonais ou genéticos e pela interacção entre eles (DeLellis *et al.*, 2004). Os factores ambientais podem ser divididos em efeitos genotóxicos e não-genotóxicos (DeLellis *et al.*, 2004). A função tiroideia depende do iodo disponível no ambiente. Deste modo, a tiróide é particularmente vulnerável aos efeitos genotóxicos do iodo radioactivo (danos no DNA) e aos efeitos não-genotóxicos resultantes da deficiência em iodo (estimulação da TSH) (DeLellis *et al.*, 2004). Em regiões endémicas de bócio, a incidência de nódulos é muito superior à incidência de cancro, resultante da carência de iodo na alimentação (Biersack & Grünwald, 2005). A prevalência tanto dos nódulos, como de cancro da tiróide é maior nas mulheres do que nos homens, sendo esta diferença menor em crianças e idosos, o que sugere que estejam envolvidos factores hormonais (DeLellis *et al.*, 2004; Farid, 2004). Os factores genéticos envolvidos no cancro da tiróide serão abordados nas secções seguintes.

As neoplasias da tiróide podem ser divididas em benignas e malignas (Figura 4). As benignas são designadas por adenomas foliculares (*Follicular Thyroid Adenoma* - FTA) e as malignas são designadas por carcinomas (Muro-Cacho & Ku, 2000a). Os carcinomas podem ter origem nas células C ou nas células foliculares. Os carcinomas com origem nas células C designam-se por carcinomas medulares da tiróide (*Medullary Thyroid Carcinoma* - MTC) e os carcinomas com origem nas células foliculares designam-se por carcinomas não-medulares da tiróide (*Nonmedullary Thyroid Carcinoma* - NMTC), sendo estes últimos mais frequentes e com prognóstico

mais favorável do que os MTC (Muro-Cacho & Ku, 2000a; DeLellis *et al.*, 2004; Malchoff & Malchoff, 2006). Os NMTC podem ainda ser divididos em 4 subtipos, de acordo com as características morfológicas e clínicas: o carcinoma papilar da tiróide (*Papillary Thyroid Carcinoma* - PTC), o carcinoma folicular da tiróide (*Follicular Thyroid Carcinoma* - FTC), o carcinoma pouco diferenciado da tiróide (*Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma* - PDTC) e o carcinoma anaplásico da tiróide (*Anaplastic Thyroid Carcinoma* - ATC) (DeLellis *et al.*, 2004; Malchoff & Malchoff, 2006). O PTC e o FTC são normalmente agrupados no grupo dos carcinomas bem diferenciados (*Well Differentiated Thyroid Carcinoma* - WDTC) (Schlumberger, 1998).

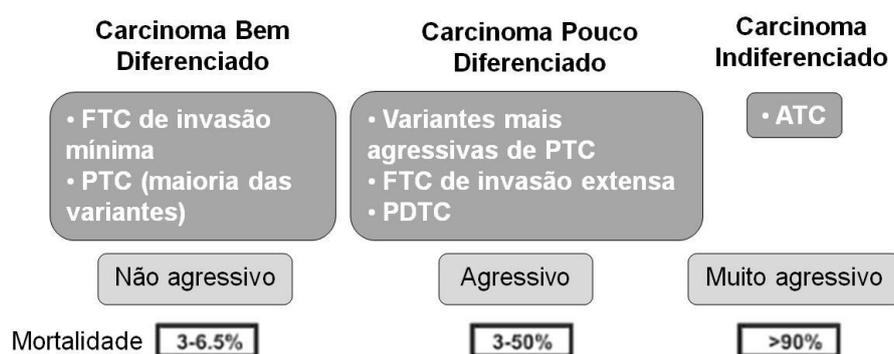


Figura 4 – Classificação dos carcinomas da tiróide derivados das células foliculares (adaptado de Clark & Faquin, 2010). FTC, Carcinoma Folicular da Tiróide; PTC, Carcinoma Papilar da Tiróide; PDTC, Carcinoma Pouco Diferenciado da Tiróide; ATC, Carcinoma Anaplásico da Tiróide.

3.1.1 Detecção e tratamento dos carcinomas da tiróide

A ecografia da tiróide é útil para estabelecer o tamanho da lesão e a sua natureza sólida ou quística, para detecção de outros nódulos e como guia para a realização da citologia por aspiração com agulha fina (no caso do nódulo ser pequeno ou difícil de palpar) (Schlumberger, 1998; DeLellis *et al.*, 2004; Sippel *et al.*, 2007).

A determinação da tiroglobulina, um marcador tumoral específico da tiróide, geralmente não é muito informativa, uma vez que se encontram níveis elevados de tiroglobulina (> 500 ng/mL) tanto em doentes com nódulos benignos como em doentes com carcinomas papilares e foliculares (DeLellis *et al.*, 2004; Biersack & Grünwald, 2005). O potencial da tiroglobulina como marcador tumoral é usado com mais sucesso após remoção da tiróide por cirurgia e terapia com iodo radioactivo (^{131}I) (Biersack & Grünwald, 2005). Os carcinomas da tiróide raramente interferem com a capacidade funcional da glândula da tiróide. Alterações nos níveis de TSH raramente se verificam nos doentes com neoplasias, embora baixos níveis de TSH indiquem a presença de nódulos hiperfuncionantes (DeLellis *et al.*, 2004).

O tratamento de carcinomas da tiróide envolve habitualmente a remoção total da glândula. Após a cirurgia, grande parte dos doentes são tratados com ^{131}I . Entre 5 e 20% dos doentes com carcinomas da tiróide bem diferenciados ocorrem recorrências locais ou regionais, relacionadas com o tratamento inicial incompleto ou com a presença de um tumor mais agressivo. (Schlumberger, 1998)

3.1.2 Carcinoma medular da tiróide

O MTC tem origem nas células C, representando 5 a 10% de todos os tumores da tiróide (Muro-Cacho & Ku, 2000b; DeLellis *et al.*, 2004; Malchoff & Malchoff, 2006).

O MTC aparece normalmente em adultos de meia-idade, com uma pequena predominância nas mulheres e tem uma sobrevivência a 5 anos de 60 a 70% após cirurgia (Muro-Cacho & Ku, 2000b). Em cerca de 25% dos casos de MTC existe uma predisposição familiar, que resulta de mutações no proto-oncogene *RET* (*Rearranged during transfection*) (Malchoff & Malchoff, 2006; Nose, 2008). Este carcinoma pode surgir no contexto das neoplasias endócrinas múltiplas (*multiple endocrine neoplasia* – MEN) tipo 2A, podendo estar associado a tumores da medula das glândulas supra-renais (feocromocitoma) e a hiperparatiroidismo primário, e tipo 2B, estando associado a tumores das mucosas e também a feocromocitoma (Muro-Cacho & Ku, 2000b). Em casos esporádicos de MTC, são detectadas mutações no gene *RET* em 12-100% dos casos. Mutações somáticas do gene *RAS* (*Rat sarcoma virus homolog*) foram detectadas em 68% dos MTC sem mutações no *RET*. Deste modo, mutações nos proto-oncogenes *RET* e *RAS* representam eventos genéticos alternativos na tumorigénese dos MTC (Moura *et al.*, 2011).

3.1.3 Adenoma folicular da tiróide

O FTA é um tumor benigno e encapsulado, com evidência de diferenciação das células foliculares (DeLellis *et al.*, 2004). As mulheres apresentam maior prevalência de adenomas, havendo também maior incidência em indivíduos expostos à radiação (DeLellis *et al.*, 2004). Existem muitas semelhanças entre os FTA e os FTC. Os critérios histológicos que permitem distinguir os FTA dos FTC são a invasão da cápsula e dos vasos sanguíneos ou a presença de metástases (Schlumberger, 1998; Farid, 2004).

Rearranjos *PAX8/PPAR γ* (*PAX8* - *Paired box 8*, *PPAR γ* - *Peroxisome Proliferation-Activated Receptors subtype γ*) e mutações no gene *RAS* estão presentes em cerca de 30% dos casos de FTA, sendo estas alterações mutuamente exclusivas (Marques *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2006).

3.1.4 Carcinoma papilar da tiróide

O PTC é um tumor maligno do epitélio folicular da tiróide, que em geral apresenta diferenciação das células foliculares (WDTC) (DeLellis *et al.*, 2004). Nestes tumores, as células estão dispostas em papilas e possuem características específicas do núcleo que incluem dilatação, forma oval e um aspecto “vazio” (Gray & Doniach, 1969; DeLellis *et al.*, 2004). O tamanho deste tumor varia entre menos de 1 mm, até alguns centímetros (DeLellis *et al.*, 2004). O PTC pode ser multifocal, apresentando tipicamente um crescimento lento (Muro-Cacho & Ku, 2000a; Bonora *et al.*, 2010). O PTC metastiza preferencialmente para os nódulos linfáticos, sendo menos frequente a metastização pulmonar (Schlumberger, 1998; DeLellis *et al.*, 2004; Bonora *et al.*, 2010). O prognóstico desta doença é excelente, com 90% de sobrevivência a 10 anos (DeLellis *et al.*, 2004).

O PTC representa cerca de 80% das neoplasias malignas do epitélio da tiróide diagnosticadas em regiões onde o bócio não é endémico, sendo o tumor mais frequente da tiróide (Farid, 2004; Sippel *et al.*, 2007). O PTC é raro em crianças e adolescentes (Schlumberger, 1998). A idade no diagnóstico varia entre os 20 e os 50 anos, sendo mais frequente nas mulheres do que nos homens (2-4:1). Em cerca de 6% dos casos, o PTC pode estar associado à exposição a radiação (Schlumberger, 1998; Muro-Cacho & Ku, 2000a; DeLellis *et al.*, 2004).

Rearranjos que envolvem o proto-oncogene *RET*, designados por *RET/PTC*, são encontrados em 20-80% dos casos de PTC, dependendo dos estudos e da localização geográfica (DeLellis *et al.*, 2004). Mutações nos genes *BRAF* (*Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1*), nomeadamente a mutação V600E, surgem em 53% dos casos de PTC clássico (cPTC) (Sobrinho-Simões *et al.*, 2005). Na variante folicular de PTC (fvPTC), os rearranjos de *PAX8/PPAR γ* encontram-se em quase 40% dos casos, as mutações *RAS* em 25% e as mutações *BRAF* em 10% dos casos (Castro *et al.*, 2006). Estes genes codificam proteínas envolvidas na via de sinalização intracelular que leva à activação da cascata *MAPK* (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (DeLellis *et al.*, 2004).

3.1.5 Carcinoma folicular da tiróide

O FTC é um tumor maligno do epitélio folicular, com evidência de diferenciação das células foliculares (DeLellis *et al.*, 2004; Biersack & Grünwald, 2005). As células tumorais apresentam morfologia variável, formando folículos bem definidos que contêm colóide, ou apresentando padrões sólidos ou trabeculares (DeLellis *et al.*, 2004). O FTC é geralmente um tumor sólido encapsulado, com dimensões superiores

a 1 cm de diâmetro (Schlumberger, 1998; DeLellis *et al.*, 2004). A multifocalidade é raramente observada neste tipo de tumores (DeLellis *et al.*, 2004; Bonora *et al.*, 2010).

O FTC é definido pelas suas características invasivas que resultam na infiltração dos vasos sanguíneos e/ou penetração completa da cápsula tumoral (Bonora *et al.*, 2010). Estes tumores metastizam por via hematogénica, sendo reportadas metástases em mais de 20% dos casos, nomeadamente no pulmão e ossos (Schlumberger, 1998; DeLellis *et al.*, 2004; Bonora *et al.*, 2010). Este tipo de carcinoma pode ser dividido em dois grupos, de acordo com o grau de invasão: carcinomas de invasão mínima e carcinomas de invasão extensa (Schlumberger, 1998; Farid, 2004).

O FTC representa cerca de 15% dos NMTC, com um pico de incidência entre os 50 e os 60 anos, sendo mais comum nas mulheres e em indivíduos com exposição a radiação (Muro-Cacho & Ku, 2000a; DeLellis *et al.*, 2004; Bonora *et al.*, 2010). Em mais de 20% dos FTC estão presentes mutações no gene *RAS*. O rearranjo do gene *PAX8/PPAR γ* é encontrado em 25-50% dos FTC (Marques *et al.*, 2002; DeLellis *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2006). A presença deste rearranjo em FTA e FTC esporádicos sugere a existência de progressão de FTA para FTC (Figura 5) (Marques *et al.*, 2002; Cheung *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2006; Placzkowski *et al.*, 2008).

3.1.6 Carcinoma pouco diferenciado da tiróide

O PDTC representa menos de 10% dos casos de NMTC (Bonora *et al.*, 2010). É uma neoplasia com origem nas células foliculares, que apresenta evidência limitada de diferenciação de células foliculares estruturais, com comportamento e morfologia entre os ATC e WDTC (DeLellis *et al.*, 2004). A maioria destes tumores apresenta mais de 3 cm de diâmetro, podendo apresentar invasão dos vasos sanguíneos e metástases pulmonares e nos ossos (Muro-Cacho & Ku, 2000a; DeLellis *et al.*, 2004).

Este tipo de carcinoma é mais comum em mulheres e acima dos 50 anos. A taxa de mortalidade é elevada nos primeiros 3 anos após diagnóstico e poucos doentes sobrevivem mais de 5 anos, normalmente devido à ocorrência de metástases. Neste tipo de tumor, são frequentes mutações no gene *TP53*, nos genes *RAS*, podendo também ocorrer rearranjos *RET/PTC*, sugerindo uma transição de PTC para PDTC (Figura 5) (DeLellis *et al.*, 2004).

3.1.7 Carcinoma indiferenciado ou anaplásico da tiróide

O ATC representa menos de 5% dos casos de NMTC, sendo um dos tumores mais letais em humanos (DeLellis *et al.*, 2004; Bonora *et al.*, 2010). Histologicamente, é composto completa ou parcialmente de células indiferenciadas que exibem características imunohistoquímicas ou ultraestruturais de diferenciação epitelial. A

maioria dos casos demonstra a pré-existência de carcinoma diferenciado ou pouco diferenciado da tiróide (Figura 5) (DeLellis *et al.*, 2004).

O ATC é um tumor característico de indivíduos de idade avançada com uma idade média na altura do diagnóstico de 60 anos, sendo mais frequente nas mulheres do que nos homens (3-4:1). A incidência anual é de 1 ou 2 casos por cada milhão, mas contribui para mais de metade das mortes por cancro da tiróide. O ATC é a neoplasia da tiróide mais agressiva, devido à rápida progressão local da doença, estando associada a uma média de sobrevivência de 6 meses após diagnóstico. A sobrevivência a 5 anos varia entre 0-14%. Nos raros casos com melhor prognóstico os tumores apresentam menos de 5 cm de diâmetro (Muro-Cacho & Ku, 2000a; DeLellis *et al.*, 2004).

No ATC, as mutações no gene supressor de tumor *TP53* são as mais comuns (DeLellis *et al.*, 2004).

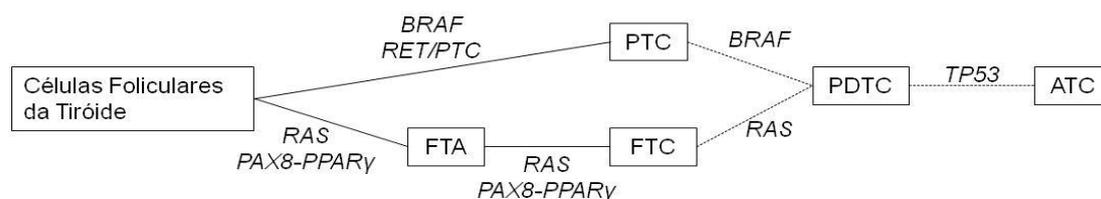


Figura 5 – Representação esquemática da progressão entre os carcinomas da tiróide (adaptado de Kondo *et al.*, 2006). As linhas representadas a tracejado indicam processos de desdiferenciação.

4. Formas familiares de NMTC (FNMTC)

4.1. Síndromes neoplásicas hereditárias

Algumas síndromes neoplásicas hereditárias podem incluir no seu espectro tumores da tiróide, mas são caracterizadas pela preponderância de tumores não-tiroideus (Malchoff & Malchoff, 2006; Nose, 2008). Estas síndromes incluem a polipose adenomatosa familiar, a síndrome de Cowden (síndrome de hamartoma múltiplo), o complexo de Carney e a síndrome de Peutz-Jeghers (Sturgeon & Clark, 2005; Nose, 2008). Estas síndromes estão já bem caracterizadas do ponto de vista genético-molecular (Quadro 1).

Quadro 1 – Síndromes hereditárias com manifestação de tumores na tiróide (NMTC) (adaptado de Nose, 2008).

Síndrome	Modo de transmissão	Tumores da tiróide	Outros tumores/lesões	Gene	Localização do gene
Polipose adenomatosa familiar/Gardner	Autossômico dominante	PTC	Tumores do cólon, cérebro (meduloblastomas), hipertrofia do epitélio pigmentado da retina, quistos na maxila, quistos sebáceos	APC	5q21-22
Síndrome de Cowden	Autossômico dominante	FTC, PTC	Hamartomas múltiplos, especialmente na pele, mucosas, mama e cólon	PTEN	10q23
Complexo de Carney	Autossômico dominante	PTC, FTC, FTA	Mixomas, tumores endócrinos	PRKAR1A (heterog. genética)	17q23
Síndrome de Peutz-Jeghers	Autossômico dominante	PTC	Pigmentação melanocítica, múltiplos pólipos gastrointestinais, tumores do estômago, pâncreas, ovário, testículos, mama	STK11 (heterog. genética)	19q13.2

PTC, Carcinoma Papilar da Tiróide; FTC, Carcinoma Folicular da Tiróide; FTA, Adenoma Folicular da Tiróide; heterog., heterogeneidade

4.2. Aspectos clínicos do FNMTTC

Nas formas familiares de NMTC (*Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma* - FNMTTC), que representam 3 a 7% de todos os casos de NMTC, o carcinoma da tiróide ocorre isoladamente, não estando associado a neoplasias de outros órgãos (Grossman *et al.*, 1995; Loh, 1997; Canzian *et al.*, 1998; Maxwell *et al.*, 2004; Malchoff & Malchoff, 2006; Hemminki *et al.*, 2008; Nose, 2008; Bonora *et al.*, 2010). Estudos estatísticos sugerem que a ocorrência de 2 familiares com NMTC podem, na realidade, representar a associação fortuita de tumores esporádicos em mais de 45% dos casos. Por outro lado, os mesmos estudos sugerem que a probabilidade de 3 ou mais casos de NMTC ocorrerem na mesma família por acaso (sem hereditariedade) é inferior a 6% (Charkes, 1998; Charkes, 2006; Malchoff & Malchoff, 2006). O risco individual para cancro da tiróide é de 15,6, quando um dos irmãos já foi diagnosticado com cancro da tiróide (Hemminki *et al.*, 2008). Esta associação familiar é frequente em PTC, ocasionalmente em FTC, e ainda não foi reportado para o PDTC ou ATC (Malchoff & Malchoff, 2006).

Vários estudos observaram que o FNMTTC está associado a um aparecimento do tumor numa idade mais jovem, a uma incidência maior de nódulos benignos da tiróide [bócio multinodular (*Multinodular Goiter* – MNG) e FTA], a multifocalidade, bilateralidade, metastização para os nódulos linfáticos, invasão da cápsula e recorrência (Grossman *et al.*, 1995; Malchoff & Malchoff, 2006; Sippel *et al.*, 2007; Moses *et al.*, 2011). Capezzone e colaboradores compararam a 1ª e a 2ª geração de doentes com FNMTTC, observando um aparecimento mais precoce e mais agressivo

na 2ª geração (Capezzone *et al.*, 2008). Estes dados sugerem que doentes com FNMTTC necessitam de um tratamento mais agressivo e de um seguimento mais próximo, pois apresentam um risco de recorrência mais elevado (Grossman *et al.*, 1995; Sippel *et al.*, 2007; Capezzone *et al.*, 2008). No entanto, alguns estudos não confirmam estas observações (Loh, 1997; Maxwell *et al.*, 2004), não havendo ainda consenso.

O estabelecimento de um diagnóstico molecular de carcinoma da tiróide familiar possibilitará a detecção precoce dos portadores da mutação, com benefícios no tratamento e seguimento clínico, diminuindo a morbilidade e a mortalidade associada a esta doença (Bonora *et al.*, 2010).

4.3. Aspectos genético-moleculares do FNMTTC

Análises genéticas de grandes famílias com FNMTTC suportam a existência de predisposição genética para o FNMTTC (Malchoff & Malchoff, 2006). O modo de hereditariedade ainda não é claro, mas na maioria das famílias publicadas observou-se uma hereditariedade autossómica dominante com penetrância incompleta (Loh, 1997; Canzian *et al.*, 1998; DeLellis *et al.*, 2004; Sturgeon & Clark, 2005; Malchoff & Malchoff, 2006; Nose, 2008; Moses *et al.*, 2011).

Para identificar o(s) gene(s) responsável(eis) pela predisposição para o FNMTTC, vários grupos realizaram GWLA, usando marcadores de microssatélite distribuídos pelo genoma, em famílias informativas com múltiplos familiares afectados (Bonora *et al.*, 2010). Estas análises genéticas de grandes famílias com FNMTTC representam os primeiros passos na identificação de possíveis genes de susceptibilidade por clonagem posicional (Malchoff & Malchoff, 2006). Análises de *linkage* possibilitaram a identificação de várias regiões cromossómicas onde se localizam genes de susceptibilidade para o FNMTTC (DeLellis *et al.*, 2004; Malchoff & Malchoff, 2006; Moses *et al.*, 2011). Embora tenham sido mapeados, estes genes ainda não foram identificados:

- *locus* de susceptibilidade para MNG, (*MNG1*), mapeado no cromossoma 14q31, através de estudos de *linkage*, numa família do Canadá com 18 indivíduos afectados com MNG, dois dos quais também com PTC, sendo a hereditariedade autossómica dominante (Bignell *et al.*, 1997);
- *locus* designado de *Thyroid Tumors with Oxyphilia* (*TCO*), localizado no cromossoma 19p13.2, identificado após estudos de *linkage* numa família Francesa com 6 doentes afectados com MNG e três com PTC com células

oxifílicas. A doença apresentava uma hereditariedade autossómica dominante (Canzian *et al.*, 1998);

- *locus* mapeado no cromossoma 1p13.2-q21, numa família Americana com 5 membros afectados com PTC e dois com carcinoma papilar renal (*Papillary Renal Carcinoma – PRN*), com hereditariedade autossómica dominante, designado de *fPTC/PRN* ou *PRN1* (Malchoff *et al.*, 2000);
- *locus* localizado na região 2q21, designado por *NMTC1* e identificado numa família da Tasmânia com elevada frequência de PTC, cuja doença apresenta padrão autossómico dominante (McKay *et al.*, 2001);
- *locus* que predispõe para neoplasias do epitélio folicular da tiróide (*Familial Thyroid Epithelial Neoplasia – FTEN*), com hereditariedade autossómica dominante, identificado por análise de *linkage* numa grande família Portuguesa, localizado no cromossoma 8p23.1-p22 (Cavaco *et al.*, 2008b);
- *locus* mapeado no cromossoma 8q24, por estudos de *linkage* em 26 famílias Americanas, que confere susceptibilidade para PTC e apresenta hereditariedade autossómica dominante (He *et al.*, 2009);
- *loci* de susceptibilidade para o FNMTc com padrão autossómico dominante, identificados nos cromossomas 6q22 e 1q21 por estudos de *linkage*, em 31 famílias Americanas e 7 famílias Italianas (Suh *et al.*, 2009).

O envolvimento de várias regiões cromossómicas sugere a existência de heterogeneidade genética para o FNMTc.

Para além dos estudos de mapeamento, a identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTc pode ser avaliada através do estudo directo de genes candidatos (*Candidate Gene Approach*). Desta forma, o estudo de genes importantes para a morfogénese da tiróide e manutenção da diferenciação da tiróide no adulto poderá ser uma abordagem alternativa.

5. Factores de transcrição na tiróide

No colóide das células foliculares, o iodo é incorporado nos resíduos de tirosina da tiroglobulina (TG) pela enzima tiroperoxidase (TPO), produzindo as hormonas T3 e T4 (Figura 6) (Adjadj *et al.*, 2009). Quando ocorre estimulação hormonal pela tirotropina (ou hormona estimuladora da tiróide - TSH), ocorre hidrólise da TG e as hormonas são libertadas para a corrente sanguínea (Francis-Lang *et al.*, 1992; Gudmundsson *et al.*, 2009). Este mecanismo é específico da tiróide, uma vez que os

mRNAs dos genes *TG* e *TPO* são apenas detectado nesta glândula (Sinclair *et al.*, 1990).

Os factores de transcrição regulam a expressão génica, ligando-se a sequências específicas nos promotores dos genes (Pellizzari *et al.*, 2000; D'Elia *et al.*, 2002; Di Palma *et al.*, 2003; Altmann *et al.*, 2005). Alguns genes candidatos para a disgénese da tiróide (ou seja, quando a tiróide está ausente, ectópica ou subdesenvolvida) são factores de transcrição expressos durante a fase inicial da formação, migração e diferenciação da tiróide (Pasca di Magliano *et al.*, 2000; Al Taji *et al.*, 2007). Os factores de transcrição mais importantes da tiróide são o NKX2-1 (*NK2 homeobox 1* ou *Thyroid Transcription Factor-1 - TTF1*) (Lazzaro *et al.*, 1991), o FOXE1 (*Forkhead Box E1* ou *Thyroid Transcription Factor-2 - TTF2*) (Zannini *et al.*, 1997), o HHEX (*Hematopoietically Expressed Homeobox*) (Thomas *et al.*, 1998) e o PAX8 (*Paired box 8*) (Plachov *et al.*, 1990). Nenhum destes factores de transcrição é expresso exclusivamente na tiróide, mas a sua combinação é única nesta glândula (Pasca di Magliano *et al.*, 2000; Altmann *et al.*, 2005).

O estudo de ratinhos *knock-out* revelou um papel crítico destes genes na diferenciação celular, durante a embriogénese, e no desenvolvimento normal da tiróide (Hanahan & Weinberg, 2000; Puppini *et al.*, 2004; Al Taji *et al.*, 2007). No adulto, a expressão dos factores de transcrição NKX2-1, FOXE1, HHEX e PAX8 é essencial para a manutenção do estado diferenciado das células da tiróide, uma vez que estão envolvidos na regulação da expressão dos genes *TG* e *TPO* (Civitareale *et al.*, 1989; Lazzaro *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 1996; Miccadei *et al.*, 2002; Ngan *et al.*, 2009).

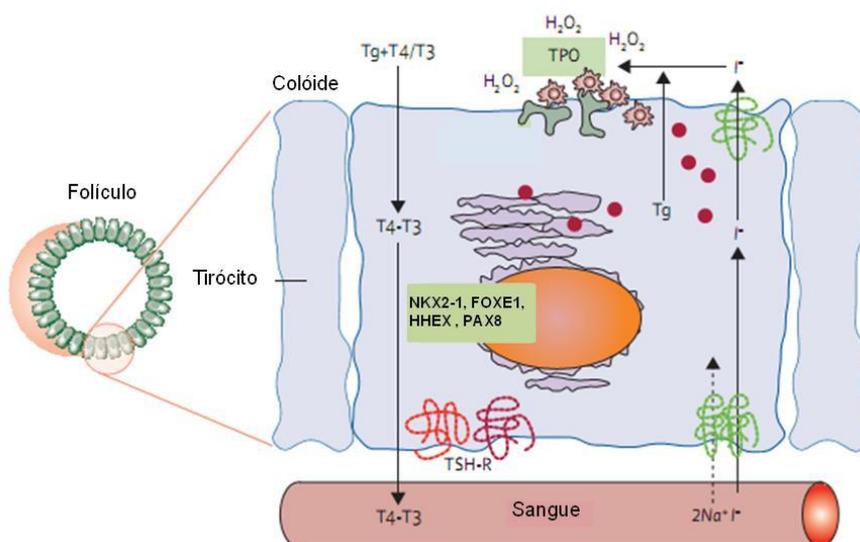


Figura 6 – Imagem representativa da síntese das hormonas T3 e T4 (adaptado de Adjadj *et al.*, 2009).

5.1 Factor de transcrição NKX2-1

Membros da família de factores de transcrição NKX-2 partilham uma região conservada do homeodomínio na região carboxilo terminal (Kimura *et al.*, 1996). O gene *NKX2-1* codifica um factor de transcrição que contém um homeodomínio necessário e suficiente para a sua ligação ao DNA (Figura 7). A proteína NKX2-1 é expressa na tiróide, no pulmão e em regiões restritas do cérebro (no diencéfalo e neurohipófise), durante a formação da tiróide e no adulto (Lazzaro *et al.*, 1991; Damante & DiLauro, 1994). O gene está localizado no cromossoma 14q13, tem 3 exões e codifica uma proteína com 371 resíduos de aminoácidos (Krude *et al.*, 2002; Ngan *et al.*, 2009). O factor de transcrição NKX2-1 tem um papel fundamental na regulação do desenvolvimento e na manutenção do estado diferenciado das células da tiróide, sendo essencial para a expressão específica deste tipo de células (Civitareale *et al.*, 1989; Miccadei *et al.*, 2002). Em embriões de ratinho *NKX2-1^{-/-}*, o primórdio da tiróide forma-se na posição correcta, mas subseqüentemente os precursores das células da tiróide sofrem apoptose (Kimura *et al.*, 1996).



Figura 7 – Diagrama esquemático dos domínios funcionais da proteína NKX2-1 humana (adaptado de Carré *et al.*, 2009).

O mRNA e a proteína NKX2-1 são detectados no início da organogénese da tiróide. No ratinho, o mRNA dos genes *TG* e *TPO* é expresso 5 dias após o início da expressão de NKX2-1, coincidindo com a formação dos primeiros folículos e com a detecção das hormonas T3 e T4 no seu lúmen (Lazzaro *et al.*, 1991). A proteína NKX2-1 tem um papel activador transcripcional dos genes *TG* e *TPO*, possuindo 3 locais de ligação nos seus promotores. No entanto, a proteína NKX2-1 activa mais eficientemente o promotor do gene *TG* (Civitareale *et al.*, 1989; Sinclair *et al.*, 1990; Lazzaro *et al.*, 1991; Francis-Lang *et al.*, 1992; Zannini *et al.*, 1992; Damante & DiLauro, 1994; Zannini *et al.*, 1997; Miccadei *et al.*, 2002; Di Palma *et al.*, 2003; Altmann *et al.*, 2005). A proteína NKX2-1 possui ainda 2 locais de ligação no *enhancer* do gene *TPO* (Kikkawa *et al.*, 1990; Miccadei *et al.*, 2002) e 3 no *enhancer* do gene *TG* (Fabbro *et al.*, 1998; Christophe-Hobertus & Christophe, 1999; Altmann *et al.*, 2005).

Mutações no gene *NKX2-1* (p.G2626T, p.C2519A, p.C1302A, p.L176V, p.Q210P) têm sido associadas a hipotireoidismo congénito, hipoplasia e agénese da

tiróide, traduzindo-se na perda de actividade transcripcional e/ou formação de proteínas truncadas (Krude *et al.*, 2002; Carré *et al.*, 2009).

Nos PTC, a expressão de NKX2-1 é detectável, mas nos ATC é indetectável (D'Elia *et al.*, 2002), sugerindo uma perda de expressão associada à dediferenciação.

Em 2009, Ngan e colaboradores identificaram a presença de uma mutação germinal (p.A339V) no gene *NKX2-1* em 4 doentes (não relacionados), dos quais 2 pertenciam a famílias com MNG/PTC (Ngan *et al.*, 2009). A detecção desta mutação representou a primeira evidência do envolvimento do factor de transcrição NKX2-1 no cancro da tiróide familiar.

Estudos de associação que abrangeram todo o genoma (GWAS), em indivíduos da Islândia com ascendência Europeia, identificaram uma forte associação entre o alelo T do rs944289 (C/T), localizado a montante do gene *NKX2-1*, e o risco de PTC e FTC (*odds ratio* – OR = 1,37, $P = 2.5 \times 10^{-8}$) (Gudmundsson *et al.*, 2009). Indivíduos homocigóticos para o alelo T do rs944289 apresentavam 1,9 vezes maior risco de desenvolver a doença do que os homocigóticos para o alelo C. Homocigóticos para a variante rs944289 (TT) e para o alelo A do rs965513, localizado a montante do gene *FOXE1*, apresentavam 5,7 vezes maior risco de PTC e FTC (Gudmundsson *et al.*, 2009). Outro estudo confirmou a associação destes dois polimorfismos com o maior risco de PTC esporádico, na população Japonesa (Matsuse *et al.*, 2011).

5.2 Factor de transcrição FOXE1

O factor de transcrição FOXE1 pertence à família de proteínas caracterizadas pela presença de um domínio *forkhead* (Figura 8). Para além deste domínio *forkhead*, a proteína FOXE1 contém também uma região repressora C-terminal e uma extensão de resíduos de polialaninas de tamanho variável (Zannini *et al.*, 1997; Hishinuma *et al.*, 2001; Carré *et al.*, 2007). A proteína FOXE1, com 373 resíduos de aminoácidos, é codificada pelo gene *FOXE1*, localizado no cromossoma 9q22.3, que consiste num único exão, não possuindo intrões (Zannini *et al.*, 1997; Hishinuma *et al.*, 2001). Este gene é expresso apenas na tiróide e na hipófise anterior (Zannini *et al.*, 1997). Em embriões *FOXE1*^{-/-}, as células precursoras da tiróide não migram e mantêm-se ligadas ao pavimento da faringe (De Felice *et al.*, 1998).

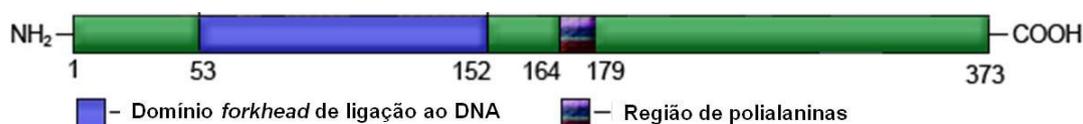


Figura 8 – Diagrama esquemático dos domínios funcionais da proteína FOXE1 humana (adaptado de <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/FOXE1ID47197ch9q22.html>).

Os genes *NKX2-1*, *PAX8* e *FOXE1* são co-expressos num espaço temporal definido nas células precursoras da tiróide em migração. Quando as células entram em diferenciação, ao contrário do que sucede com os genes *NKX2-1* e *PAX8*, a proteína *FOXE1* torna-se indetectável. A correlação entre o silenciamento do gene *FOXE1* e o desencadear da diferenciação da tiróide sugere que este factor de transcrição possa funcionar como um inibidor da diferenciação nas primeiras fases da morfogénese da tiróide (Zannini *et al.*, 1997). Esta repressão ocorre, provavelmente por interferência na activação transcripcional dos genes *TG* e *TPO* pelos factores de transcrição *NKX2-1* e *PAX8*, através de cofactores (Perrone *et al.*, 2000). A presença de *FOXE1* nos precursores das células da tiróide em migração previne a expressão precoce de genes com efeito adverso na migração, por exemplo, genes que regulam a adesão celular (Zannini *et al.*, 1997).

Existe alguma controvérsia em relação ao papel do *FOXE1* na tiróide do adulto. Alguns grupos de investigação mostraram que o *FOXE1* pode funcionar como repressor da transcrição dos genes *TG* e *TPO*, inibindo a actividade transcripcional dos factores de transcrição *NKX2-1* e *PAX8* (Zannini *et al.*, 1997; Perrone *et al.*, 2000). No entanto, um estudo recente (*in vitro*) propôs que o factor de transcrição *FOXE1* teria um papel de “pioneiro”, iniciando eventos que conduzem à abertura da cromatina do promotor do gene *TPO*, permitindo a ligação de outros factores reguladores, durante a diferenciação da tiróide induzida pela TSH (Cuesta *et al.*, 2007).

Como já foi referido, a proteína *FOXE1* possui uma região de resíduos de polialaninas, de tamanho variável (11 a 19 resíduos de alaninas) (Carré *et al.*, 2007). Os alelos com 14 e 16 resíduos de alaninas (Ala) encontram-se na maioria dos indivíduos (>95%). Numa comparação entre indivíduos com disgénese da tiróide (TD) e controlos normais, observou-se uma razão de probabilidade (OR) de 0,44 para o genótipo 14/16 vs 14/14 ($P = 0.004$) e um OR de 0,23 para o genótipo 16/16 vs 14/14 ($P = 0.004$), sugerindo que o número de cópias do alelo 16-Ala estava associada a um efeito protector para a TD (Carré *et al.*, 2007). Num outro estudo com indivíduos com hipotireoidismo congénito (CH), verificou-se que o alelo 16-Ala (genótipo 16/16 ou 14/16) era significativamente mais frequente nos casos do que nos controlos (14/16, $P = 0.008$; 16/16, $P = 0.08$), sugerindo que o número de cópias do alelo 16-Ala estaria associada a um risco para CH (Santarpiá *et al.*, 2007).

Em estudos *in vitro*, o plasmídeo com o gene *FOXE1* com o alelo 16-Ala, na presença de *NKX2-1* e *PAX8*, induziu a transactivação de forma mais intensa do que o alelo 14-Ala, sugerindo que a capacidade de transactivação do *FOXE1* estava dependente do número de resíduos de alaninas (Carré *et al.*, 2007). No entanto, os

estudos da actividade transcripcional do factor de transcrição FOXE1 em função do número de resíduos de alaninas não apresentam resultados consensuais. Por exemplo, num outro estudo, não se verificaram diferenças na activação transcripcional, entre os alelos 11-Ala, 12-Ala e 14-Ala (Hishinuma *et al.*, 2001). Assim, este tema ainda é controverso.

Foram identificadas mutações *missense* (p.A65V e p.S57N) na região altamente conservada, que codifica o domínio *forkhead DNA binding* do gene *FOXE1*, associadas à perda da actividade transcripcional, em indivíduos com agénese da tiróide e hipotireoidismo congénito (Park & Chatterjee, 2005).

Em relação ao papel das variantes do gene *FOXE1* no cancro da tiróide, um estudo de associação, em indivíduos da Islândia com ascendência Europeia, revelou uma forte associação entre o alelo A do rs965513 (G/A), localizado a 57 kb a montante do gene *FOXE1*, e o risco de PTC e FTC (OR = 1,77; $P = 6.8 \times 10^{-20}$). Homozigóticos para o alelo A do rs965513 apresentavam 3,1 vezes maior risco de desenvolver a doença do que os homozigóticos para o alelo G. Como já foi referido na secção 5.1 deste capítulo, homozigóticos para esta variante e para o alelo T do rs944289 (do *locus NKX2-1*) apresentavam 5,7 vezes maior risco de cancro da tiróide. Neste estudo, observou-se ainda que o alelo A do rs965513 era mais frequente em indivíduos diagnosticados com cancro da tiróide em idade mais jovem. (Gudmundsson *et al.*, 2009)

Um outro estudo, realizado na população Espanhola e na população Italiana, mostrou que o alelo A do polimorfismo rs1867277 (G/A), localizado no promotor do gene *FOXE1*, estava associado a uma maior susceptibilidade para o cancro da tiróide (Landa *et al.*, 2009). Takahashi e colaboradores encontraram uma associação dos polimorfismos rs965513 e rs1867277 e o risco de PTC relacionado com exposição a radiação de Chernobil, em indivíduos da Bielorrússia (Takahashi *et al.*, 2010).

Estudos funcionais mostraram que o alelo A do polimorfismo rs1867277 (comparativamente com o alelo G) aumenta a transcrição do gene *FOXE1*, promovendo a ligação de outros factores de transcrição à sequência com este alelo (Landa *et al.*, 2009). Dado que o factor de transcrição FOXE1 tem um papel no controlo da migração das células precursoras da tiróide folicular, Landa e colaboradores sugeriram que um aumento na expressão do gene *FOXE1*, nos carcinomas da tiróide, poderia estar relacionado com uma vantagem na mobilidade das células tumorais, a qual seria incrementada na presença do alelo A do polimorfismo rs1867277 (Landa *et al.*, 2009).

5.3 Factor de transcrição PAX8

A família dos genes *PAX* codifica proteínas de ligação ao DNA, que estão envolvidas na regulação do desenvolvimento de vários tecidos em diferentes espécies (Zannini *et al.*, 1992; Di Palma *et al.*, 2003). O gene *PAX8* humano localiza-se no cromossoma 2q13 e codifica uma proteína com 457 resíduos de aminoácidos (Plachov *et al.*, 1990). O gene *PAX8* tem 12 exões, estando o codão de iniciação localizado no exão 2 (Figura 9). Os exões 3 e 4 codificam o domínio de ligação ao DNA (*paired domain*). O domínio octapéptido é altamente conservado na família dos genes *PAX*. O homeodomínio é responsável pelo reconhecimento e ligação a sequências específicas de DNA, activando ou inibindo a expressão de genes-alvo. A região C-terminal é rica em prolina, treonina e serina, possuindo uma função transactivadora (Plachov *et al.*, 1990; Al Taji *et al.*, 2007).



Figura 9 – Diagrama esquemático dos domínios funcionais da proteína PAX8 humana (adaptado de <http://www.cisreg.ca/cgi-bin/tfe/articles.pl?tfid=530>).

A proteína PAX8 é expressa na tiróide, no rim e no cérebro (Zannini *et al.*, 1992). A sua expressão é detectada nas células precursoras da tiróide no pavimento da faringe e mantém-se presente durante a migração (Plachov *et al.*, 1990). Em embriões de ratinho *PAX8^{-/-}*, as fases iniciais da organogénese decorrem normalmente, mas o primórdio da tiróide é muito pequeno e as células foliculares são quase indetectáveis, sendo a tiróide composta essencialmente por células C (Mansouri *et al.*, 1998). Nestes ratinhos, a expressão do factor de transcrição FOXE1 nunca é detectada nas células da tiróide, sendo um potencial alvo da acção do factor de transcrição PAX8 (Parlato *et al.*, 2004).

O factor de transcrição PAX8 tem um papel fundamental na indução e na manutenção do estado diferenciado das células da tiróide, podendo activar a transcrição dos genes *TG* e *TPO* (Zannini *et al.*, 1992; Miccadei *et al.*, 2002; Di Palma *et al.*, 2003). Nos promotores dos genes *TG* e *TPO*, o PAX8 liga-se a um local próximo da *TATA box*, sobrepondo-se a um dos locais de ligação do NKX2-1 (Zannini *et al.*, 1992). Nos *enhancers* dos genes *TG* e *TPO*, o PAX8 também tem um local de ligação, sobrepondo-se igualmente a um dos locais de ligação do NKX2-1. O promotor do gene *TPO* é preferencialmente activado pelo PAX8 (Civitareale *et al.*, 1989; Kikkawa *et al.*,

1990; Sinclair *et al.*, 1990; Zannini *et al.*, 1992; Damante & DiLauro, 1994; Zannini *et al.*, 1997; Miccadei *et al.*, 2002; Di Palma *et al.*, 2003).

A mutação p.R52P foi associada a hipotiroidismo não-congénito de aparecimento precoce (Al Taji *et al.*, 2007). Mutações inactivantes no gene *PAX8* (p.Q40P, p.C57Y) foram associadas a hipoplasia da tiróide e hipotiroidismo congénito, confirmando o papel essencial deste factor de transcrição no desenvolvimento normal da tiróide (Congdon *et al.*, 2001; Vilain *et al.*, 2001).

Em PTC e ATC, não é detectada a expressão de *PAX8* (Fabbro *et al.*, 1998; D'Elia *et al.*, 2002). O silenciamento do gene *PAX8* parece ser um evento fundamental para a perda de diferenciação observada nos tumores da tiróide (D'Elia *et al.*, 2002). Pasca di Magliano e colaboradores demonstraram que a re-expressão de *PAX8* em linhas celulares da tiróide transformadas é suficiente para activar a expressão endógena do gene *TG* (Pasca di Magliano *et al.*, 2000). No entanto, o factor de transcrição *PAX8* é incapaz de activar a expressão de *TG* na ausência da proteína *NKX2-1* (Pasca di Magliano *et al.*, 2000).

O rearranjo *PAX8/PPAR γ* , t(2;3)(q13;p25), é frequente em FTC e FTA esporádicos (Kroll *et al.*, 2000; Marques *et al.*, 2002; Cheung *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2006).

5.4 Factor de transcrição HHEX

A proteína HHEX foi inicialmente identificada como tendo um papel de regulador transcripcional na diferenciação das células hematopoiéticas. HHEX é um factor de transcrição com 271 resíduos de aminoácidos, que contém um domínio de ligação ao DNA (Figura 10). O gene *HHEX*, que codifica esta proteína, está localizado no cromossoma 10q23 nos humanos, sendo expresso na tiróide e nas células hematopoiéticas (Thomas *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1999; Pellizzari *et al.*, 2000; Soufi *et al.*, 2008). Na tiróide, a expressão deste gene está presente desde a morfogénese (Martinez Barbera *et al.*, 2000; Al Taji *et al.*, 2007), e a sua ausência leva a alterações profundas no número de células precursoras e na morfologia do primórdio. Estas alterações são consistentes com o papel do gene *HHEX* no controlo da proliferação celular e na manutenção da expressão dos genes *NKX2-1*, *FOXE1* e *PAX8* durante o desenvolvimento da tiróide (Parlato *et al.*, 2004; Puppini *et al.*, 2004). A expressão do gene *HHEX* nas células foliculares da tiróide persiste durante a vida adulta (Pellizzari *et al.*, 2000). Em ratinhos *HHEX*^{-/-}, o primórdio da tiróide está ausente ou muito reduzido (Martinez Barbera *et al.*, 2000).



Figura 10 – Diagrama esquemático dos domínios funcionais da proteína HHEX humana (adaptado de Tanaka *et al.*, 2009).

A região N-terminal (resíduos de aminoácidos 1-137) do HHEX é um domínio muito conservado na família, que contém sequências ricas em resíduos de prolina (cerca de 20%), capaz de estabelecer interações proteína-proteína, reprimindo a transcrição de genes-alvo. Na região central (resíduos de aminoácidos 137-196) localiza-se um homeodomínio com 60 resíduos de aminoácidos conservados, que interage com sequências específicas do DNA de genes-alvo. A região C-terminal tem principalmente um papel de ativador (Tanaka *et al.*, 1999; Pellizzari *et al.*, 2000; Soufi *et al.*, 2008). O factor de transcrição HHEX pode reprimir a transcrição de genes que codificam, por exemplo, proteínas envolvidas no controlo do ciclo celular ou em vias de sinalização de factores de crescimento, através da sua ligação a locais nos promotores ou regiões intrónicas. O HHEX pode actuar ainda como repressor do transporte do mRNA ou repressor da tradução de genes necessários à proliferação. Este factor de transcrição pode ainda desempenhar um papel de ativador transcripcional, dependendo do tipo de célula e dos promotores-alvo (Tanaka *et al.*, 1999; Puppini *et al.*, 2003; Soufi *et al.*, 2008). Por exemplo, a proteína HHEX pode activar o seu próprio promotor (Puppini *et al.*, 2003).

O factor de transcrição HHEX tem uma actividade repressora na transcrição do gene *TG*, reconhecendo duas regiões do promotor deste gene, que se sobrepõem aos locais de ligação do NKX2-1 e PAX8. A expressão do *HHEX* anula os efeitos ativadores das proteínas NKX2-1 e PAX8 no promotor do *TG*. (Pellizzari *et al.*, 2000)

Ainda não foram identificadas mutações no gene *HHEX* em humanos (Al Taji *et al.*, 2007). Alterações na expressão deste gene ou distribuição celular alterada estão associadas a várias doenças, incluindo leucemia e vários tipos de cancro (Soufi *et al.*, 2008). A expressão de HHEX nos carcinomas da tiróide está restrita ao citoplasma, enquanto que, no tecido normal e em adenomas da tiróide, a expressão de HHEX é detectada no citoplasma e no núcleo (D'Elia *et al.*, 2002).

5.5 Interações entre os factores de transcrição da tiróide

Mecanismos de retrocontrolo positivo entre os factores de transcrição têm sido propostos como responsáveis pela manutenção da sua expressão nas células foliculares da tiróide adulta (Figura 11). Os factores de transcrição estabelecem redes de auto-regulação através da interacção entre as proteínas e os promotores dos genes (Puppin *et al.*, 2004).

As proteínas NKX2-1 e PAX8 interagem na activação da expressão dos genes *TG* e *TPO*, existindo uma cooperação funcional e um equilíbrio dinâmico entre as duas proteínas para activar o promotor e as regiões *enhancer* de ambos os genes (Fabbro *et al.*, 1998; Miccadei *et al.*, 2002; Di Palma *et al.*, 2003; Altmann *et al.*, 2005).

Estes efeitos activadores dos genes *PAX8* e *NKX2-1* podem ser anulados pelo factor de transcrição FOXE1 (observado nos promotores dos genes *TG* e *TPO*) e pelo factor de transcrição HHEX (observado apenas no promotor do gene *TG*) (Zannini *et al.*, 1997; Pellizzari *et al.*, 2000; Puppin *et al.*, 2003).

A proteína PAX8 aumenta a actividade transcripcional do promotor do gene *HHEX* (Puppin *et al.*, 2004). O factor de transcrição PAX8 tem também como alvo de acção o gene *FOXE1*, uma vez que na ausência de expressão PAX8 nas células precursoras da tiróide, a expressão de FOXE1 é indetectável (Parlato *et al.*, 2004). A montante da região 5'UTR do gene *PAX8* (-90 kb), foi identificado um elemento regulador (*enhancer*), denominado CNS87 (*conserved non-coding sequence 87*), ao qual se liga o factor de transcrição NKX2-1 para regular a sua expressão na tiróide (Nitsch *et al.*, 2010).

A proteína NKX2-1 para além de activar a expressão do gene *PAX8*, regula positivamente a expressão do gene *HHEX* (Puppin *et al.*, 2003). O gene *NKX2-1* é ainda capaz de activar o seu próprio promotor, possuindo vários locais de ligação da sua própria proteína 2.4 kb a montante do codão de iniciação (Oguchi & Kimura, 1998). A auto-regulação não é um fenómeno único do gene *NKX2-1*.

Para além dos efeitos inibitórios referidos atrás, a proteína HHEX pode activar o seu próprio promotor, cooperando com as proteínas NKX2-1 e PAX8 nesta activação (Puppin *et al.*, 2003; Puppin *et al.*, 2004).

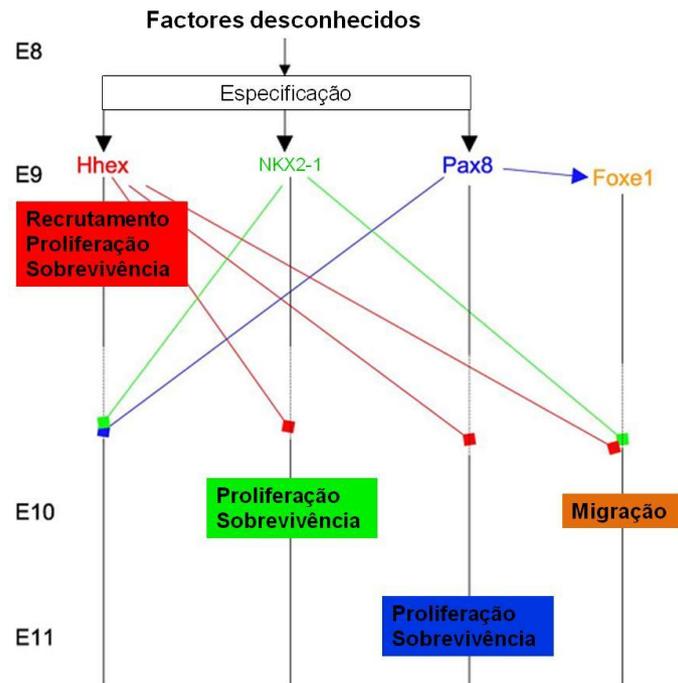


Figura 11 – Diagrama esquemático da interação entre os factores de transcrição (adaptado de Parlato *et al.*, 2004). Os factores de transcrição e as funções estão representados em diferentes cores. Os factores de transcrição podem estar envolvidos na iniciação (seta) ou manutenção (quadrado) da expressão de outros factores.

II. OBJECTIVOS

Pretendeu-se neste projecto identificar alterações moleculares envolvidas na susceptibilidade para o FNMTC, recorrendo ao estudo de genes candidatos. Deste modo, procedeu-se à investigação de variantes genéticas em genes que codificam factores de transcrição específicos da tiróide, para determinar qual a sua contribuição para o cancro da tiróide familiar. Os objectivos específicos foram os seguintes:

1. Realizar uma extensa pesquisa de variantes genéticas nos genes que codificam os factores de transcrição NKX2-1, FOXE1, HHEX e PAX8, através da sequenciação do DNA constitucional dos probandos de 60 famílias com FNMTC;
2. Desenvolver estudos funcionais, utilizando técnicas de expressão *in vitro*, para investigar o efeito das variantes genéticas potencialmente patogénicas identificadas na oncogénese na tiróide.

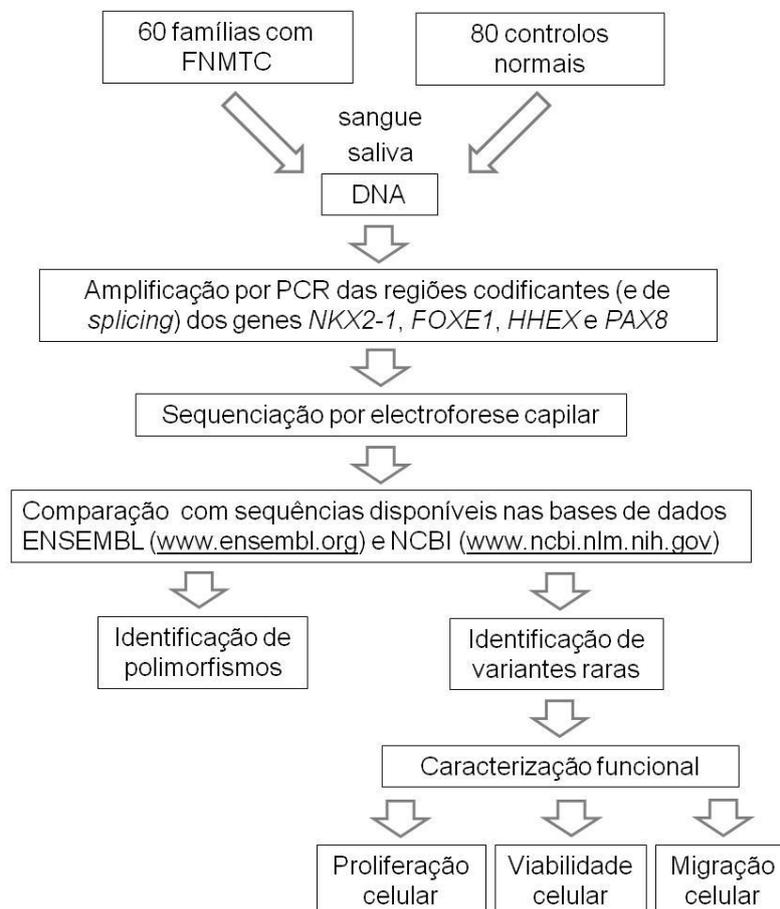
A identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTC possibilitará o diagnóstico genético precoce nas famílias afectadas e poderá contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares básicos envolvidos na tumorigénese.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostras Biológicas

No presente trabalho, foram estudados 60 casos com história familiar conhecida de cancro da tiróide (FNMTC) e 80 controlos normais da população Portuguesa. A recolha de amostras biológicas (sangue periférico e saliva) foi realizada após consentimento informado. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil.

O fluxograma que se segue resume o trabalho desenvolvido:



2. Extracção de DNA a partir de sangue periférico

Para a extracção de DNA a partir de leucócitos de sangue periférico, colheram-se cerca de 5 mL de sangue periférico para um tubo com EDTA, armazenando-o a -70°C quando não foi processado num período de 24h. Utilizou-se o *CITOGENE DNA BLOOD KIT* e seguiram-se as instruções recomendadas pelo fabricante, com algumas modificações.

Transferiu-se o sangue para um tubo de 50 mL e adicionou-se 9 mL da solução de lise RBC (*red-blood cells*), que promove a lise dos glóbulos vermelhos. Incubou-se a solução durante 10 minutos à temperatura ambiente, agitando-se ocasionalmente. Centrifugou-se a 3000 rpm (*ependorf Centrifuge 5810R*, raio do rotor = 180 mm) durante 10 minutos, à temperatura ambiente, obtendo-se um *pellet* de leucócitos. Desprezou-se o sobrenadante e agitou-se vigorosamente no vortex para ressuspender as células. Adicionou-se 4 mL da solução de lise celular, que promove a lise dos leucócitos. Homogeneizou-se e incubou-se a 37°C , durante 30 minutos, até a solução ficar homogénea.

Para precipitar as proteínas, adicionou-se ao lisado celular 1,5 mL de solução de precipitação de proteínas. Agitou-se vigorosamente no vortex, para promover a agregação das proteínas. Centrifugou-se a 3000 rpm (*ependorf Centrifuge 5810R*) durante 10 minutos.

Após a precipitação das proteínas, retirou-se o sobrenadante (DNA) para um novo tubo e adicionou-se 5 mL de isopropanol puro. Agitou-se lentamente a solução por inversão até aparecer uma “nuvem branca” de DNA. Com uma ansa estéril, recolheu-se o DNA e lavou-se em 1 mL de solução de etanol 70% (v/v). Secou-se o DNA na ansa ao ar. Mergulhou-se a ansa em 250-500 μL de solução de hidratação do DNA, dependendo da quantidade de DNA. Incubou-se a 65°C , durante 30 minutos para rehidratar o DNA. Guardou-se a 4°C , durante a noite e quantificou-se a concentração de DNA no dia seguinte. Para um armazenamento mais longo, guardou-se a solução de DNA a -20°C .

3. Extracção de DNA a partir de saliva

A colheita da saliva foi feita utilizando zaragatoas. Para a extracção de DNA a partir de saliva foi utilizado o *innuPREP Swab DNA KIT (Analytik Jena, Alemanha)* e seguiram-se as instruções recomendadas pelo fabricante com algumas modificações.

Cortou-se a extremidade da zaragatoa para um tubo de 1.5 mL e adicionou-se 400 μL de solução de lise TLS e 25 μL de proteinase K (PK). Para facilitar a lise das células, incubou-se durante 30 minutos a 50°C , agitando vigorosamente no vortex,

ocasionalmente, durante a incubação. Transferiu-se o conteúdo para a coluna *pre-filter*, incluindo a zaragatoa. Centrifugou-se a 12000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95 mm) durante 1 minuto à temperatura ambiente. Rejeitou-se a coluna e adicionou-se 400 µL de solução de ligação TBS ao eluído. Transferiu-se o conteúdo para uma coluna *spin filter* e centrifugou-se a 12000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 2 minutos. Desprezou-se o tubo colector e transferiu-se a coluna para um novo tubo colector.

Adicionou-se 500 µL de solução de lavagem HS e centrifugou-se a 12000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto. Desprezou-se o tubo colector e transferiu-se a coluna para um novo tubo colector. Adicionou-se 750 µL de uma segunda solução de lavagem MS e centrifugou-se a 12000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto. Desprezou-se o tubo colector e transferiu-se a coluna para um novo tubo colector. Para remover os resíduos de etanol, voltou-se a centrifugar a 12000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto. Para a eluição do DNA, adicionou-se 200 µL de solução de eluição (*Elution Buffer*) e incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 8000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto para recuperar o DNA. Uma segunda eluição aumenta a quantidade de DNA recuperado. Guardou-se a solução de DNA a 4°C, durante a noite e quantificou-se a concentração de DNA no dia seguinte. Para um armazenamento mais longo, guardou-se a solução de DNA a -20°C.

4. Extracção de RNA

A extracção e purificação de RNA total foi efectuada de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante do *Rneasy Mini Kit* (*QIAGEN*, Alemanha). Este método utiliza soluções com desnaturantes fortes, sais de guanidina (como os tampões RLT e RW1), no fraccionamento e homogeneização da amostra, permitindo a inibição imediata das ribonucleases (RNases) endógenas, enzimas muito resistentes e estáveis que degradam o RNA. A contaminação por RNases é ainda evitada pelo uso de soluções e materiais tratados especificamente com inibidores destes enzimas (como o dietilpirocarbonato – DEPC) e pelo uso de materiais descartáveis e esterilizados (Sambrook & Russel, 2001).

4.1. Extracção de RNA de células PCCL3

Transferiu-se o volume de suspensão celular correspondente a $\sim 1,5 \times 10^6$ células para um tubo de 1,5 mL e centrifugou-se a 1200 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95 mm) durante 6 minutos, à temperatura ambiente. Lavou-se o *pellet* celular com 700 µL de uma solução salina de PBS sem magnésio e sem cálcio

(*Phosphate Buffared Saline -Mg²⁺/Ca²⁺*; GIBCO™, Invitrogen Corporation, Reino Unido) e voltou-se a centrifugar nas mesmas condições. De seguida, ressuspendeu-se o *pellet* celular em 600 µL de tampão de lise RLT com β-mercapto-etanol 10% (v/v). O β-mercapto-etanol desnatura as RNases libertadas durante a lise celular. Com uma seringa com agulha 20 G, homogeneizou-se o lisado. Quando o RNA não foi extraído de imediato, armazenou-se a -70°C.

Após homogeneização, centrifugou-se o lisado celular a 14000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 2 mL e adicionou-se igual volume de etanol a 70% (v/v; em H₂O estéril tratada com DEPC), para permitir as condições ideais para a ligação do RNA à membrana de sílica-gel. Inverteu-se o tubo suavemente para homogeneizar e transferiu-se rapidamente toda a amostra (até 700 µL) para uma coluna *Rneasy*, num tubo de 2 mL. Esta coluna contém uma membrana de sílica-gel que permite a remoção do DNA. Após 2 minutos, centrifugou-se a 10000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 30 segundos. Voltou-se a aplicar o eluído na mesma coluna e, após 1 minuto, centrifugou-se nas mesmas condições. Após a segunda centrifugação, rejeitou-se o eluído.

Adicionou-se 700 µL de tampão RW1 à coluna *Rneasy* e centrifugou-se a 10000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 30 segundos, para lavar a coluna. Transferiu-se a coluna para um novo tubo colector de 2 mL e adicionaram-se 500 µL de tampão RPE, centrifugando a 10000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 30 segundos. Rejeitou-se o eluído e adicionou-se novamente 500 µL de tampão RPE. Para remover completamente os resíduos de etanol da membrana, centrifugou-se durante 2 minutos a 10000 rpm e, após rejeitar o eluído, centrifugou-se novamente durante 1 minuto a 14000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*).

Transferiu-se a coluna para um novo tubo de 1,5 mL e pipetou-se 30-50 µL de H₂O *RNase-free* directamente para a membrana de sílica-gel. Após 5 minutos, centrifugou-se a 11000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto, para eluir o RNA. Para obter uma maior concentração de RNA, foi realizada uma segunda eluição utilizando o primeiro eluído.

5. Quantificação espectrofotométrica do DNA e RNA

Para a quantificação do DNA e RNA, recorreu-se ao doseamento espectrofotométrico. Este método permite determinar a quantidade de ácidos nucleicos, quantificando a radiação ultravioleta (UV) absorvida pelas bases nucleotídicas que fazem parte da sua cadeia. A Lei de Lambert-Beer enuncia que, em condições ideais,

a concentração de uma substância é directamente proporcional à luz absorvida por esta, num determinado comprimento de onda e numa espessura fixa de material.

As leituras espectrofotométricas foram efectuadas a 260 e 280 nm (*Thermo Scientific NanoDrop 2000*, EUA), que são os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorção dos ácidos nucleicos e das proteínas, respectivamente. Para avaliar o grau de pureza das soluções de ácidos nucleicos, calcula-se a razão entre as absorvências do DNA e do RNA e a absorvência das proteínas, sendo 1,8 o valor mínimo da razão numa amostra pura, em ambos os casos.

A quantificação é efectuada considerando que uma unidade de absorvência, ao comprimento de onda de 260 nm, corresponde a 50 µg/mL de DNA e 40 µg/mL de RNA, numa solução de 1 centímetro de espessura (Sambrook & Russel, 2001). Assim, pode-se determinar a concentração de cada amostra, tendo em conta o factor de diluição, segundo a seguinte relação:

$$[\text{DNA}](\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times 50 \times \text{factor de diluição}$$

$$[\text{RNA}](\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times 40 \times \text{factor de diluição}$$

6. Amplificação de DNA por PCR

Para a amplificação *in vitro* de uma região específica do DNA, recorreu-se a uma reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*), uma técnica originalmente concebida por Saiki e colaboradores (1985) e modificada em 1988 (Saiki *et.al*, 1988).

Neste trabalho, para as reacções de PCR, utilizou-se a seguinte composição para um volume final de 25 µL: 100 ng de DNA, 10 pmol de *primer forward* (cadeia sense) e de *primer reverse* (cadeia anti-sense) (*Invitrogen*TM, *Life Technologies*, EUA), solução tamponada de PCR (1x concentrada; *Invitrogen*TM), 0,2 mM de desoxirribonucleótidos (dNTPs; *Invitrogen*TM), 1 a 2 mM de MgCl₂ (dependendo das condições óptimas para cada reacção; *Invitrogen*TM), 1 U de *Taq DNA polymerase* (*Invitrogen*TM) e água bi-distilada estéril para perfazer o volume final. Nalgumas reacções, teve de ser adicionado dimetilsulfóxido (DMSO, 3-6%), para aumentar o rendimento e a especificidade da reacção. Para cada reacção ou conjunto de reacções, foi realizado sempre um controlo negativo, constituído por uma mistura reaccional idêntica, preparada em simultâneo com as outras reacções e sujeita às mesmas condições, mas contendo água em substituição do DNA, para detecção de possíveis contaminações.

Num termociclador (*Biometra*, Alemanha), as reacções processaram-se com uma desnaturação inicial do DNA, durante 5 minutos a 95°C, seguindo-se 35 a 37

ciclos de amplificação. Cada ciclo de amplificação englobou uma desnaturação do DNA a 95°C durante 45 segundos, uma hibridação dos *primers* com o DNA à temperatura de *annealing* de 56-61°C, durante 35 segundos a 1 minuto (dependendo das condições óptimas para cada reacção) e uma polimerização das novas cadeias a 72°C durante 40 segundos a 1 minuto. Tempos de extensão mais longos foram utilizados para amplificar fragmentos maiores. Após os ciclos de amplificação, processou-se uma extensão final a 72°C, durante 10 minutos.

Para cada par de *primers*, optimizaram-se as condições de PCR, testando diferentes graus de estringência para a reacção, conjugando diferentes concentrações de MgCl₂ e temperaturas de *annealing* (Quadros I, III, IV e V do capítulo VIII – Anexos).

7. Transcrição reversa do RNA seguida de PCR (RT-PCR)

O RNA total purificado foi utilizado para a síntese de cadeia simples do DNA complementar (cDNA). O cDNA é obtido pelo uso de *primers* que hibridam com os diferentes mRNAs da célula, permitindo a extensão por uma polimerase de DNA dependente de RNA, a transcriptase reversa. O cDNA serve de cadeia molde para a posterior amplificação dos exões dos genes que se pretendem analisar.

Para cada síntese de cDNA, utilizou-se o volume correspondente a 1 µg de RNA, ao qual se adicionam 1 µL de *random primers* (*Invitrogen*TM) e H₂O-DEPC até perfazer um volume de 9,5 µL. Para a desnaturação de ligações intramoleculares no mRNA, a reacção foi incubada durante 10 minutos, a 70°C. Após esta incubação, o tubo da reacção foi colocado em gelo e adicionou-se tampão *1st strand* pH 8,3 1x concentrado (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂; *Invitrogen*TM), 0,5 mM de dNTPS-DEPC (*Invitrogen*TM), 10 mM de ditiotreitól (DTT; *Invitrogen*TM), 20 U de inibidor de RNase (RNase Out, *Invitrogen*TM) e 200 U de Transcriptase Reversa SuperScript II RT (*Invitrogen*TM).

Incubou-se a reacção durante 1h30 a 37°C e posteriormente a 95°C, durante 5 minutos, para inactivar as enzimas intervenientes. Por fim, guardou-se o cDNA sintetizado a -20 °C. Para cada reacção ou conjunto de reacções de síntese foi realizado um controlo negativo, constituído por uma mistura reaccional idêntica, preparada em simultâneo com as outras reacções e sujeita às mesmas condições, mas contendo água em substituição do RNA, para detectar possíveis contaminações.

Para amplificar o cDNA, juntou-se 1,5 µL do cDNA sintetizado e realizou-se o RT-PCR seguindo o protocolo indicado para a reacção de PCR (Secção 6).

8. Electroforese dos produtos de PCR em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose é um técnica que permite separar fragmentos de DNA. A concentração de agarose em gel mais utilizada foi de 2% (p/v), para separar fragmentos entre 100-600 pares de bases (bp). Para a preparação do gel, dissolveu-se a agarose necessária em solução tamponada TBE 1x a pH 8,0 (89 mM Tris-base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8,0), aquecendo a mistura para dissolução completa da agarose. Após a adição de brometo de etídio para uma concentração final de 0,5 µg/mL, verteu-se a solução num molde previamente preparado com os pentes necessários para definir o número de poços pretendidos no gel. Após polimerização, o gel foi submerso em solução tamponada TBE 1x a pH 8,0, numa tina de electroforese horizontal.

Para avaliar a eficiência das reacções de PCR, aplicou-se 3 µL de cada produto de reacção juntamente com 0,5 µL de solução de deposição (*DNA loading dye* 6x; *Fermentas*, EUA), nos poços do gel. Para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados aplicou-se, em simultâneo, um marcador de peso molecular (pUC 8, *Fermentas*) num outro poço. As separações electroforéticas decorreram sob uma diferença de potencial constante de cerca de 130 V, durante 30 a 40 minutos. As bandas correspondentes ao DNA amplificado foram expostas a radiação UV (300 nm) para visualização e exposição fotográfica, num transiluminador, acoplado a uma câmara de vídeo e a um sistema informático (*BioDocAnalyze*, *Biometra*, Alemanha).

9. PCR quantitativo em tempo real

O PCR em tempo real permite a quantificação da expressão de um gene, determinando valores durante a fase exponencial da reacção. Existem dois métodos de detecção: *TaqMan* e *SYBR Green* (*Applied Biosystems*, EUA). O fluoróforo *SYBR Green* tem a capacidade de se ligar às duplas cadeias de DNA. Durante o PCR, a polimerase amplifica a região alvo, gerando novas cópias de dupla cadeia de DNA. À medida que o fluoróforo se liga a essas novas cadeias, a intensidade da fluorescência aumenta proporcionalmente à quantidade de produto de PCR produzido (Figura 12).

Antes que os níveis de expressão possam ser quantificáveis é necessário definir um limite base e um valor de *threshold*. No início do PCR, existe um baixo sinal de fluorescência. Esta linha de base é normalmente definida entre os 3 e 15 ciclos. O ciclo de *threshold* (*threshold cycle* - Ct) é definido como o ponto (número de ciclos) em que a fluorescência excede essa linha de base.

A quantificação relativa é usada para analisar variações na expressão génica numa dada amostra em relação a uma amostra (ou *pools* de amostras) de referência,

designada por calibrador. Desta forma, a quantidade de ácido nucleico alvo em cada amostra é expressa relativamente à quantidade presente no calibrador. No método curva-padrão, uma amostra de concentração conhecida, que expressa o gene em estudo, é utilizada na construção de uma curva-padrão, ou seja, uma relação linear entre o Ct e o logaritmo da quantidade inicial de ácido nucleico alvo na amostra padrão. A quantidade desconhecida presente numa amostra é assim determinada com base na curva preparada a partir de uma série de diluições de amostra padrão.

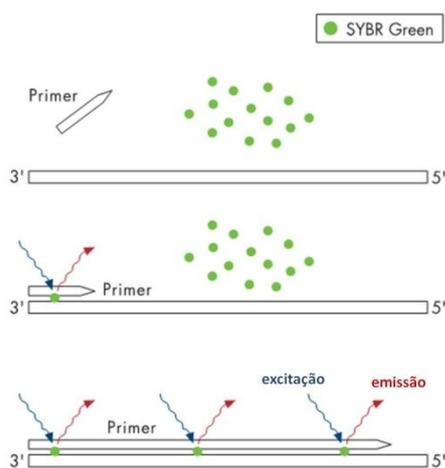


Figura 12 – Representação esquemática do sistema SYBR Green (adaptado de www.quiagen.com).

Para corrigir variações na quantidade de RNA em cada amostra, e nas eficiências das reacções de transcrição reversa e PCR, é amplificado em paralelo, para cada amostra, um controlo endógeno, ou seja, um segmento de mRNA que esteja presente em todas as amostras em estudo, em quantidade aproximadamente constante e que não seja afectada pelo tratamento experimental. Assim, é usado como controlo endógeno um gene constitutivo (*housekeeping*) para o qual é também construída uma curva padrão. Desta forma, para cada amostra em estudo (incluindo o calibrador), a quantidade de ácido nucleico alvo é normalizada, dividindo a quantidade obtida através da respectiva curva padrão (para o gene em estudo) pela quantidade de referência endógena (Ct/quantidade). Os valores de expressão relativa são por fim determinados, dividindo cada valor normalizado, relativo ao RNA alvo em cada amostra, pelo valor normalizado do calibrador.

Esta técnica foi utilizada para quantificar a expressão do gene *FOXE1* humano (*hFOXE1*) nas *pools* e nos 6 clones isolados das células PCCL3 (Secção 13.7 deste capítulo). As amostras foram analisadas relativamente à expressão do gene *housekeeping* β -actina de *Rattus norvegicus* (referência endógena) e do gene *hFOXE1*. Para construir a curva de calibração do gene β -actina foram utilizadas 5 concentrações diferentes da amostra padrão (10; 5; 2; 0,4; 0,08 ng). A curva de calibração do gene *hFOXE1* foi construída com 7 concentrações diferentes da amostra padrão (10; 2; 0,4; 0,08; 0,016; 0,0032; 0,00064 ng). Para cada gene em estudo foi incluído um controlo negativo, sem cDNA (NTC – *non-template control*). As amplificações por PCR de cada amostra foram realizadas em triplicado, em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical 96-well reaction plate*, *Applied Biosystems*).

Para cada amostra em estudo foi adicionada a mistura reaccional *Power SYBR Green Master Mix 2x* (que contém o fluoróforo SYBR Green, dNTPs, a referência passiva ROX e a polimerase *AmpliTaQ Gold DNA polimerase* num tampão de reacção adequado; *Applied Biosystems*), 10 pmol/ μ L *primer forward* e *reverse* (*Invitrogen*TM), 0,5 ng de cDNA das amostras em estudo (diluição de 1:400) e H₂O até perfazer um volume total de 20 μ L. Após uma desnaturação de 95°C durante 10 minutos, realizaram-se 45 ciclos de: 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. O PCR em tempo real foi realizado no ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (*Applied Biosystems*). Os dados foram analisados pelo *software* SDS (*Applied Biosystems*). A quantificação da expressão do gene *FOXE1* nas *pools* e clones de células PCCL3 com expressão estável de diferentes plasmídeos foi realizada pela Dra. Rute Tomaz do Grupo Endocrinologia Molecular.

10. Sequenciação automática

A sequenciação automática baseia-se num método enzimático, em que uma polimerase de DNA sintetiza cadeias simples de DNA, catalisando a ligação fosfodiéster entre o grupo 3' hidroxilo livre do primer e o grupo 5' fosfato do 2'-desoxinucleótido (dNTPs) seguinte, complementar ao da cadeia molde (Sanger *et. al*, 1977). Nesta reacção, a síntese de DNA ocorre na presença de análogos dos dNTPs, os 2',3'-didesoxinucleótidos trifosfatado (ddNTPs), que não possuem o grupo hidroxilo no carbono 3'. Desta forma, a incorporação de ddNTPs marcados com fluorescência, leva a uma terminação prematura da síntese da cadeia, por ausência do grupo 3' hidroxilo necessário para nova ligação.

Os fragmentos de DNA sintetizados podem ser separados por electroforese capilar. Durante a separação electroforética dos fragmentos (de acordo com o seu tamanho), à medida que o DNA é atingido por um feixe de laser, o sinal de fluorescência correspondente a cada ddNTP vai sendo detectado, permitindo a identificação de toda a sequência de bases. Neste trabalho, para a sequenciação de produtos de PCR por "amplificação linear", utilizou-se uma polimerase de DNA termoestável, na presença de apenas um dos *primers* (*forward* ou *reverse*), de dNTPs e de ddNTPs marcados com fluorocromos.

A preparação das amostras para a sequenciação está dividida em 4 passos: purificação dos produtos de PCR, reacção de sequenciação, precipitação e ressuspensão dos produtos de sequenciação.

10.1. Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi efectuada utilizando o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Bioscience, GE Healthcare, EUA), que pode ser usado para purificar uma solução de PCR ou uma banda excisada do gel de agarose (quando existem produtos de PCR inespecíficos).

A uma coluna GFX, inserida num tubo colector, adicionaram-se 500 µL de *capture buffer* e, de seguida, a solução de produto de PCR. Para purificação de bandas de gel de agarose, adicionaram-se 650 µL de *capture buffer* ao *ependorf* com a banda e incubou-se a 50°C durante 10 minutos ou até dissolver a agarose. Agitou-se vigorosamente no vortex e transferiu-se para uma coluna GFX. Em ambos os casos, após a homogeneização, centrifugou-se a 14000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95 mm) durante 45 segundos, desprezando o eluído.

Adicionaram-se 500 µL de solução de lavagem (*wash buffer*) e centrifugou-se a 14000 rpm, durante 45 segundos (*ependorf Centrifuge 5417C*). Transferiu-se a coluna para um novo tubo de 1,5 mL e aplicaram-se entre 30-50 µL de tampão de eluição (*elution buffer type 6*), dependendo da intensidade da banda no gel. Após incubação durante 2 minutos, à temperatura ambiente, centrifugou-se a 14000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto, para recuperar o produto de PCR purificado. Por fim, aplicaram-se os produtos num gel de agarose para quantificação visual da sua intensidade e armazenou-se a -20°C.

10.2. Reacções de Sequenciação

As reacções de sequenciação foram executadas seguindo o protocolo do *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems). Para cada amostra preparou-se, em gelo, a seguinte reacção para um volume final de 20 µL: uma solução tamponada (1x), 3,2 pmol de *primer forward* ou *primer reverse*, 1-6 µL de Big Dye (dependendo do tamanho do produto a sequenciar, Quadro 2), 10 ng de produto PCR purificado (ou mais, dependendo do rendimento da reacção) e H₂O destilada até perfazer o volume final.

Quadro 2 – Quantidades de *Big Dye* utilizadas na reacção de sequenciação, dependendo do tamanho do produto de PCR.

Produto de PCR (pb)	Quantidade de <i>Big Dye</i> (µL)
Até 100	1
100-500	2
500-650	3

Transferiram-se as reacções para um termociclador (*T3 thermocycler, Biometra*). As reacções de sequenciação foram realizadas em 25 ciclos, precedidos por uma desnaturação inicial de 3 minutos a 96°C. Cada ciclo de amplificação englobou uma

desnaturação a 96°C durante 10 segundos, uma hibridação do *primer* à temperatura de *annealing* de 50°C, durante 5 segundos e uma extensão a 60°C durante 4 minutos. Após os ciclos de amplificação, guardou-se os produtos da reacção de sequenciação a 4°C.

10.3. Precipitação dos produtos de sequenciação

Os ddNTPs marcados que não são incorporados podem interferir na interpretação da sequenciação, sendo necessários removê-los antes da análise das amostras por electroforese capilar. A purificação das reacções de sequenciação foi feita através de precipitação com Etanol/EDTA/Acetato de Sódio, conforme descrito no protocolo do *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*.

Para cada reacção, juntou-se num tubo *ependorf* de 1,5 mL: 2 µL de 125 mM EDTA pH 8,0, 2 µL de 3M acetato de sódio pH 4,6 e 50 µL de etanol absoluto. O EDTA inibe a actividade da enzima da reacção de sequenciação, o acetato de sódio e o etanol absoluto diminuem a solubilidade do DNA, favorecendo a precipitação. A esta mistura adicionou-se o produto da reacção de sequenciação, agitou-se vigorosamente no vortex e incubou-se durante 15 minutos, à temperatura ambiente. No final desta incubação, centrifugou-se a 14000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417R*, raio do rotor = 95 mm), durante cerca de 40 minutos, a 4°C. A baixa temperatura favorece a precipitação dos produtos das reacções de sequenciação.

Após a centrifugação, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de Etanol a 70%, para remover os sais acumulados. Agitou-se no vortex e voltou-se a centrifugar a 14000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417R*), durante 15 minutos, a 4°C. De seguida, removeu-se completamente o sobrenadante e secou-se o *pellet* num banho seco a 37°C, durante 5 minutos. Guardou-se o *pellet* de DNA a 4°C por um período máximo de 2 meses.

10.4. Análise dos produtos de sequenciação por electroforese capilar

Os *pellets* de DNA resultantes das reacções de sequenciação foram ressuspendidos em 15 µL de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*). Transferiram-se as amostras para uma placa de 96 poços (PLATEMAX, *AXYGEN*, EUA) e desnaturou-se a 95°C durante 10 minutos, colocando-a imediatamente em gelo durante 10 minutos. De seguida, centrifugou-se à velocidade de 1200 rpm (*ependorf Centrifuge 5810R*, raio do rotor = 180 mm) durante 2 minutos.

As amostras a sequenciar foram transferidas para o sequenciador automático *ABI Prism™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* e submetidas a electroforese capilar durante 30-50 minutos.

O programa *Sequencing Analysis 3.4.1 (Applied Biosystems)* foi utilizado para converter os sinais de fluorescência detectados em electroferogramas, que representavam a sequência do DNA analisado. Posteriormente, recorreu-se ao *software Variant reporter v1.0 (Applied Biosystems)* para análise das sequências obtidas.

Os *softwares* Polyphen e SIFT são ferramentas que prevêm o possível efeito da substituição de um resíduo de aminoácido, através do alinhamento da proteína em várias espécies. Os *softwares* BDGP, NetGene2 e ASSP foram utilizados para prever possíveis alterações no mecanismo de *splicing*.

11. Análise de sequências de microssatélites por electroforese capilar

Os microssatélites foram amplificados pela técnica de PCR, utilizando *primers forward* marcados com um fluorocromo na extremidade 5', como TET (tetracloro-6-carboxi-fluoresceína) ou FAM (6-carboxi-fluoresceína) (*Invitrogen*TM) (Quadro II do capítulo VIII – Anexos). Os fluorocromos ao serem excitados por um laser emitem um sinal, que é detectado pelo sistema e convertido num electroferograma. Este electroferograma representa os picos de fluorescência das amostras e do calibrador interno, TAMRA (6-carboxitetrametil-rodamina; *Applied Biosystems*), em função do tempo. Deste modo, é possível determinar o tamanho dos fragmentos amplificados por PCR.

Para amplificar a região com o microssatélite, seguiu-se o protocolo indicado para a reacção de PCR (Secção 6 deste capítulo). Após a reacção de PCR, para cada amostra, adicionou-se 0,5 µL de produto de PCR de microssatélites, a uma mistura de 0,5 µL de marcador TAMRA e 12 µL de formamida (*Applied Biosystems*). Estas amostras foram desnaturadas a 95°C durante 10 minutos, sendo colocadas imediatamente em gelo, durante 5 minutos, para impedir a renaturação das cadeias.

A detecção dos marcadores foi realizada no sequenciador automático *ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. O programa *GeneScan Analysis Software v.3.1 (Applied Biosystems)* foi utilizado para converter os sinais de fluorescência detectados em electroferogramas.

12. Vectores recombinantes

12.1. Preparação do plasmídeo pcDNA3-FOX E1-14Ala e 16Ala

Para a preparação de cada vector recombinante, realizou-se numa primeira etapa a ligação de um fragmento específico de DNA (gerado por PCR) a um vector (neste trabalho utilizaram-se plasmídeos). O plasmídeo recombinante foi inserido artificialmente em bactérias (transformação), que proliferaram em cultura, resultando na amplificação do plasmídeo.

Neste trabalho, prepararam-se, numa primeira etapa, os plasmídeos pcDNA3 (Figura 13) com a sequência completa do cDNA humano do gene *FOX E1* com 14 e 16 resíduos de alaninas, para posterior mutagénese e transfecção de células PCCL3. A construção do plasmídeo e a mutagénese dirigida foi realizada pela Dra. Rute Tomaz do Grupo Endocrinologia Molecular.

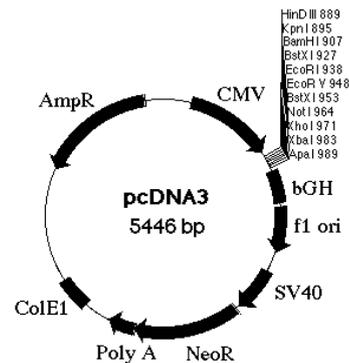


Figura 13 – Imagem do plasmídeo pcDNA3 (<http://life.nthu.edu.tw/~rrandd/90s1/b881675/summer/method1.htm>).

12.2. Preparação do plasmídeo pcDNA3-FOX E1-16Ala-A248G

A variante c.743C>G localizada no gene *FOX E1* traduz-se na substituição de um resíduo de alanina (Ala) por um resíduo de glicina (Gly) no codão 248 deste gene (p.A248G). A variante p.A248G foi introduzida por mutagénese dirigida no plasmídeo pcDNA3-FOX E1-16Ala. Utilizou-se o *QuikChange XL site-directed mutagenesis kit* (*Stratagene*, EUA), de acordo com o protocolo que se segue:

Realizou-se uma reacção com volume final de 50 µL contendo 150 ng de DNA do plasmídeo pcDNA3-FOX E1-16Ala, tampão de reacção (1x concentrado; *Invitrogen*TM), 125 ng de *primers forward* e *reverse* com a mutação pretendida (*Invitrogen*TM), 0,2 mM de dNTPs (*Invitrogen*TM), 2,5 U de polimerase de DNA *Pfu turbo* (*Invitrogen*TM) e H₂O bidestilada esterilizada até perfazer o volume final. As condições utilizadas para a amplificação por PCR consistiram numa desnaturação a 95°C durante 30 segundos, seguindo-se 16 ciclos a 95°C durante 30 segundos, a 55°C durante 60 segundos e a 68°C durante 10 minutos. Concluídos os 12 ciclos da reacção de mutagénese, a mistura foi mantida a 4°C.

12.3. Transformação de bactérias quimicamente competentes

Utilizaram-se as bactérias *Escherichia Coli* TOP10 (50 µL/tubo stock) do Kit *One Shot (Invitrogen™)*. Adicionou-se, em gelo, 1 µL de DNA plasmídeo às bactérias, agitando um pouco o tubo para homogeneizar. Deixou-se 30 minutos em gelo, após os quais se colocou a suspensão bacteriana a 42° C, durante 40 segundos, e depois, novamente, em gelo durante 5 minutos, para gerar um choque térmico que permite a entrada do DNA plasmídico nas bactérias. Adicionou-se 500 µL de meio LB (*Lysogeny broth*) sem ampicilina e deixou-se a incubar no agitador a 37 °C, durante 1 hora, com agitação a 220 rpm (*Gallenkamp Orbital Incubator, Sanyo, Reino Unido*). Seguidamente, espalhou-se a suspensão bacteriana em placas de LB-ágar (com ampicilina na concentração final de 100 µg/mL). Colocaram-se as placas invertidas numa estufa a 37 °C, durante a noite. O plasmídeo pcDNA3 inclui o gene *AmpR*, que confere resistência à ampicilina. A ampicilina vai actuar como um marcador selectivo, e desta forma só as bactérias transformadas vão crescer num meio com ampicilina.

Após o crescimento nas placas de LB-ágar, seleccionaram-se as colónias pretendidas. Cada colónia individual foi levemente picada com uma ponta descartável e inoculada em 3 mL de LB, com ampicilina à concentração final de 100 µg/mL. Incubaram-se as culturas a 37°C, durante a noite com agitação permanente.

Procedeu-se à lise alcalina celular, que permite recuperar o DNA plasmídico, e confirmou-se a presença da mutação no plasmídeo, por sequenciação automática. Para obter maior quantidade de DNA plasmídico utilizou-se *QIAGEN plasmid Maxikit (Qiagen; Secção 12.4 deste capítulo)*.

12.4. Preparação de DNA plasmídico em larga escala (Maxiprep)

Para a preparação do DNA plasmídico em larga escala utilizou-se o *QIAGEN plasmid Maxikit (Qiagen)*, de acordo com o protocolo que se segue:

Após crescimento das bactérias transformadas em *Erlenmeyers* de 2 litros, transferiu-se o seu conteúdo para frascos de 250 mL (Sorvall, *GMI Inc., EUA*) e centrifugou-se a 6000 rpm, utilizando o rotor GSA (centrífuga Sorvall RC-5C, *Biotech, GMI Inc., raio do rotor = 155 mm*), durante 15 minutos, à temperatura de 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* bacteriano em 10 mL de uma solução de 50mM Tris/HCl pH 8,0 e 10 mM EDTA com RNase A (100 µg/mL). Transferiu-se a solução para um tubo de 50 mL (Sorvall) e adicionou-se 10 mL de uma solução de lise, composta por 200 mM NaOH e 1% SDS (p/v), incubando durante 5 minutos. Adicionou-se 10 mL de tampão de neutralização (3M acetato de potássio pH 5,5), homogeneizou-se a solução por inversão e incubou-se 20 minutos, em gelo.

Centrifugou-se a 16000 rpm (Sorvall RC-5C/rotor SS34, raio do rotor = 115 mm) durante 30 minutos, à temperatura de 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para tubos Sorvall de 50 mL. Centrifugou-se a 16000 rpm (Sorvall RC-5C/rotor SS34) durante 15 minutos, à temperatura de 4°C.

Equilibrou-se a coluna Maxi QIAGEN (Tip 500), cuja matriz é composta por Sílica-DEAE (Diethyl amino etano) com 10 mL de tampão QBT. Após a passagem desta solução nas colunas, adicionou-se o sobrenadante contendo o DNA. Lavou-se duas vezes a coluna com 30 mL de tampão QC e adicionou-se 15 mL de tampão QF, para eluir o DNA plasmídico da coluna para um tubo Corex. Precipitou-se o DNA, adicionando 10,5 mL de isopropanol e homogeneizou-se a solução por inversão. Centrifugou-se a 9500 rpm (Sorvall RC-5C/rotor HB4, raio do rotor = 145 mm) durante 30 minutos, à temperatura de 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante e secou-se o *pellet* ao ar. Ressuspendeu-se o *pellet* com 400 µL de solução de hidratação TE pH 8,0. Após 30 minutos, transferiu-se o conteúdo para um tubo de 2 mL e realizou-se uma extracção fenol-clorofórmio.

Na câmara de tóxicos, adicionou-se 450 µL de solução PIC (25 fenol : 24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico) ao tubo de 2 mL. Agitou-se vigorosamente por vortex e centrifugou-se a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 5 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se a fase aquosa (superior) para um novo tubo e adicionou-se 450 µL de solução IAC (24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico), agitando vigorosamente por vortex. Centrifugou-se a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 5 minutos e transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo. Para precipitar o DNA, adicionou-se 10% do volume do sobrenadante transferido de 3M acetato de sódio pH 5 e o dobro desse volume de etanol absoluto (frio). Homogeneizou-se a solução e colocou-se os tubos a -70°C, durante 30 minutos a 1 hora. Centrifugou-se a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 10 minutos, desprezando o sobrenadante. Adicionou-se 1 mL de etanol 70% (frio) e agitou-se no vortex. Centrifugou-se a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 3 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Secou-se o *pellet* ao ar e ressuspendeu-se em 200 µL de TE. Guardou-se a solução a 4°C. Quantificou-se a concentração de DNA plasmídico no dia seguinte e guardou-se a -20°C.

13. Cultura Celular

Para este estudo, foram utilizadas células PCCL3, células de tiróide normal de *Rattus norvegicus* (gentilmente cedidas pelo Professor Dumont, *Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles*, Bélgica). O manuseamento das células foi sempre realizado em

ambiente estéril, numa câmara de fluxo laminar. As culturas de células foram mantidas numa estufa (NUAIRE™ US AUTOFLOW CO₂ water-jacketed incubator) a 37°C com ambiente 5% CO₂. As células foram propagadas em meio de cultura F12-Coon's modified (EUROCLONE, Itália), suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (FBS; GIBCO™, Invitrogen Corporation, Reino Unido), 1 mUI/mL TSH (hormona tirotrófica; Sigma-Aldrich), 1 mg/L insulina (Sigma-Aldrich), 5 mg/L apo-transferrina (Sigma-Aldrich), antibiótico-antimicótico 1x (GIBCO™), fungizona/anfotericina B 1x (GIBCO™) e L-glutamina 1x (GIBCO™). Nos próximos capítulos, quando se referir meio F12-C suplementado, significa que este tinha a composição acima descrita.

Todos os reagentes conservados a 4°C foram sempre pré-aquecidos a 37°C, de modo a evitar o *stress* celular provocado pela diferença de temperatura. Para manter a esterilidade, os reagentes foram abertos e utilizados somente dentro da câmara de fluxo laminar. A observação das células foi realizada num microscópio invertido OLYMPUS CK-12 (Olympus Optical Co. Ltd., Japão).

13.1. Descongelamento de células

As células PCCL3 foram criopreservadas numa solução de congelação contendo FBS e DMSO (Sigma-Aldrich) a 10% (v/v). O DMSO é um crioprotector, que reduz o conteúdo aquoso das células, evitando a formação de cristais de gelo, que levariam à lise celular durante o processo de congelação. Os criotubos foram retirados do azoto líquido e aquecidos a 37°C para que a descongelação fosse rápida, de forma a evitar danos na membrana celular. Para remover o crioprotector (DMSO), as células foram lavadas em 15 mL de meio de cultura não suplementado. Centrifugou-se durante 6 minutos a 1200 rpm (Labofuge 400, Heraeus Centrifuge, Reino Unido, raio do rotor = 170 mm). Após a centrifugação, rejeitou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 20 mL de meio suplementado. De seguida, transferiu-se a suspensão celular para um frasco de cultura (aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por frasco de 260 mm³; Corning Incorporated, EUA) e manteve-se a 37°C, em ambiente 5% CO₂, com o frasco na horizontal, uma vez que as PCCL3 são células aderentes.

13.2. Propagação e expansão de células

O meio de cultura foi renovado entre cada 3/4 dias, de modo a evitar saturação do meio e insuficiência de nutrientes. As células foram regularmente transferidas para novos frascos, quando confluentes.

Para expansão das células, quando os frascos apresentaram confluência celular elevada (80-90%), removeu-se o meio de cultura e lavaram-se as células com PBS (-Mg²⁺/Ca²⁺), para remover resíduos de FBS. O FBS possui na sua composição

inibidores de proteases e catiões divalentes, que inibem a tripsina (Wang *et al.*, 2008). De seguida, adicionou-se tripsina-EDTA (GIBCO™) e agitou-se levemente o frasco, de modo a cobrir todas as células com a tripsina, incubando posteriormente a 37°C durante 5 minutos. A acção conjunta da enzima proteolítica tripsina e do EDTA, permite dissociar as ligações entre as células e destas com a superfície do frasco (passo necessário, visto serem células aderentes). Quando as células já não se encontravam aderentes, neutralizou-se a tripsina com o meio F12-C puro e centrifugou-se de seguida a 1200 rpm (Labofuge 400, Heraeus Centrifuge) durante 6 minutos, à temperatura ambiente. As células foram então ressuspensas em 10 mL de meio de cultura suplementado e distribuídas por novos frascos de cultura, de modo a ficarem com cerca de 5×10^6 células em 20 mL de meio suplementado em cada frasco de 260 mm³. Colocaram-se as células numa estufa de CO₂, deixando o frasco mal rolhado, de forma a permitir as trocas gasosas.

13.3. Contagem de células

Para determinar o número de células em suspensão realizou-se uma diluição de 1:10 num tubo de 1,5 mL: 100 µL da suspensão celular, 800 µL de PBS (-Mg²⁺/Ca²⁺) e 100 µL de azul de tripano (Biochrom AG, Alemanha). O azul de tripano cora de azul o núcleo das células mortas, porque estas apresentam lesões na membrana celular, tornando-se permeáveis a este composto. Colocaram-se 10 µL da solução anterior num hemocítmetro (0,100 mm, Neubauer Improved, Alemanha) e contaram-se as células viáveis (refringentes) e não viáveis (coradas). A concentração celular (número de células por mL) foi determinada através da fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ médio de células contadas} \times 10 \text{ (factor de diluição)} \times 10^4$$

13.4. Criopreservação de células

Transferiu-se o volume de suspensão celular (com 5×10^6 células) para um tubo de 50 mL e centrifugou-se a 1200 rpm (Labofuge 400, Heraeus Centrifuge) durante 6 minutos. De seguida, ressuspendeu-se o *pellet* celular em 1 mL de solução de congelação (FBS e DMSO a 10% v/v) e transferiu-se para uma ampola de congelação (Nunc, Reino Unido) em gelo. Colocou-se a ampola a -70°C durante 1 hora e armazenou-se em azoto líquido (-180°C).

13.5. Optimização das condições de transfecção das células PCCL3

A eficiência de transfecção foi determinada utilizando um vector de expressão, com um gene codificante para a proteína *green fluorescent protein* (GFP) sob o

controlo do *enhancer* de citomegalovirus/promotor de β -actina de galinha (pcAGGS-AFP). Plaquearam-se 1×10^6 células em placas de 60 mm (Nunclon, Sigma-Aldrich) em meio F12-C suplementado, sem antibiótico. As optimizações de transfecção foram realizadas variando a razão de lipofectamina : plasmídeo, num rácio de 1:1,5 a 1:3 e a quantidade total de plasmídeo entre 3 e 5 μ L (pcDNA3 e pcAGGS-AFP, mantendo constante a quantidade deste último; *Lipofectamine*TM 2000, *Invitrogen*TM) (Quadro 3). Vinte e quatro horas após o plaqueamento, juntou-se o volume correspondente de DNA plasmídico a 500 μ L de OPTI-MEM (*GIBCO*TM), homogeneizando gentilmente. Preparou-se o volume correspondente de lipofectamina em 500 μ L de OPTI-MEM e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida, juntou-se o DNA diluído com a lipofectamina e misturou-se gentilmente, incubando durante 20 minutos, à temperatura ambiente, para permitir a formação de complexos Lipofectamina-DNA. Entretanto, removeu-se o meio das placas, lavou-se com meio F12-C puro e juntou-se novo meio F12-C suplementado, sem antibiótico. Após os 20 minutos de incubação, adicionaram-se os complexos às placas e agitou-se gentilmente. Incubou-se as células na estufa de CO₂, durante 6h para ocorrer a transfecção. Após esse período de tempo, substituiu-se o meio por novo meio F12-C suplementado, sem antibiótico. Após 24h, recolheram-se as células e determinou-se a eficiência de transfecção, por análise de citometria de fluxo (*Fluorescence-activated cell sorting* - FACS), no FACS Calibur (*BD Biosciences*, EUA). Após o teste de várias condições, foram obtidas melhores eficiências de transfecção com proporção de lipofectamina : DNA de 1:2,5 para um total de 3 μ g de plasmídeo.

Quadro 3 – Condições para optimização da transfecção de células PCCL3.

Condição	1	2	3	4	5	6	7	8	Controlo
Lipofectamina:DNA	1 : 1,5		1 : 2		1 : 2,5		1 : 3		1 : 1,5
Lipofectamina (μ l)	4,5	7,5	6	10	7,5	12,5	9	15	4,5
pcDNA3-5,4 kb (μ g)	1,8	3,8	1,8	3,8	1,8	3,8	1,8	3,8	3
pcAGGS-AFP-5,54 kb (μ g)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	-
Total plasmídeo (μ g)	3	5	3	5	3	5	3	5	3

13.6. Estabelecimento de *pools* e clones de células PCCL3 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3

As células PCCL3 foram transfectadas com 3 μ g de cada um dos plasmídeos (pcDNA3, pcDNA3-FOXE1-14Ala, pcDNA3-FOXE1-16Ala e pcDNA3-FOXE1-16Ala-A248G) e 7,5 μ L de lipofectamina. Para preparação das *pools* de células com

expressão estável destes diferentes plasmídeos, 48 horas após a transfecção, iniciou-se a selecção das células que apresentavam resistência à geneticina (G418, *Sigma-Aldrich*). A selecção decorreu durante três semanas. Para a preparação dos clones de células PCCL3 com expressão estável dos plasmídeos, 24 horas após a transfecção, dividiram-se as células em diluições 1:100, em placas de 60 mm marcadas na base com quadrículas (8x8) com cerca de 0,16 cm², em meio F12-C suplementado, sem antibiótico. A selecção de células com expressão estável iniciou-se 24 horas após esta diluição. A geneticina foi utilizada na concentração final de 500 µg/mL para estabelecimento das *pools* e dos clones.

13.7. Isolamento dos clones de células PCCL3 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3

Quando se observaram cerca de 4 a 5 clones por placa (diluição 1:100), assinalou-se a localização dos clones a isolar. Removeu-se o meio da placa, lavou-se duas vezes com 5 mL PBS (-Mg²⁺/Ca²⁺) e colocaram-se cilindros de silicone sobre as regiões onde se localizavam os diferentes clones (Figura 14). Pressionou-se gentilmente o cilindro com a pinça, para o cilindro aderir bem à placa e adicionou-se 20 µL de tripsina, incubando 5 minutos a 37°C. Neutralizou-se com 50 µL de meio F12-C suplementado e transferiu-se para um poço de uma placa de 24 poços. Lavou-se o cilindro com mais 50 µL de meio e transferiu-se para o mesmo poço. Adicionou-se mais 400 µL de meio F12-C suplementado com geneticina (500 µg/mL) ao poço. Repetiu-se o mesmo procedimento para os outros clones a isolar. Deste modo, estabeleceram-se clones que integravam de forma estável no seu genoma os diferentes plasmídeos.

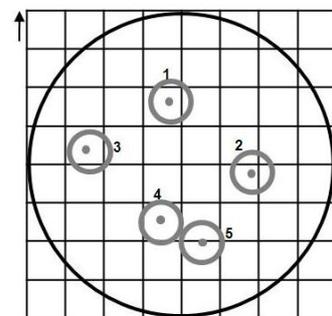


Figura 14 - Desenho ilustrativo do isolamento de clones em placas de 60 mm (quadrículas com 8x8 mm).

14. Ensaio de Proliferação Celular

O ensaio de proliferação celular foi realizado por contagem celular directa e por análise da incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) no DNA durante a replicação celular (ensaio de BrdU).

14.1. Contagem directa em hemocítmetro

Para a contagem directa de células, plaquearam-se 2×10^4 células em placas de 60mm (*Nunclon*) em meio F12-C suplementado com geneticina. Os ensaios foram

realizados em triplicado. A proliferação celular foi analisada por contagem de células, às 48 horas (2 dias), 96 horas (4 dias) e 144 horas (6 dias). Em cada *time-point* as células foram recolhidas e contadas de acordo com o protocolo que se segue: removeu-se o meio de cultura e lavaram-se as células duas vezes com PBS (-Mg²⁺/Ca²⁺). Após remover o PBS (-Mg²⁺/Ca²⁺), adicionaram-se 200 µL de tripsina e incubou-se 5 minutos a 37°C. Neutralizou-se a tripsina com 185 µL de meio F12-C puro com 2 % FBS e transferiram-se as células para um tubo de 1,5 mL. Lavou-se a placa com mais 100 µL de meio F12-C puro com 2 % FBS e transferiu-se este volume para o mesmo tubo. Adicionou-se ao tubo 15 µL de azul de tripano (*stock*) e homogeneizou-se a suspensão celular. Transferiram-se 10 µL de suspensão celular para um hemocítmetro (0,100 mm, *Neubauer Improved*) e contaram-se as células viáveis e não viáveis. A concentração celular (nº de células por mL) foi determinada pela fórmula:

$$\text{nº médio de células contadas} \times \text{factor de diluição} \times 10^4$$

Ao valor obtido, multiplicou-se o volume de suspensão celular (0,5 mL) para calcular o número total de células.

14.2. Ensaio com BrdU

Para o ensaio com BrdU, plaquearam-se 1×10^4 células em placas de 96 poços (*Nunclon*) em meio F12-C suplementado (1% FBS) com 500 µg/mL de geneticina. Os ensaios foram realizados em duplicado. Nos *time-points* de 48 horas (2 dias), 96 horas (4 dias) e 144 horas (6 dias), a taxa de proliferação celular foi determinada através de um método colorimétrico, usando o *Cell Proliferation ELISA kit* (*Roche*, EUA), de acordo com o protocolo que se segue.

Em cada *time-point*, adicionou-se 10 µL de *BrdU labelling solution* (10x concentrado) e incubou-se 2 horas a 37°C. Após esse tempo, removeu-se o meio e adicionou-se 200 µL de *FixDenat* a cada poço, incubando durante 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Esta solução é composta por formaldeído que vai fixar as células. Após 25 minutos, preparou-se a diluição de *Anti-BrdU-POD working solution* (1x concentrada). Removeu-se o *FixDenat* e adicionou-se 100 µL de *Anti-BrdU-POD working solution*, incubando durante 90 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Removeram-se os conjugados de anticorpo em excesso e lavou-se o poço três vezes com 200 de *Washing solution* (1x concentrada). Adicionou-se em seguida 100 µL de *Substrate solution* e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Ao longo deste tempo de incubação, observou-se um aumento progressivo de intensidade de cor azul. Por fim,

adicionou-se 25 μL de *Stop solution*, composta por H_2SO_4 2M para parar a reacção. Agitou-se a placa a 300 rpm (*eppendorf Centrifuge 5810R*) durante 1 minuto e realizou-se a leitura das absorvências no aparelho “micro titer plate reader” (*BIO-RAD microplate reader*, Reino Unido) num comprimento de onda a 450 nm, com comprimento de onda de referência de 690 nm. Os dados foram analisados com o *software* MPM6 (*BIO-RAD*, Reino Unido).

15. Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio com Violeta de Cristal é útil para determinar a densidade relativa de células em adesão em placas de cultura. Foram plaqueadas 2×10^5 células em placas de 24 poços (*Nunclon*) em meio F12-C suplementado (1% FBS) com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de geneticina. Os ensaios foram realizados em triplicado, utilizando duas placas: uma que foi irradiada e outra não irradiada (controlo). Uma das placas foi irradiada com radiação UV, 24h após o plaqueamento, durante 1 minuto. Após 24h, removeu-se o meio das placas irradiadas e não irradiadas e lavaram-se as células duas vezes com PBS ($-\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$). Adicionou-se 250 μL de Violeta de Cristal (0,5% m/v, diluído com etanol a 20% v/v) a cada poço e incubou-se durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Removeu-se o violeta de cristal e lavaram-se as células, por submersão das placas em água fria. Deixou-se secar 2h na câmara de tóxicos. Adicionou-se 350 μL de ácido acético (50%, v/v) para remover o corante das células. Transferiu-se 50 μL para uma placa de 96 poços para ler a absorvência no aparelho “micro titer plate reader” (*BIO-RAD microplate reader*) nos comprimentos de onda 450 nm e 595 nm. Os dados foram analisados com o *software* MPM6 (*BIO-RAD*).

16. Ensaio de *Wound Healing*

Marcaram-se previamente as placas de 35 mm (*Nunclon*), com um traço horizontal (Figura 15). Plaquearam-se 2×10^6 células, em placas de 35 mm em meio F12-C suplementado (1% FBS) com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de geneticina. Os ensaios foram realizados em triplicado. Após 24h, realizou-se um *scratch*, isto é, uma ferida com uma ponta de micropipeta de 200 μL estéril, e renovou-se o meio. Assinalou-se a região a fotografar, junto à intersecção do *scratch* com o traço previamente realizado na placa. Fotografou-se a zona assinalada, em *time-points* definidos: 0h, 3h, 6h, 9h, 24h, 27h, 30h e 54h. Utilizou-se o *software* ImageJ para medir as áreas da “ferida” em cada imagem.

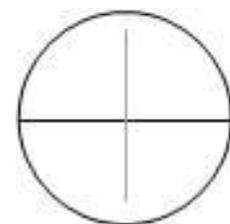


Figura 15 – Desenho ilustrativo das placas de 35 mm, usadas para o ensaio de *wound healing*.

17. Análise Estatística

Os dados obtidos em vários replicados de experiências independentes foram expressos como média \pm valores desvio padrão. Para analisar os resultados obtidos, utilizaram-se testes que permitissem a comparação de mais de 2 amostras independentes. Para análise dos resultados do ensaio de proliferação, em que os dados apresentavam diferenças significativas das variâncias, utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e o *post-test* de comparação múltipla de Dunn. Para os ensaios de viabilidade celular e para o ensaio de *wound healing*, utilizou-se o teste paramétrico ANOVA e o *post-test* de Tukey.

Os dados foram analisados usando o *software* estatístico GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, EUA). Valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

IV. RESULTADOS

1. Caracterização fenotípica das famílias com FNMTc

No presente estudo, foram identificadas 60 famílias com FNMTc, com um total de 144 membros afectados com NMTC (Quadro VI do capítulo VIII – Anexos): 1 família apresentava 5 doentes com NMTC (1,7%), 5 famílias apresentavam 4 doentes com NMTC (8,3%), 11 famílias apresentavam 3 doentes com NMTC (18,3%) e as restantes famílias apresentavam 2 doentes com NMTC (71,7%). Nos 144 doentes, os tumores mais frequentes foram os cPTC (n=106; 73,6%) e as restantes lesões, que incluíram os fvPTC, PTC misto, PTC variante de células altas, PTC variante oncócica, fvPTC variante oncócica, FTC, FTC variante oncócica e FTA variante oncócica, representavam apenas 26,4% dos tumores totais.

As famílias mais numerosas apresentavam um modo de transmissão autossómico dominante. Nas famílias mais pequenas (< 3 membros afectados), o modo de transmissão não é ainda conhecido.

2. Identificação de variantes genéticas nos genes *NKX2-1*, *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8* em famílias com FNMTc

As amostras de 60 probandos de famílias com FNMTc foram sequenciadas para os genes *NKX2-1*, *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8*. Foram apenas sequenciados 4 dos 12 exões do gene *PAX8*, que codificam o *paired domain* deste factor de transcrição. As variantes foram identificadas por comparação com as sequências disponíveis nas bases de dados ENSEMBL (www.ensembl.org) e NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). As variantes com uma frequência na população < 1% foram designadas por variantes raras, enquanto que as variantes com uma frequência ≥ 1% foram designadas por polimorfismos.

Neste estudo, foram identificadas 15 variantes genéticas nos genes *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8*, das quais 10 eram polimorfismos e 5 eram variantes raras, ainda não descritas nas bases de dados ENSEMBL, NCBI ou HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). No gene *NKX2-1*, não foram detectadas variantes genéticas.

2.1. Polimorfismos nos genes *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8*

A maioria das variantes genéticas identificadas neste estudo é comum na população Portuguesa e em outras populações descritas nas bases de dados ENSEMBL, NCBI ou HapMap (Quadro 4).

Quadro 4 – Variantes genéticas comuns identificadas em probandos de famílias com FNMTC e respectivas frequências alélicas.

Gene	Variante genética	Probandos de Famílias FNMTC (n= 60)	Controlos da população Portuguesa (n= 80)	População Europeia**	Efeito previsto na proteína	
		Frequência (%)	Frequência (%)	Frequência (%)		
FOXE1	rs3021523 c.387T>C	T=32,5	T=22,5	T=29,2	p.L129L	
	12	2,5	5,7	1		
	14	47,5	66,7	71,8		
	Poli-Ala (n)	15	0,8	0	0	
		16	40,8	24,5	25,9	
		17	6,7	1,2	0,8	
	19	1,7	1,9	0,5		
	rs3021526 c.825C>T	C=52,5	C=39,4	C=45,0	p.S275S	
HHEX	rs117639730 c.-11G>A	A=4,2	*	A=1,2	-	
	rs113121942 c.318G>A	A=0,8	*	A=1,7	P.T106T	
	rs2275729 c.541-29T>G	G=9,2	*	G=8,8	-	
PAX8	rs75992825 -3G>A (5'US)	A=1,7	*	A=2,5	-	
	rs2084163 c.-103G>C	C=0,8	*	C=0***	-	
	rs1867763 c.25+24T>C	C=17,5	*	C=31,7	-	
	rs2277884 c.25+197G>T	T=5,8	*	T=7,5	-	

5'US, 5' *Upstream Sequence*; n, número de indivíduos; poli-Ala, região de polialaninas; -, não aplicável. *Não determinada. **As frequências dos alelos apresentadas no quadro para a população Europeia foram obtidas na base de dados HapMap (NCBI). As frequências dos alelos da região de polialaninas são a média das frequências para a população Europeia calculadas com base nos dados das populações controlo dos artigos Macchia *et al.*, 1999 (Itália), Tonacchera *et al.*, 2004 (Itália), Watkins *et al.*, 2006 (Eslovénia), Carré *et al.*, 2007 (França), Santarpia *et al.*, 2007 (Sicília), Venza *et al.*, 2009 (Itália), Szczepanek *et al.*, 2011 (Ucrânia). ***Apesar de o alelo C do rs2084163 do gene PAX8 ser praticamente ausente da população Europeia, este é considerado um polimorfismo porque na população da África Ocidental o alelo C apresenta-se com uma frequência de 5,9%.

Os polimorfismos rs3021523 e rs3021526 identificados no gene *FOXE1* e o polimorfismo rs113121942 no gene *HHEX* representam alterações da última base do codão sem alteração do resíduo de aminoácido codificado (substituição sinónima).

Foram também identificados polimorfismos em regiões não traduzidas ou a montante dos genes *HHEX* e *PAX8*. O polimorfismo rs75992825 localiza-se na região 5'US (*upstream sequence*) do gene *PAX8*. O polimorfismo rs117639730 do gene *HHEX* e o polimorfismo rs2084163 do gene *PAX8* localizam-se, respectivamente, 11 e 103 nucleótidos a montante do codão de iniciação. O polimorfismo rs2275729 localiza-

se no intrão 1 do gene *HHEX* e os polimorfismos rs1867763 e rs2277884 localizam-se no intrão 2 do gene *PAX8*.

Em relação à região polimórfica que codifica resíduos de polialaninas, no gene *FOXE1*, observou-se que os alelos 12, 15, 17 e 19 estavam presentes em 11,7% dos casos e 8,8% dos controlos da população Portuguesa. Tal como previamente observado para outras populações, na população Portuguesa, os alelos 14 e 16 eram os mais frequentes, apresentando, respectivamente, as frequências de 47,5% e 40,8% nos casos e de 66,7% e 24,5% nos controlos.

O estudo da associação entre os alelos 14 e 16 e outras variantes do gene *FOXE1* e o risco de cancro da tiróide está a ser desenvolvido pelo grupo de Endocrinologia Molecular, em séries mais numerosas de casos com FNMTTC e também em casos com NMTC esporádico. Este tema não foi, no entanto, objecto de estudo na presente dissertação.

2.2. Variantes raras nos genes *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8*

Neste estudo, foram identificadas 5 variantes raras nos genes *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8*, ainda não descritas na literatura ou nas bases de dados ENSEMBL, NCBI ou HapMap. No Quadro 5, estão descritas as variantes raras identificadas e o efeito previsto da substituição do resíduo de aminoácido na estrutura e na função da proteína pelo *software* PolyPhen e pelo *software* SIFT.

Quadro 5 – Variantes raras identificadas em probandos de famílias com FNMTTC e efeito fenotípico previsto.

Gene	Variante genética	Probandos de Famílias FNMTTC (n=60)	Controlos da população Portuguesa (n= 80)	Outras populações**	Efeito previsto na função da proteína ***
		Freq. (%)	Freq. (%)	Freq. (%)	
<i>FOXE1</i>	p.A248G c.743C>G	0,83	0,0	0,0	Possivelmente patogénica
<i>HHEX</i>	-46C>A	0,83	*	0,0	-
	p.G121S c.361G>A	0,83	*	0,0	Possivelmente patogénica
<i>PAX8</i>	-42G>A (5'US)	4,17	*	0,0	-
	c.120+17 T>C	1,67	*	0,0	-

5'US, 5' *Upstream Sequence*; n, número de alelos (= 2n cromossomas); Freq., Frequência; -, não aplicável. * O estudo das variantes dos genes *HHEX* e *PAX8* em controlos normais da população Portuguesa está em curso. ** Bases de dados ENSEMBL, NCBI ou HapMap. *** *Software* PolyPhen e *software* SIFT.

2.2.1. Variante -46 C>A no gene *HHEX*

No gene *HHEX*, foi identificada uma variante que consiste na transversão de uma citosina para uma adenina (C>A), localizada 46 nucleótidos a montante do codão de iniciação do gene, na região não traduzida. A variante foi identificada no probando da família 8 (em heterozigotia) e ainda não foi descrita nas bases de dados ENSEMBL, NCBI ou HapMap.

2.2.2. Variante -42 5'US no gene *PAX8*

No *locus PAX8*, foi identificada uma variante que consiste na transição de uma guanina para uma adenina (G>A), localizada 42 nucleótidos a montante do início do gene (5' *upstream sequence*). A variante foi identificada em 5 probandos de famílias com FNMTC e ainda não foi descrita nas bases de dados ENSEMBL, NCBI ou HapMap.

2.2.3. Variante c.120+17 no gene *PAX8*

No gene *PAX8*, foi identificada uma variante que consiste na transição de uma timina para uma citosina (T>C), localizada no nucleótido 17 do intrão 1. A variante foi identificada em 2 probandos de famílias com FNMTC e ainda não foi descrita nas bases de dados ENSEMBL, NCBI ou HapMap.

2.2.4. Variante p.A248G no gene *FOXE1*

2.2.4.1. Estudo de segregação da variante p.A248G na família 25

Uma nova variante genética no gene *FOXE1* (Figura 16), ainda não descrita na literatura ou nas bases de dados ENSEMBL, NCBI ou HapMap, foi detectada em heterozigotia no probando (III-16) da família 25, que apresentava um cPTC, multifocal, com metástases ganglionares. Esta variante localiza-se no codão 248 deste gene e consiste na transversão de uma citosina para uma guanina (c.743C>G). É esperado que esta alteração no codão 248 conduza à substituição do resíduo de alanina por um resíduo de glicina (p.A248G). Esta variante genética não estava presente em 80 controlos normais, não sendo por isso um polimorfismo comum na população Portuguesa.

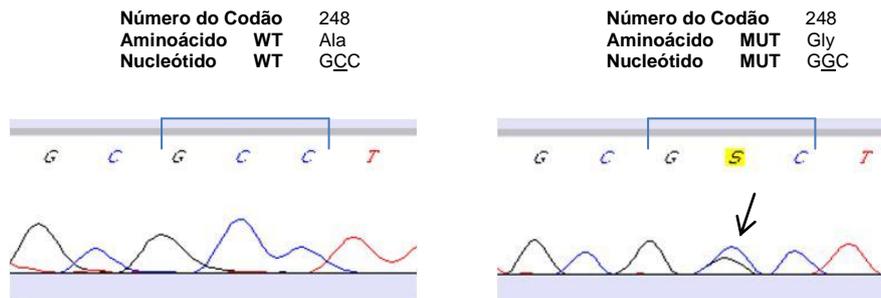


Figura 16 – Sequenciação do exão 1 do gene *FOXE1* num controlo normal (imagem à esquerda) e no caso índice da família 25, portador de uma variante c.743C>G (imagem à direita), que deverá conduzir à substituição de um resíduo de alanina por um resíduo de glicina no codão 248 (p.A248G). A seta assinala a localização da variante.

De acordo com o *software* SIFT, o resíduo de alanina do codão 248 foi conservado na evolução, sugerindo que a variante detectada no gene *FOXE1* afecta a função da proteína (Figura I do capítulo VIII – Anexos). Para averiguar se esta variante está envolvida na tumorigénese na tiróide, efectuaram-se estudos funcionais, cujos resultados estão descritos na secção 3 deste capítulo.

Para investigar se esta variante segregava com a doença na família, procedeu-se à sequenciação do gene *FOXE1* nos restantes familiares (Figura 17). A análise das sequências obtidas revelou que, para além do probando (III-16), 3 familiares apresentavam a variante (indivíduos III-7, III-8 e III-15). O indivíduo III-7 apresentava um fvPTC, entre outras neoplasias (adenoma da paratiróide, linfoma, carcinoma basocelular e carcinoma da próstata), o indivíduo III-8 apresentava um carcinoma do ovário e o indivíduo III-15 apresentava um cPTC com metástases ganglionares. A variante p.A248G não foi detectada na mãe do probando (II-8), que apresentava bócio.

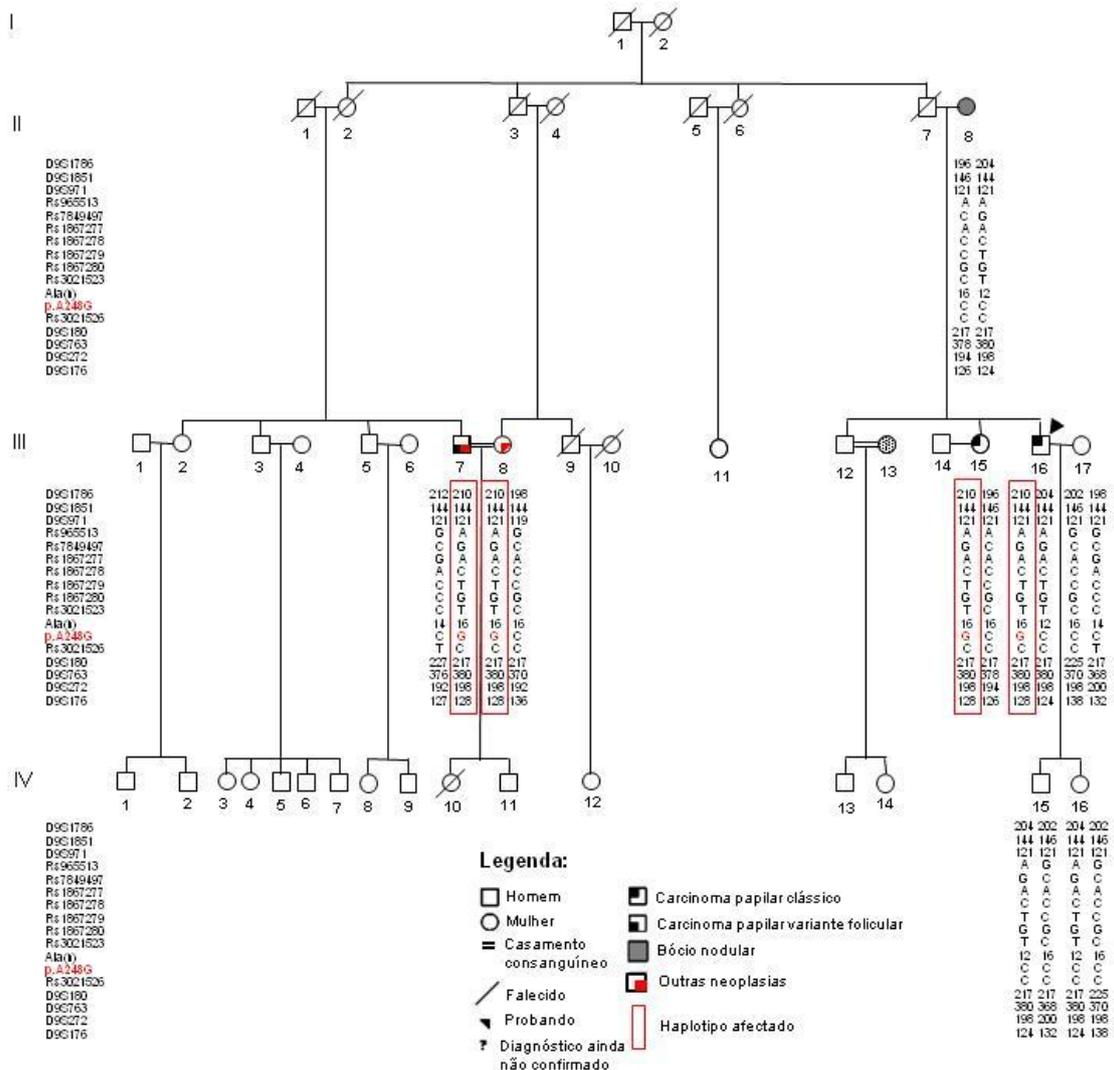


Figura 17 – Árvore genealógica da família 25. Resultado do estudo de segregação de marcadores polimórficos do locus *FOXE1*.

2.2.4.2. Estudo de segregação da variante p.A248G num caso aparentemente esporádico de cancro da tiróide (família 25A)

A variante p.A248G no gene *FOXE1* foi identificada num doente (indivíduo III-5 da família 25A) (Figura 18) com cPTC com metástases ganglionares, aparentemente esporádico, analisado no contexto dos estudos de associação das variantes do gene *FOXE1*. O estudo de segregação mostrou que a variante tinha sido herdada por via paterna, sendo o pai do probando assintomático. A variante p.A248G não foi detectada na mãe do probando (II-4), que apresentava bócio. Tratando-se de uma variante rara, investigou-se se as duas famílias teriam uma ascendência comum. Deste modo, estudou-se a segregação de 16 marcadores polimórficos localizados no locus *FOXE1*, nas duas famílias (Quadro 6).

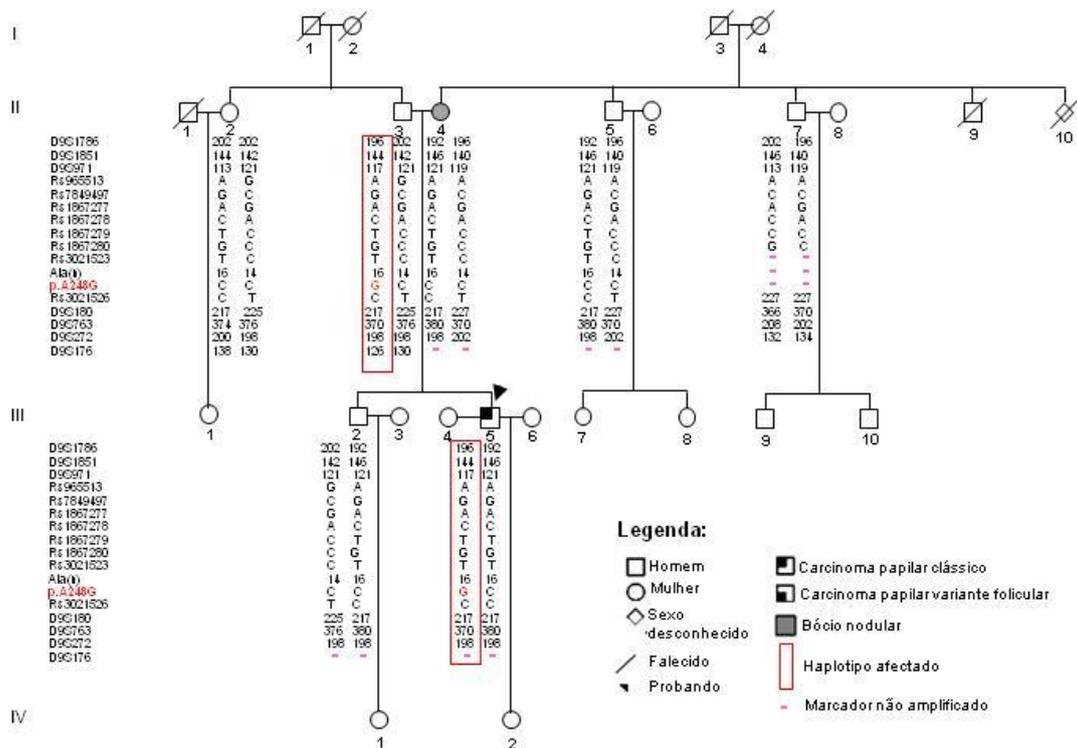


Figura 18 – Árvore genealógica da família 25A. Resultado do estudo da segregação de marcadores polimórficos do *locus* *FOXE1*.

Os estudos de segregação mostraram que os probandos das duas famílias partilhavam o mesmo haplotipo entre os marcadores rs965513 e D9S180, inclusive, o que poderia sugerir uma ascendência comum para as duas famílias (Quadro 6). No entanto, resultados preliminares dos estudos de associação das variantes do gene *FOXE1* com cancro de tiróide, na população Portuguesa, mostraram que existe desequilíbrio no *linkage* (*linkage disequilibrium*) para os marcadores localizados entre o rs965513 e o rs3021526, apresentando este haplotipo (inferido) uma frequência nos casos de 0,316 e de 0,150 nos controlos. Está em curso a análise da frequência do alelo 217 do marcador D9S180.

Quadro 6 - Segregação do haplotipo afectado no locus *FOXE1* nas famílias 25 e 25A.

Locus <i>FOXE1</i>	Posição (Mb)	Marcador	Família 25	Família 25A
Região 5'	99,040	D9S1786	210	196
<i>upstream</i>	99,571	D9S1851	144	144
<i>Sequence</i>	100,170	D9S971	121	117
Promotor	100,556	rs965513	A	A
	100,616	rs7849497	G	G
	100,616	rs1867277	A	A
	100,616	rs1867278	C	C
	100,616	rs1867279	T	T
	100,616	rs1867280	G	G
Gene	100,617	rs3021523	T	T
	100,617	Ala(n)	16	16
	100,617	c.743C>G*	G	G
	100,617	rs3021526	C	C
Região 3'	100,650	D9S180	217	217
<i>downstream</i>	101,410	D9S763	380	370
<i>Sequence</i>	101,751	D9S272	196	196
	102,058	D9S176	128	126

* p.A248G

2.2.5. Variante p.G121S no gene *HHEX*

A sequenciação do gene *HHEX* permitiu detectar uma nova variante genética (em heterozigotia) no probando (III-2) da família 55. Esta variante consiste na transição de uma guanina para uma adenina (c.361G>A) no codão 121 deste gene (Figura 19), sendo esperado que conduza à substituição de um resíduo de glicina (Gly) por um resíduo de serina (Ser). A variante p.G121S não se encontra descrita nas bases de dados ENSEMBL, NCBI ou HapMap, o que indica que não é um polimorfismo comum na população. Está em curso o estudo da frequência desta variante na população Portuguesa.

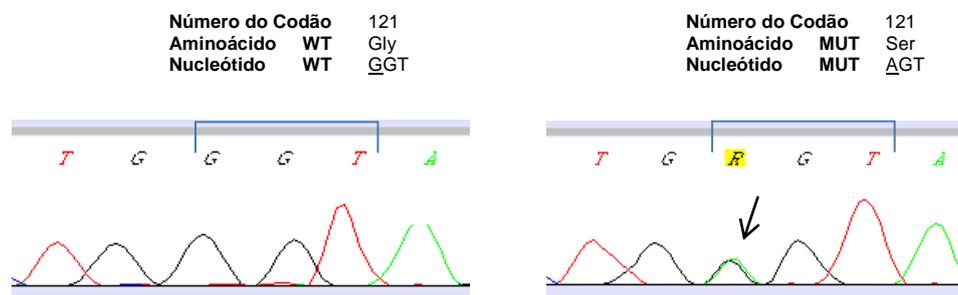


Figura 19 - Sequenciação do exão 1 do gene *HHEX* num controlo normal (imagem à esquerda) e no caso índice da família 55, portador de uma variante c.361G>A (imagem à direita), que deverá conduzir à substituição de um resíduo de glicina por um resíduo de serina no codão 121 (p.G121S). A seta assinala a localização da variante.

De acordo com o *software* PolyPhen, o resíduo de glicina do codão 121 foi conservado ao longo da evolução, sugerindo que a variante detectada no gene *HHEX* é “possivelmente patogénica” (Figura II do capítulo VIII – Anexos).

A transição c.361G>A afecta a última base do exão 1 do gene *HHEX*. Estudos anteriores mostraram que este tipo de alteração poderá afectar o mecanismo de *splicing* (Ozkara & Sandhoff, 2003). A análise da variante c.361G>A, utilizando 3 *softwares* de previsão de sítios de *splicing*, mostrou que esta poderia abolir um *donor splice site* (Quadro 7). Está em curso o estudo do cDNA do gene *HHEX* neste doente por RT-PCR.

Quadro 7 – Resultado da análise da variante c.361G>A, através de três *softwares* de previsão de sítios de *splicing*.

<i>HHEX</i>	Score		
	BDGP	NetGene2	ASSP
WT	0,99	1,00	10,08
c.361G>A	0,59	0,82	5,12

BDGP - http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
 NetGene2 - <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>
 ASSP - <http://www.es.embnet.org/~mwang/assp.html>

Nesta família, o probando (III-2) apresentava um cPTC e bócio multinodular, o indivíduo III-3 apresentava um cPTC multifocal e bócio multinodular e o indivíduo II-3 apresentava um carcinoma do estômago (Figura 20).

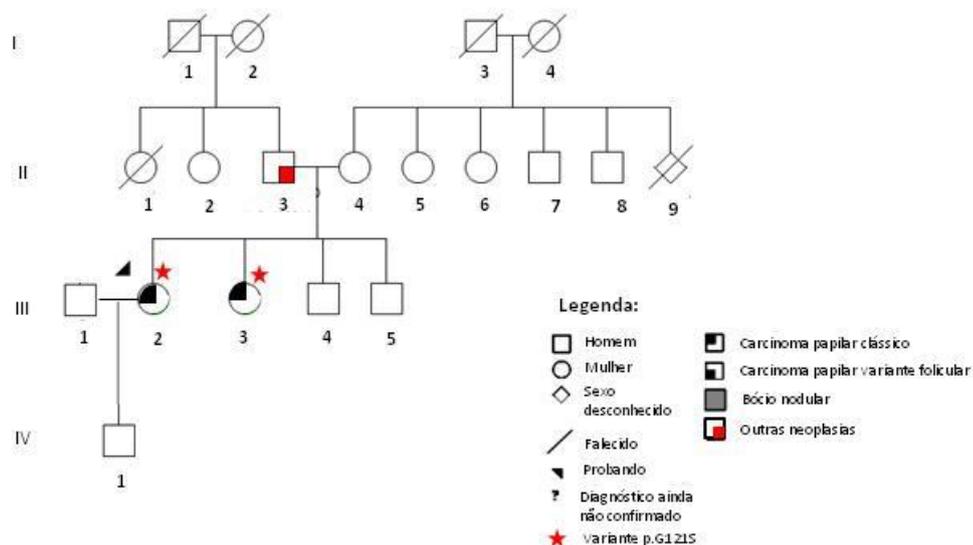


Figura 20 – Árvore genealógica da família 55.

Para investigar se a variante p.G121S segregava com a doença na família, sequenciou-se o indivíduo III-2 e verificou-se que também apresentava a variante. Num próximo passo, serão estudados os pais e restantes irmãos do probando.

3. Estudos funcionais da variante p.A248G do gene *FOXE1*

Para investigar qual o papel da variante p.A248G no gene *FOXE1* na tumorigénese na tiróide desenvolveram-se estudos funcionais, usando como modelo células PCCL3. Estas células são de tiróide normal de *Rattus norvegicus* (gentilmente cedidas pelo Professor Dumont, *Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles*, Bélgica). As culturas de células foram mantidas numa estufa a 37°C, em ambiente de 5% CO₂, e em meio de cultura *F12-Coon's modified*, suplementado com 5% (v/v) de FBS, TSH, apo-transferrina, antibiótico-antimicótico, fungizona/anfotericina B e L-glutamina. Nos próximos capítulos, sempre que for referido meio F12-C suplementado, significa que este apresentava a composição acima descrita.

3.1. Optimização da confluência celular

Este estudo permitiu a optimização do número de células a utilizar, para obter diferentes confluências celulares, num período de 4 dias (24 a 96 h). Plaquearam-se diferentes quantidades de células em placas de 60 mm, em meio F12-C suplementado (Figura 21).

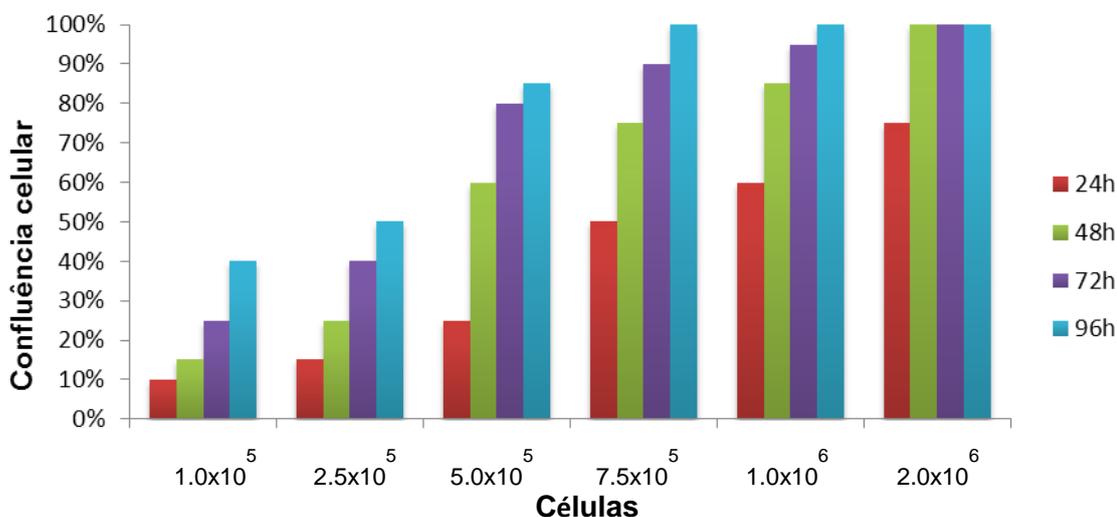


Figura 21 – Estudo da confluência celular num período de 4 dias (24-96h), utilizando várias quantidades iniciais de células PCCL3.

Com base neste estudo, foi possível seleccionar o número de células a plaquear, para a obtenção da confluência apropriada, nos diferentes ensaios funcionais.

3.2. Determinação da curva dose-resposta à geneticina

A geneticina é um antibiótico que bloqueia a síntese polipeptídica das células procarióticas e eucarióticas. O plasmídeo pcDNA3 possui um gene que confere resistência à geneticina, o que permite às células transfectadas com este plasmídeo proliferarem normalmente em meio com este antibiótico. Para averiguar a concentração óptima de geneticina para a selecção das células resistentes (transfectadas de forma estável), testou-se o efeito de diferentes concentrações deste antibiótico (entre 0 a 1000 µg/mL), em células PCCL3 (Figura 22). Para este estudo, plaquearam-se $2,5 \times 10^5$ células PCCL3, em placas de 60 mm, em meio F12-C suplementado.

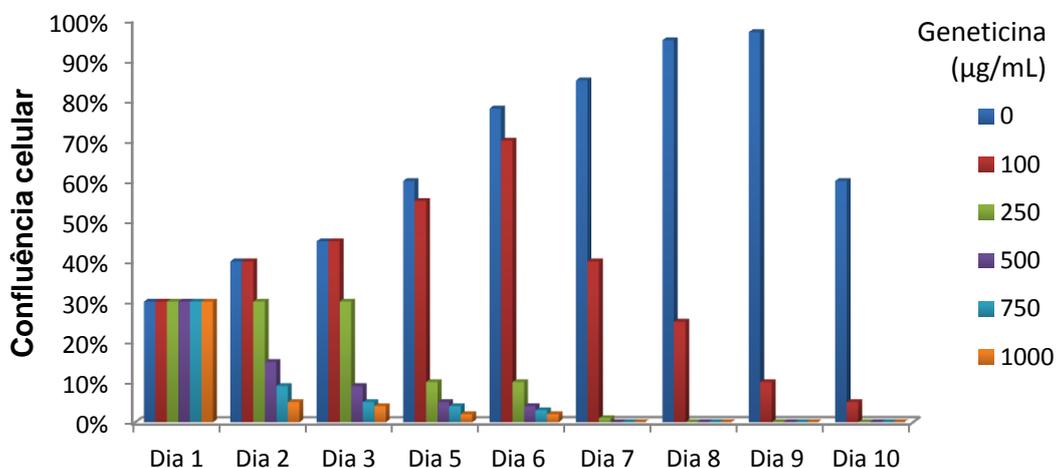


Figura 22 – Curva dose-resposta à geneticina de células PCCL3, num período de 10 dias.

Este teste de dose-resposta das células PCCL3 à geneticina foi essencial para a posterior preparação de *pools* e clones destas células, com expressão estável de diferentes construções derivadas do plasmídeo pcDNA3. A concentração óptima da geneticina deve eliminar as células sem resistência à geneticina, em cerca de 1 a 3 semanas, e não deverá ser tóxica para as células que integraram de forma estável o plasmídeo pcDNA3 no seu genoma. A dose seleccionada para ser utilizada nos ensaios subsequentes foi de 500 µg/mL.

3.3. Optimização das condições de transfecção de células PCCL3

Para optimização das condições de transfecção de células PCCL3, testaram-se diferentes volumes de lipofectamina e quantidades totais de plasmídeo (pcDNA3 e pcAGGS-AFP), num rácio de 1:1,5 a 1:3. A eficiência de transfecção foi determinada utilizando, nas diferentes condições, a mesma quantidade (1,2 µg) de um vector de

expressão da proteína GFP (pcAGGS-AFP). A quantidade de plasmídeo pcDNA3 variou entre 1,8 e 3,8 µg. Na placa controlo, as células foram transfectadas com a menor proporção de lipofectamina : plasmídeo (1:1,5) e na ausência de pcAGGS-AFP.

Por citometria de fluxo (*Fluorescence-activated cell sorting* - FACS), analisou-se a eficiência de transfecção (Figura 23):

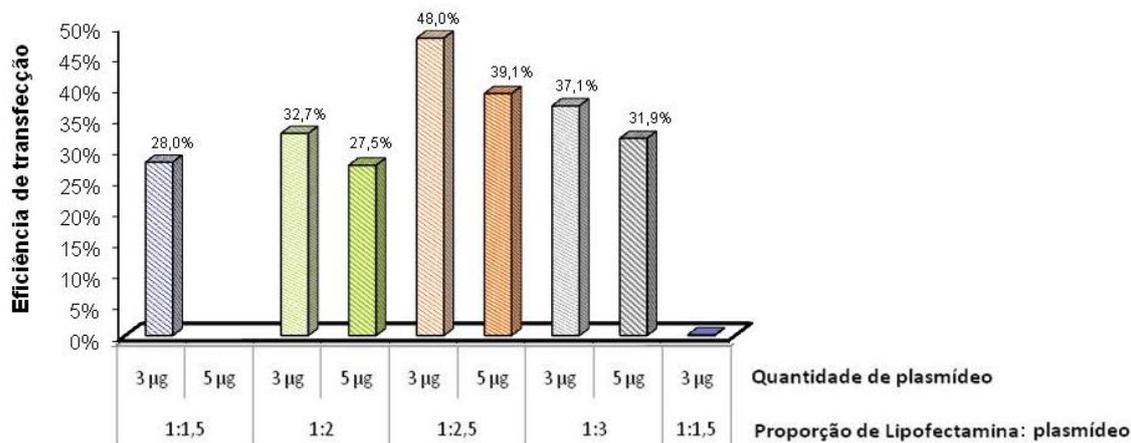


Figura 23 – Eficiência de transfecção, após 48h, para diferentes quantidades de plasmídeo e diferentes proporções de lipofectamina: plasmídeo, determinada por FACS. Não foi possível determinar a eficiência para 5 µg de plasmídeo na proporção 1:1,5 de lipofectamina : plasmídeo.

O teste das diferentes condições mostrou que a melhor eficiência de transfecção era obtida com proporção de lipofectamina : plasmídeo de 1:2,5, para um total de 3 µg de plasmídeo.

3.4. Preparação de *pools* de células PCCL3 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3

Para avaliar as consequências funcionais da variante p.A248G, as células PCCL3 foram transfectadas com os seguintes plasmídeos: plasmídeo pcDNA3 vazio (sem o gene *FOXE1*), plasmídeo pcDNA3-*FOXE1*-14Ala que expressa a proteína *FOXE1 wild type* (WT) com 14 resíduos de alaninas, plasmídeo pcDNA3-*FOXE1*-16Ala que expressa a proteína *FOXE1 wild type* com 16 resíduos de alaninas. Por mutagénese dirigida (*in vitro*) baseada em PCR, obteve-se o plasmídeo pcDNA3-*FOXE1*-16Ala-A248G que expressa o mRNA do gene *FOXE1* com a variante c.743C>G, que é traduzido para a proteína com a variante A248G. No texto que se segue serão utilizadas as seguintes abreviaturas para os plasmídeos: pcDNA3 (plasmídeo pcDNA3 sem o gene *FOXE1*), 14 WT (pcDNA3-*FOXE1*-14Ala), 16 WT (pcDNA3-*FOXE1*-16Ala) e 16 MUT (pcDNA3-*FOXE1*-16Ala-A248G).

Seleccionaram-se as células com expressão estável dos diferentes plasmídeos com genética a 500 µg/mL durante 18 dias e obtiveram-se as respectivas *pools* celulares.

3.5. Isolamento de clones de células PCCL3 com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3

Após a obtenção das *pools*, isolaram-se clones de células PCCL3 com expressão estável dos diferentes plasmídeos, referidos na secção anterior. Nos clones isolados, amplificou-se por RT-PCR e sequenciou-se o gene *FOXE1* humano. Os clones que integraram o plasmídeo pcDNA3 vazio não apresentaram expressão do gene *FOXE1* (humano) na análise por RT-PCR, como esperado (Quadro 8). Alguns dos clones 14 WT, 16 WT e 16 MUT foram eliminados por não apresentarem expressão do gene *FOXE1*.

Quadro 8 – Clones com expressão estável dos diferentes plasmídeos. Análise de RT-PCR e sequenciação do gene *FOXE1*.

Plasmídeo	Clone (#)	Expressão do		<i>FOXE1</i>		
		gene <i>FOXE1</i>	rs3021523	Poli-Ala _n	c.743C>G	rs3021526
pcDNA3	1	-				
	2	-				
	3	-				
14 WT	2	+	C	14	C	T
	3	+	C	14	C	T
16 WT	2	+	T	16	C	C
	3	+	T	16	C	C
16 MUT	9	+	T	16	G	C
	4	+	T	16	G	C

+, Positivo; -, Negativo; #, número do clone; Poli-Ala_n, número de resíduos de polialaninas. Os clones assinalados a sombreado foram utilizados nos estudos funcionais subsequentes.

Entre os clones isolados, o clone pcDNA3 #1, o clone 14 WT #2, o clone 16 WT #2 e o clone 16 MUT #9 foram utilizados nos estudos funcionais descritos nas secções seguintes.

3.6. Ensaio de Proliferação Celular

Uma das principais características das células tumorais é a vantagem proliferativa (Hanahan & Weinberg, 2000). O tempo de replicação das células PCCL3 é de 24h (Fusco *et al.*, 1987). Neste estudo, avaliou-se a capacidade proliferativa das células transfectadas de forma estável com os vários plasmídeos, por contagem directa em hemocítmetro e pela incorporação de BrdU.

3.6.1. Contagem de células em hemocitómetro

Plaquearam-se 2×10^4 células dos clones pcDNA3 #1, 14 WT #2, 16 WT #2 e 16 MUT #9, em placas de 60mm, em meio F12-C suplementado, com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de geneticina (Figura 24). As células foram colhidas e contadas nos seguintes *time-points*: 48 horas (2 dias), 96 horas (4 dias) e 144 horas (6 dias).

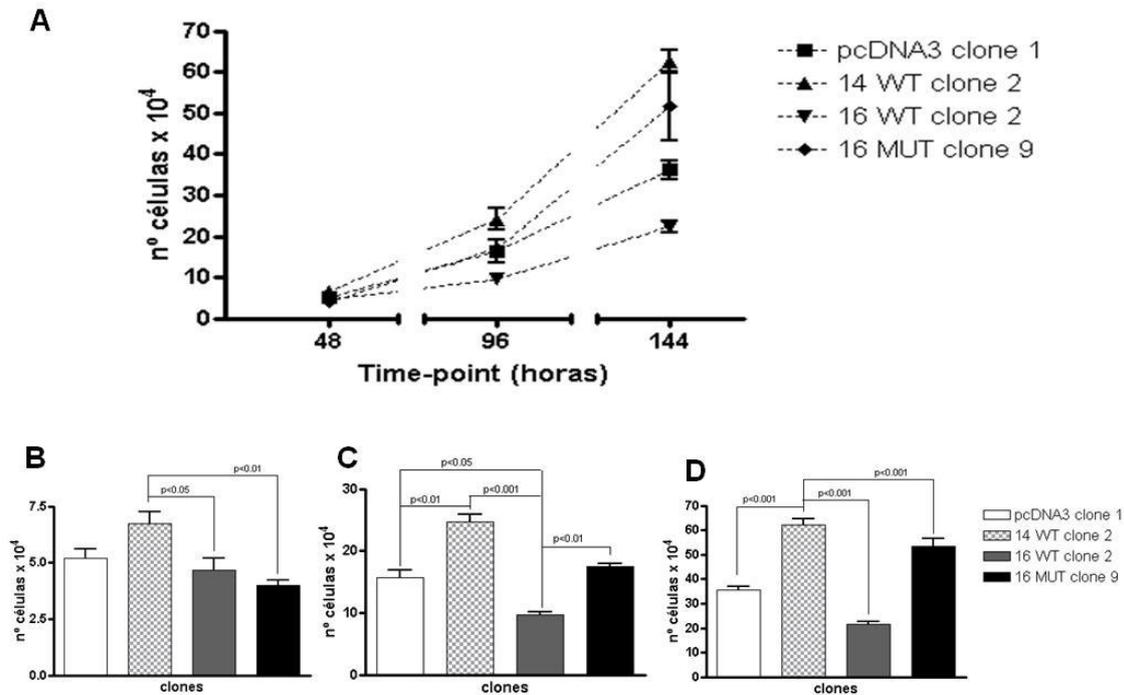


Figura 24 – Efeito da variante p.A248G no gene *FOXE1* na proliferação celular. (A) Ensaio de proliferação celular para os clones pcDNA3 #1, 14WT #2, 16 WT #2 e 16 MUT #9, por contagem directa em hemocitómetro nos *time-points* 48 horas (B), 96 horas (C) e 144 horas (D). As barras de erro indicam o desvio padrão. Valores correspondentes à média de 8 replicados, em 3 ensaios independentes. Para o clone 16 MUT #9 foi eliminado um dos ensaios, sendo a representação correspondente à média de 5 replicados. Os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e os valores de $P < 0.05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

Os clones 14 WT #2 e 16 MUT #9 apresentaram uma proliferação celular mais elevada do que os clones pcDNA #1 e 16 WT #2, nos *time-points* de 96 e 144 horas (Figura 24C e D). No entanto, apenas o clone 14 WT #2 apresentou uma diferença na proliferação celular estatisticamente significativa, em relação ao controlo (pcDNA3 #1) às 96h ($P < 0.01$) e 144h ($P < 0.001$) (Figura 24C e D). A elevada taxa de proliferação observada para o clone 14 WT #2 será discutida na secção 3.9 deste capítulo.

A proliferação do clone 16 WT #2 foi significativamente mais baixa que a dos restantes clones no *time-point* 96 e 144 horas (Figura 24C e D).

3.6.2. Ensaio com BrdU

A incorporação de BrdU (análogo da timidina) no DNA, na fase S do ciclo celular pode ser utilizada como um indicador da proliferação celular, através da detecção por um anticorpo. Plaquearam-se 1×10^4 células dos clones pcDNA3 #1, 14 WT #2, 16 WT #2 e 16 MUT #9, em placas de 96 poços, em meio F12-C suplementado, com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de geneticina (Figura 25). As células foram colhidas e o ensaio de BrdU foi realizado nos *time-points* de 48 horas (2 dias), 96 horas (4 dias) e 144 horas (6 dias).

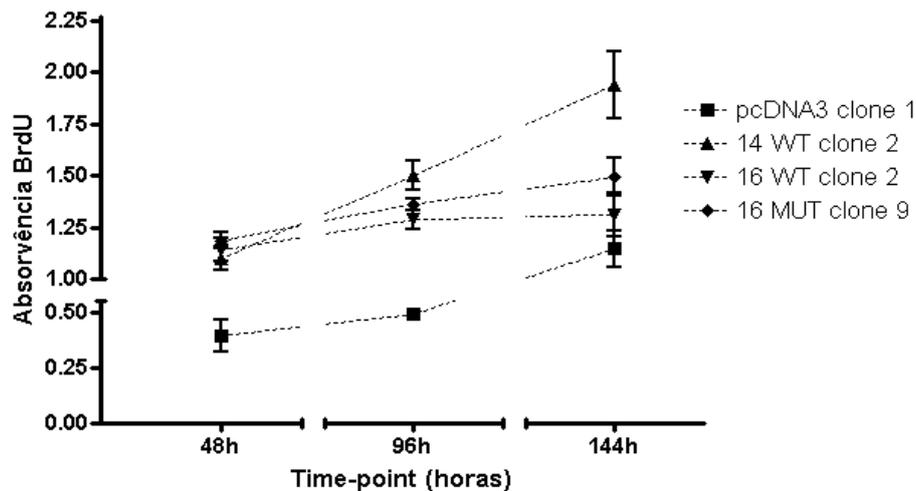


Figura 25 – Efeito da variante p.A248G no gene *FOXE1* na proliferação celular. Ensaio de proliferação celular dos clones pcDNA3 #1, 14WT #2, 16 WT #2 e 16 MUT #9, por incorporação de BrdU, nos *time-points* 48 horas, 96 horas e 144 horas. As barras de erro indicam o desvio padrão. Valores correspondentes à média de 3 replicados de um ensaio.

O ensaio com BrdU demonstrou uma maior síntese de DNA nas células do clone 14 WT #2, comparativamente com o controlo (clone pcDNA3 #1) e os restantes clones, sugerindo uma vantagem proliferativa. O clone 16 MUT #9 apresentou uma capacidade proliferativa superior à do controlo e do clone 16 WT #2. Este ensaio apenas foi realizado uma vez (3 replicados), sendo estes dados insuficientes para análise estatística.

3.7. Ensaios de Viabilidade Celular

Para além da vantagem proliferativa, outra alteração que pode conduzir à transformação neoplásica é a resistência à morte celular programada (Hanahan & Weinberg, 2000). A radiação UV pode provocar danos no DNA, produzindo efeitos deletérios e conduzindo à apoptose da célula (Carvalho *et al.*, 2003). O ensaio com Violeta de Cristal permite obter informação quantitativa sobre a densidade relativa de células em adesão (viáveis).

Para este ensaio, plaquearam-se 2×10^5 células dos clones pcDNA3 #1, 14 WT #2, 16 WT #2 e 16 MUT #9, em placas de 24 poços, em meio F12-C suplementado (1% FBS), com 500 $\mu\text{g/mL}$ de geneticina. Para cada clone, uma placa foi irradiada com UV, 24h após plaqueamento, durante 1 minuto, e uma segunda placa (controlo) não foi irradiada. As células foram recolhidas 24h após irradiação e a viabilidade celular determinada (Figura 26).

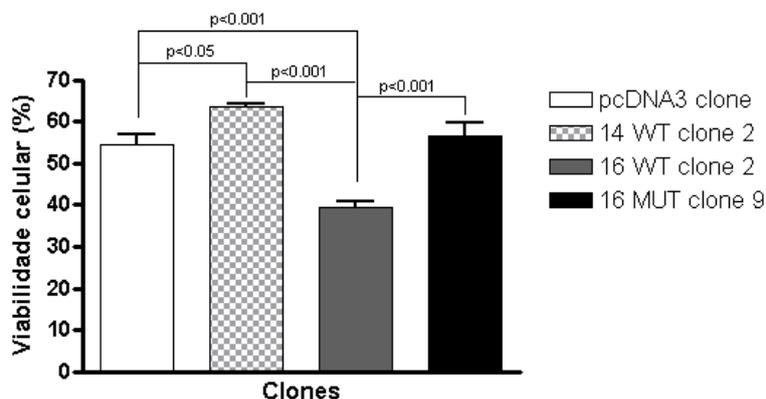


Figura 26 – Efeito da variante p.A248G no gene *FOXE1* na viabilidade celular. A viabilidade celular nos clones pcDNA3 #1, 14WT #2, 16 WT #2 e 16 MUT #9 foi determinada por ensaio de Violeta de Cristal. A viabilidade celular foi calculada através da razão entre a absorvência das células viáveis (em adesão), 24h após irradiação com UV, e a absorvência das células controlo (não irradiadas) (representada em percentagem). As barras de erro indicam o desvio padrão. Valores correspondentes à média de 6 replicados, em 3 ensaios independentes. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA e os valores de $P < 0.05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

O ensaio de viabilidade celular mostrou que, com 1 minuto de irradiação UV, a viabilidade das células do clone 16 MUT #9 e do clone pcDNA3 #1 diminuiu cerca de 50%, não se observando diferenças significativas na viabilidade celular entre estes dois clones.

A viabilidade das células do clone 14 WT #2 foi significativamente mais elevada do que as células do controlo (clone pcDNA3 #1, $P < 0.05$) e do clone 16 WT #2 ($P < 0.001$). O clone 16 WT #2 apresentou uma viabilidade significativamente mais baixa que a dos restantes clones ($P < 0.001$).

3.8. Ensaio de *Wound Healing*

A capacidade de migração possibilita às células deslocarem-se para locais onde o espaço não é limitante e onde há maior acessibilidade a nutrientes (Hanahan & Weinberg, 2000). Neste ensaio, estudou-se a capacidade de migração através da reparação de uma lesão realizada na monocamada de células (ensaio de *wound healing*).

Plaquearam-se 2×10^6 células dos clones pcDNA3 #1, 14 WT #2, 16 WT #2 e 16 MUT #9, em meio F12-C suplementado (1% FBS), com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de geneticina, em placas de 35 mm. A lesão na monocamada celular foi realizada 24h após o plaqueamento, com uma ponta de micropipeta. Fotografou-se uma região lesada nos *time-points* 0h, 3h, 6h, 9h, 24h, 27h, 30h e 54h (Figura 27).

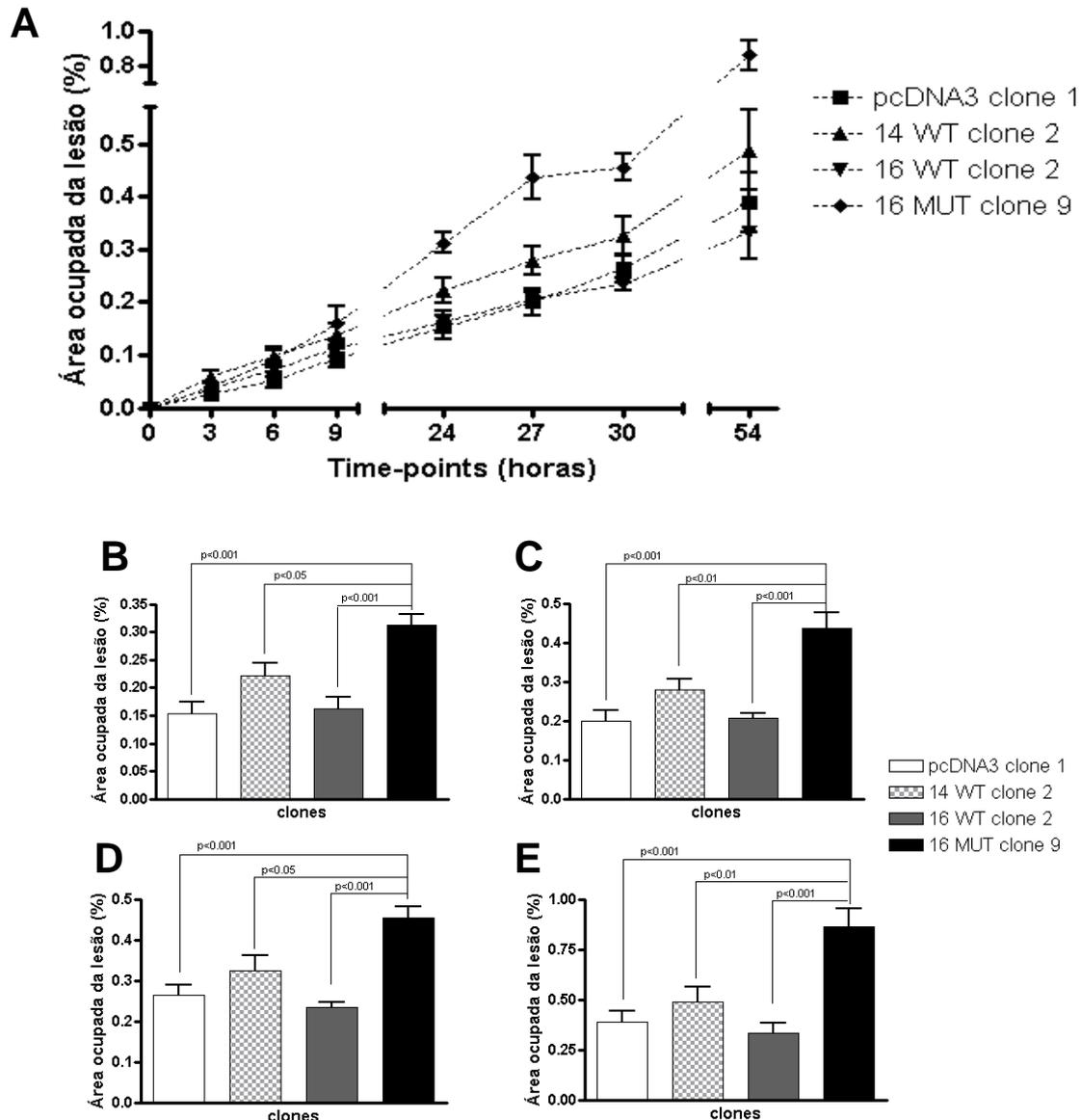


Figura 27 – Efeito da variante p.A248G no gene *FOXE1* na migração celular. **(A)** Quantificação da migração celular através de ensaio de *wound healing*. A área ocupada da lesão (%) nos clones pcDNA3 #1, 14WT #2, 16 WT #2 e 16 MUT #9 foi determinada nos *time-points* 0h, 3h, 6h, 9h, 24h, 27h, 30h e 54h. Área ocupada da lesão (%) nos 4 clones nos *time-points* 24h **(B)**, 27h **(C)**, 30h **(D)** e 54h **(E)**. A área ocupada da lesão foi calculada através da razão entre a área em cada *time-point* e a área inicial (percentagem). As áreas foram determinadas utilizando o *software* ImageJ. As barras de erro indicam o desvio padrão. Valores correspondentes à média de 7 replicados, em 3 ensaios independentes. Os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA e os valores de $P < 0.05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

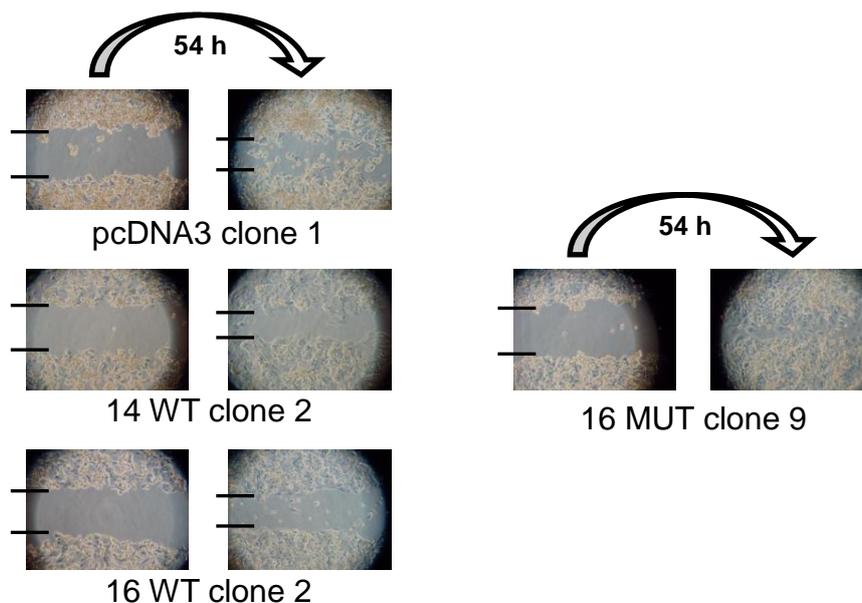


Figura 28 – Migração celular (*in vitro*) dos clones pcDNA3 #1, 14WT #2, 16 WT #2 e 16 MUT #9 após a realização da lesão (tempo 0) e às 54h (formação da monocamada no clone 16 MUT #9). Amplificação de 100x.

O clone 16 MUT #9 apresentou um restabelecimento da monocamada de células às 54 horas (Figura 28). No ensaio de *wound healing*, nos *time-points* 24h, 27h, 30h e 54h, apenas o clone 16 MUT #9 apresentou uma capacidade de reparação da região lesada e restabelecimento da monocamada de células significativamente mais elevada que os restantes clones [pcDNA #1 ($P < 0.001$, para os 4 *time-points*) e 16 WT #2 ($P < 0.001$, para os 4 *time-points*) e 14 WT #2 ($P < 0.05$ para os *time-points* 24h e 30h, $P < 0.01$ para os *time-points* 27h e 54h)].

Estes resultados sugerem que a variante p.A248G no gene *FOXE1* poderá promover a migração celular.

3.9. Estudo do nível de expressão do gene *FOXE1* nas *pools* e clones com expressão estável de construções derivadas do plasmídeo pcDNA3

A expressão do gene *FOXE1* nas *pools* e clones 14 WT, 16 WT e 16 MUT foi analisada através de qRT-PCR. Os níveis de expressão relativos do gene *FOXE1* humano nas diferentes células foram normalizados em relação aos níveis de expressão de um controlo endógeno (β -actina) e à expressão do clone 14WT #3 (calibrador).

O clone 14 WT #2, utilizado nos estudos funcionais descritos nas secções anteriores, apresentou uma expressão do gene *FOXE1* muito superior à dos restantes clones (Figura 29). Nos clones analisados nos estudos funcionais, a expressão do

clone 14 WT #2 foi cerca de 36 vezes superior à do clone 16 WT #2 e cerca de 4 vezes superior à do clone 16 MUT #9.

O clone 14 WT #2 apresentou ainda uma expressão de *FOXE1* muito superior ao da *pool* de células 14 WT. O mesmo foi observado para o clone 16 MUT #9, que apresentou uma expressão de *FOXE1* cerca de 7 vezes superior à expressão da *pool* de células 16 MUT.

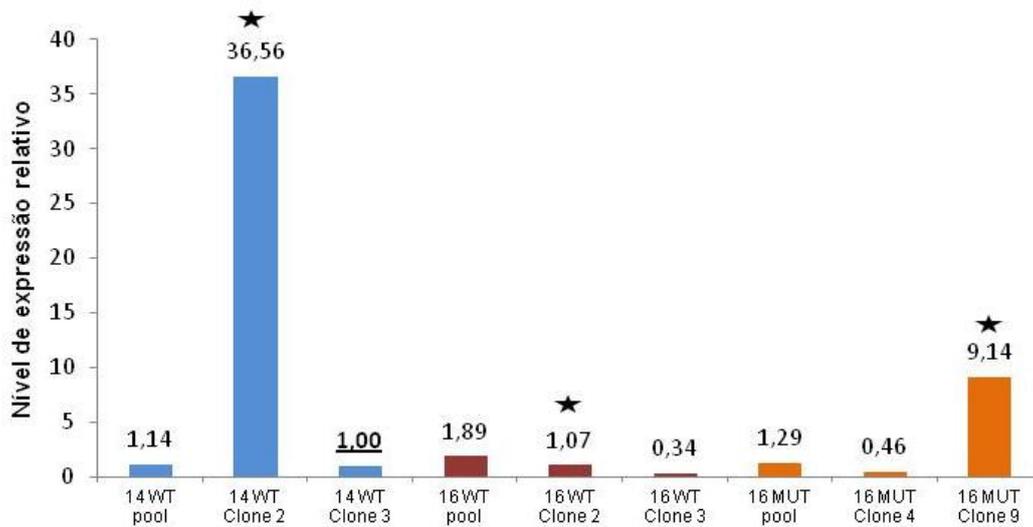


Figura 29 – Níveis de expressão relativos do gene *FOXE1* humano em *pools* e clones com expressão estável de diferentes plasmídeos, contendo o gene *FOXE1* humano. Os níveis de expressão foram determinados por qRT-PCR e normalizados em relação aos níveis de expressão de um controlo endógeno (β -actina) e à expressão do clone 14WT #3 (calibrador). Valores correspondentes à média dos triplicados. * Clones utilizados nos estudos funcionais.

V. DISCUSSÃO

Os carcinomas da tiróide são as neoplasias mais comuns do sistema endócrino, representando 1-3% de todos os casos de cancro (DeLellis *et al.*, 2004). Os mais frequentes têm origem nas células foliculares, sendo designados por NMTC. As formas familiares de NMTC (FNMTC) representam 3-7% de todos os casos de NMTC (Grossman *et al.*, 1995; Loh, 1997; Canzian *et al.*, 1998; Hemminki *et al.*, 2000; Maxwell *et al.*, 2004; Malchoff & Malchoff, 2006; Nose, 2008; Bonora *et al.*, 2010).

Por análise de *linkage*, abrangendo todo o genoma, identificaram-se várias regiões de susceptibilidade para FNMTC (1p13.2-q21, 1q21, 2q21, 6q22, 8p23.1-p22, 8q24, 14q31, 19p13.2), sendo a hereditariedade, na maioria das famílias, autossómica dominante, com penetrância incompleta (Loh, 1997; Canzian *et al.*, 1998; DeLellis *et al.*, 2004; Sturgeon & Clark, 2005; Malchoff & Malchoff, 2006; Nose, 2008; Moses *et al.*, 2011). O envolvimento de distintas regiões cromossómicas sugere a existência de heterogeneidade genética para o FNMTC. No entanto, ainda não foram identificados os genes responsáveis (DeLellis *et al.*, 2004; Malchoff & Malchoff, 2006; Moses *et al.*, 2011).

Alguns dos genes candidatos para a disgénese da tiróide são factores de transcrição expressos durante a fase inicial da formação, migração e diferenciação da tiróide (Pasca di Magliano *et al.*, 2000; Al Taji *et al.*, 2007). O estudo de ratinhos *knock-out* para os factores de transcrição NKX2-1, FOXE1, HHEX e PAX8 revelou um papel crítico destes genes na organogénese e manutenção da arquitectura normal e função da tiróide diferenciada (Hanahan & Weinberg, 2000; Puppini *et al.*, 2004; Al Taji *et al.*, 2007).

Genes que codificam factores de transcrição envolvidos na diferenciação celular durante a embriogénese podem, se desregulados, contribuir para a tumorigénese (Hanahan & Weinberg, 2000; Puppini *et al.*, 2004). Este envolvimento foi já observado para vários genes da família PAX, FOX e NKX-2, em diferentes tipos de cancro (Muratovska *et al.*, 2003; Myatt & Lam, 2007).

Recentemente, dois grupos de investigação independentes identificaram uma associação entre polimorfismos dos *loci* NKX2-1 e FOXE1 e a susceptibilidade para o cancro da tiróide esporádico (Gudmundsson *et al.*, 2009; Landa *et al.*, 2009). O estudo de um candidato funcional – o gene NKX2-1 – conduziu à recente identificação de uma mutação germinal em duas famílias com FNMTC, constituindo a primeira evidência da associação entre este factor de transcrição e a susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar (Ngan *et al.*, 2009).

O estudo directo de genes candidatos constitui uma abordagem alternativa ao mapeamento genético, para a identificação de genes que conferem susceptibilidade para o FNMTTC.

Tendo em conta as evidências atrás descritas, neste trabalho realizou-se uma extensa pesquisa de variantes genéticas nos genes que codificam os factores de transcrição NKX2-1, FOXE1, HHEX e PAX8, através da sequenciação do DNA constitucional dos probandos de 60 famílias com FNMTTC, uma das séries de famílias mais numerosas a nível mundial. Num total de 144 membros afectados com NMTC, os tumores mais frequentes foram os PTC.

As famílias consideradas para este estudo apresentavam dois ou mais indivíduos afectados com cancro da tiróide. No caso da família 17, o probando apresentava um FTC, de variante oncocítica, e MNG, com transformação oncocítica e o irmão deste probando apresentava um FTA, de variante oncocítica e nódulo hiperplásico. Apesar de não obedecer completamente aos critérios, esta família foi considerada neste estudo, devido à presença de nódulos hiperplásicos em ambos os indivíduos e à idade de aparecimento relativamente precoce em indivíduos do sexo masculino (31 anos no probando e 28 anos no seu irmão).

Neste estudo, foram identificadas 15 variantes genéticas nos genes *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8*, que incluíam 10 polimorfismos e 5 variantes raras.

Nas 60 famílias em estudo não foi detectada a mutação germinal p.A339V no gene *NKX2-1*, descrita por Ngan e colaboradores (Ngan *et al.*, 2009). Não foram igualmente detectadas variantes genéticas nas restantes sequências codificantes e de *splicing* do gene *NKX2-1*, sugerindo que alterações neste gene são pouco frequentes em FNMTTC.

Nas famílias 25 e 25A foi identificada uma nova variante (c.743C>G, p.A248G) no gene *FOXE1*. Esta variante não se encontrava descrita nas bases de dados ENSEMBL, NCBI ou HapMap e não estava presente em 80 controlos normais da população Portuguesa, indicando que não se trata de um polimorfismo comum na população. De acordo com o *software* SIFT, o codão 248 foi conservado ao longo da evolução, sugerindo que esta variante poderá ser patogénica.

Na família 25, a variante segregava com cancro da tiróide, em 3 indivíduos afectados, dois dos quais com tumores agressivos, apresentando metástases ganglionares, e estava ainda presente num familiar com carcinoma do ovário. Na

família 25A, a variante foi detectada no probando, que manifestou um carcinoma da tiróide (PTC clássico) precocemente (24 anos), e no pai deste, que era assintomático.

Através de estudos de segregação verificou-se que os probandos das famílias 25 e 25A partilhavam o mesmo haplotipo para 10 dos 16 marcadores polimórficos estudados no *locus FOXE1*. O estudo realizado pelo grupo de Endocrinologia Molecular, de uma série de 80 controlos normais da população Portuguesa e 140 casos com NMTC familiares e esporádicos (que não fez parte da presente dissertação), mostrou que 9 dos 10 polimorfismos partilhados pelos dois probandos (localizadas entre o rs965513 e o rs3021526, inclusive), se encontravam em *linkage disequilibrium*, fazendo parte de um haplotipo comum na população Portuguesa. Futuramente, será necessário investigar qual a frequência do alelo 217 do marcador D9S180 na população Portuguesa, para determinar se este marcador também se encontra em *linkage disequilibrium* com os restantes 9 polimorfismos e qual a probabilidade de um indivíduo herdar o haplotipo que segrega com a variante c.743C>G (p.A248G) nas duas famílias. Esta análise poderá indicar se é mais provável a variante p.A248G ser fundadora ou ter surgido independentemente nas famílias 25 e 25A associada a um haplotipo comum na população.

Para averiguar o papel da variante p.A248G na tumorigénese na tiróide desenvolveram-se estudos funcionais, usando como modelo células PCCL3 com expressão estável dos seguintes plasmídeos: pcDNA3 sem o gene *FOXE1* (pcDNA3), pcDNA3-*FOXE1*-14Ala (14 WT), pcDNA3-*FOXE1*-16Ala (16 WT) e pcDNA3-*FOXE1*-16Ala-A248G (16 MUT). As células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3 vazio foram utilizadas como controlo nos ensaios de proliferação, viabilidade e migração celular.

No ensaio de proliferação celular, os clones 14 WT e 16 MUT apresentaram proliferação celular mais elevada do que os clones pcDNA3 e 16 WT, mas apenas o clone 14 WT apresentou diferenças estatisticamente significativas, em relação ao controlo (pcDNA3) [96h ($P < 0.01$) e 144h ($P < 0.001$)]. A ausência de significado estatístico para as diferenças observadas às 144 horas, entre o clone 16 MUT e o controlo (pcDNA3) poderão ter resultado do menor número de replicados analisados para o clone 16 MUT. Novos ensaios poderão esclarecer se o clone 16 MUT apresenta vantagem proliferativa.

Nos ensaios de viabilidade celular, o clone 16 MUT e o clone pcDNA3 apresentaram resultados análogos (cerca de 50% de células viáveis, 24h após irradiação). O clone 14 WT apresentou cerca de 64% de células viáveis, ou seja, maior resistência à apoptose, em relação ao controlo ($P < 0.05$) e ao clone 16 WT ($P < 0.001$).

A análise por RT-PCR quantitativo de todos os clones isolados, revelou que estes apresentavam diferentes níveis de expressão do gene *FOXE1*. Os diferentes níveis de expressão génica observados poderão ter resultado da diferente integração do plasmídeo no genoma, da integração de mais do que uma cópia, ou ainda de diferentes níveis de metilação ou acetilação do promotor CMV (Busslinger *et al.*, 1983; Watt & Molloy, 1988; Qu & Ehrlich, 1999).

Deste modo, a maior capacidade proliferativa, apresentada pelos clones 14 WT e 16 MUT, poderá estar relacionada com os elevados níveis de expressão do gene *FOXE1* nestes clones. De acordo com esta hipótese, Landa e colaboradores (Landa *et al.*, 2009), encontraram uma associação entre o risco para o cancro da tiróide esporádico e o alelo A do polimorfismo rs1867277 do promotor do gene *FOXE1*, que aumentava a actividade transcripcional deste gene, e sugeriram que o aumento de expressão deste factor de transcrição poderia predispor para a tumorigénese.

Estudos adicionais de proliferação, viabilidade e migração celular, utilizando *pools* e novos clones com níveis de expressão comparáveis do gene *FOXE1*, poderão esclarecer qual o papel da variante p.A248G. Para complementar estes ensaios, será ainda necessária a análise da expressão da proteína FOXE1 nos clones e *pools* estabelecidos no presente estudo.

Nos ensaios funcionais, observou-se que o clone 16 WT apresentou uma menor proliferação, viabilidade e migração celular, comparativamente com os restantes clones. Este resultado não correspondeu ao esperado, uma vez que o seu nível de expressão era semelhante ao do calibrador e que o alelo 16-A1a parece estar envolvido numa predisposição para o cancro da tiróide (Kallel *et al.*, 2010). A menor capacidade proliferativa, menor viabilidade e menor migração celular poderá estar relacionada com um problema na integração do plasmídeo no genoma, que terá afectado a resistência à geneticina ou afectado a função de alguma proteína importante nestes processos.

Neste trabalho foi interessante observar que o clone 16 MUT, apesar de apresentar uma expressão de *FOXE1* inferior à do clone 14WT, exibiu, no ensaio de *wound healing*, uma capacidade de restabelecimento da monocamada de células significativamente mais elevada do que a dos restantes clones. Como já foi referido anteriormente, o factor de transcrição FOXE1 tem um papel crucial no controlo da migração das células precursoras da tiróide folicular, durante a embriogénese. Os presentes resultados sugerem que a variante p.A248G poderá ter um papel relevante na promoção da migração celular, em células tumorais da tiróide. De acordo com esta hipótese, estudos anteriores mostraram que a família de factores de transcrição FOX (incluindo o FOXE1) participam na indução da sobre-expressão da proteína WNT5A,

por diferentes vias de sinalização (NF-kappaB, Hedgehog, TGF β e Notch) (Katoh & Katoh, 2009). A proteína WNT5A pode exercer funções de supressão tumoral, antagonizando a via WNT/ β -catenina, em diferentes tipos de tumores, incluindo na tiróide, cérebro, mama e cólon e recto (Li *et al.*, 2010). Num estudo realizado em carcinomas da tiróide, a análise por imunohistoquímica mostrou que a expressão da WNT5A era quase indetectável em tecido normal e carcinomas anaplásicos, mas que esta era fortemente expressa em tumores bem diferenciados (Kremenevskaja *et al.*, 2005). No mesmo estudo, observou-se que a sobre-expressão da WNT5A, numa linha celular de tumor bem diferenciado da tiróide (FTC-133), reduzia a proliferação, migração, invasão e formação de clones (Kremenevskaja *et al.*, 2005). Tendo em consideração estas evidências, é possível que a variante p.A248G, detectada no presente estudo, esteja relacionada com um aumento da migração celular, por interferir na actividade reguladora do FOXE1 na expressão da WNT5A. A análise do efeito do silenciamento (com RNA de interferência) do gene *WNT5A*, em *pools* e clones 16 MUT, nomeadamente na migração celular, poderá esclarecer se a WNT5A está envolvida nos efeitos funcionais observados para a variante p.A248G.

É ainda importante observar que a variante c.743C>G (p.A248G), detectada nas famílias 25 e 25A, é transmitida num haplotipo que inclui o alelo A do polimorfismo rs965513 (G/A) e o alelo A do polimorfismo rs1867277 (G/A), ambos associados ao risco para o cancro da tiróide esporádico, sugerindo um possível efeito aditivo entre estes polimorfismos e a variante rara.

Um outro aspecto que deverá ser investigado em futuros estudos é o efeito da variante p.A248G na diferenciação das células normais e tumorais da tiróide. Está bem estabelecido que o gene *FOXE1* está envolvido na regulação da expressão dos genes *TG* e *TPO*, durante a embriogénese e no adulto (Zannini *et al.*, 1997; Perrone *et al.*, 2000; Cuesta *et al.*, 2007). Será, por esta razão, importante avaliar por RT-PCR quantitativo a expressão dos genes *TG* e *TPO* nos clones e *pools* descritos, e nos tumores dos doentes das famílias 25 e/ou 25A. Estudos de transactivação dos promotores dos genes *TG* e *TPO* pelos plasmídeos pcDNA3 (controlo), 14WT, 16WT e 16 MUT, em células PCCL3 e em modelos celulares sem expressão endógena de *FOXE1* (por exemplo, células HeLa), poderão também contribuir para a melhor compreensão do papel desta variante.

Alguns estudos sugerem que no processo de desdiferenciação na tiróide (carcinomas bem diferenciados \rightarrow pouco diferenciados \rightarrow indiferenciados) ocorre uma diminuição da expressão de *FOXE1* (Sequeira *et al.*, 2001; Nonaka *et al.*, 2008). No presente estudo, observou-se que a variante p.A248G poderá estar envolvida na génese dos tumores bem diferenciados da tiróide identificados nos doentes das

famílias 25 e 25A. É possível que a presença desta variante contribua para a ocorrência de mutações somáticas no gene *BRAF* e/ou rearranjos *RET/PTC*, frequentemente encontradas em casos esporádicos e familiares de NMTC (DeLellis *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005; Sobrinho-Simões *et al.*, 2005; Cavaco *et al.*, 2008a), e que, em conjunto, promovam a tumorigénese. Será importante a pesquisa destas alterações somáticas nos tumores das famílias 25 e 25A. Outros eventos moleculares, por exemplo, mutações no gene *TP53*, metilação de promotores e/ou desacetilação de histonas, poderão estar envolvidos no processo de desdiferenciação e no silenciamento do gene *FOXE1*, observado por outros autores.

O gene *FOXE1* não está apenas envolvido na carcinogénese na tiróide. Em carcinomas pancreáticos (Sato *et al.*, 2003), em cancro da mama (Weisenberger *et al.*, 2008) e em carcinoma cutâneo de células escamosas (Venza *et al.*, 2010) observou-se que o promotor do gene *FOXE1* apresentava hipermetilação. Por outro lado foi detectada sobre-expressão do gene *FOXE1* em carcinoma basocelular (Eichberger *et al.*, 2004). Um outro estudo mostrou que a proteína FOXE1 com 16 resíduos de alaninas estava associada a insuficiência ovárica prematura (Watkins *et al.*, 2006). Dadas estas evidências, é interessante observar que, na família 25, dois dos portadores da variante p.A248G apresentavam, respectivamente, carcinoma basocelular e carcinoma do ovário. Novos estudos serão necessários para uma melhor compreensão do papel do gene *FOXE1* na tumorigénese.

A sequenciação do gene *HHEX* permitiu detectar uma nova variante (c.361G>A, p.G121S), no probando da família 55, que não está descrita nas bases de dados ENSEMBL, NCBI ou HapMap. Está em curso o estudo de 50 controlos normais, para investigar a frequência da variante p.G121S na população Portuguesa. De acordo com o *software* Polyphen, o resíduo de glicina no codão 121 foi conservado ao longo da evolução, sugerindo que a variante p.G121S seja “possivelmente patogénica”.

A transição c.361G>A no gene *HHEX* afecta a última base do exão 1 do gene *HHEX*. Estudos *in silico*, utilizando *softwares* de previsão de sítios de *splicing*, previram alteração (abolição) do *donor splice site*. Será necessário investigar com estudos *in vitro*, se esta alteração afecta o *splicing site*, levando a um *frameshift* e terminação prematura da proteína, através da análise da expressão do gene *HHEX* por RT-PCR.

A variante no gene *HHEX* está presente no probando da família 55 e na irmã, ambas com PTC clássico, sendo um deles multifocal. Será importante o estudo da segregação da variante nos restantes familiares relacionados em primeiro grau, nomeadamente no pai do probando, que apresentava um carcinoma do estômago. Se

a variante no gene *HHEX* também estiver presente neste doente, será interessante estudar o seu efeito na via de sinalização WNT/TCF. Estudos anteriores mostraram que a via WNT/TCF pode contribuir para o desenvolvimento de adenocarcinomas gástricos e que o *HHEX* está envolvido na modulação da actividade desta via de sinalização (Clements *et al.*, 2002; Marfil *et al.*, 2010).

No gene *PAX8*, foram detectadas duas variantes genéticas, uma na região 5'US e outra numa região intrónica do gene. No entanto, foram apenas sequenciados quatro dos doze exões, que codificam o *paired domain* deste factor de transcrição. No seguimento do presente trabalho, serão estudados os restantes exões do gene *PAX8*, que codificam o domínio octapéptido e o homeodomínio.

A continuação do estudo dos factores de transcrição *NKX2-1*, *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8* em FNMTTC será crucial para definir o seu papel na carcinogénese na tiróide. A identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTTC permitirá identificar precocemente os portadores de mutação, diminuindo a morbilidade e a mortalidade associada a esta doença, e excluir não-portadores dos programas de seguimento clínico.

O estudo dos genes *NKX2-1*, *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8* em tumores de casos esporádicos de NMTC, permitirá ainda esclarecer se estes genes estão envolvidos a nível somático na carcinogénese da tiróide.

Estudos futuros, utilizando a nova tecnologia de sequenciação das regiões codificantes do genoma (*whole exome sequencing*), serão cruciais para compreender o papel dos genes envolvidos na diferenciação da tiróide na etiologia das formas familiares de cancro da tiróide. Estes estudos poderão ainda levar à identificação de novos genes de susceptibilidade para esta doença.

VI. CONCLUSÃO

No presente trabalho, procedeu-se à pesquisa de variantes genéticas nos genes que codificam os factores de transcrição NKX2-1, FOXE1, HHEX e PAX8, através da sequenciação do DNA constitucional dos probandos de 60 famílias com FNMTc.

Na série estudada, foram identificadas 15 variantes genéticas, nos genes *FOXE1*, *HHEX* e *PAX8*, das quais 5 eram variantes raras, ainda não descritas na literatura ou em bases de dados de variantes genéticas. No gene *NKX2-1* não foram identificadas variantes genéticas.

Foi identificada uma nova variante genética (c.743C>G, p.A248G) no gene *FOXE1*, possivelmente fundadora. Nas duas famílias em que foi identificada, a variante c.743C>G segregava com a doença e afectava resíduos de aminoácidos conservados na evolução. Estudos *in vitro* sugeriram que esta variante poderá contribuir para a tumorigénese na tiróide, promovendo a proliferação e a migração celular, em clones de células PCCL3.

Foi também identificada uma nova variante genética no gene *HHEX* (c.361G>A, p.G121S). Estudos *in silico* desta variante, previram a alteração (abolição) de um *donor splice site*, que poderá conduzir a uma alteração do mecanismo de *splicing* do gene. Serão necessários estudos de expressão e estudos funcionais para averiguar o efeito desta variante.

A identificação destas duas variantes poderá constituir a primeira evidência do envolvimento dos factores de transcrição FOXE1 e HHEX na susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar.

A identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTc possibilitará a detecção precoce dos portadores da mutação, diminuindo a morbidade e a mortalidade associada a esta doença. Poderá ainda contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o combate a esta doença.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Adjadj E, Schlumberger M, de Vathaire F (2009) Germ-line DNA polymorphisms and susceptibility to differentiated thyroid cancer. *Lancet Oncol* **10**: 181-90
- Al Taji E, Biebermann H, Limanova Z, Hnikova O, Zikmund J, Dame C, Gruters A, Lebl J, Krude H (2007) Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* **156**: 521-9
- Altmann A, Schulz RB, Glensch G, Eskerski H, Zitzmann S, Eisenhut M, Haberkorn U (2005) Effects of Pax8 and TTF-1 thyroid transcription factor gene transfer in hepatoma cells: imaging of functional protein-protein interaction and iodide uptake. *J Nucl Med* **46**: 831-9
- Biersack HJ, Grünwald, F. (2005) *Thyroid Cancer*, 2nd edn. NY, USA: Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Bignell GR, Canzian F, Shayeghi M, Stark M, Shugart YY, Biggs P, Mangion J, Hamoudi R, Rosenblatt J, Buu P, Sun S, Stoffer SS, Goldgar DE, Romeo G, Houlston RS, Narod SA, Stratton MR, Foulkes WD (1997) Familial nontoxic multinodular thyroid goiter locus maps to chromosome 14q but does not account for familial nonmedullary thyroid cancer. *Am J Hum Genet* **61**: 1123-30
- Bonora E, Tallini G, Romeo G (2010) Genetic Predisposition to Familial Nonmedullary Thyroid Cancer: An Update of Molecular Findings and State-of-the-Art Studies. *J Oncol* **2010**: 385206
- Busslinger M, Hurst J, Flavell RA (1983) DNA methylation and the regulation of globin gene expression. *Cell* **34**: 197-206
- Canzian F, Amati P, Harach HR, Kraimps JL, Lesueur F, Barbier J, Levillain P, Romeo G, Bonneau D (1998) A gene predisposing to familial thyroid tumors with cell oxyphilia maps to chromosome 19p13.2. *Am J Hum Genet* **63**: 1743-8
- Capezone M, Marchisotta S, Cantara S, Busonero G, Brilli L, Pazaitou-Panayiotou K, Carli AF, Caruso G, Toti P, Capitani S, Pammolli A, Pacini F (2008) Familial non-medullary thyroid carcinoma displays the features of clinical anticipation suggestive of a distinct biological entity. *Endocr Relat Cancer* **15**: 1075-81
- Carre A, Castanet M, Sura-Trueba S, Szinnai G, Van Vliet G, Trochet D, Amiel J, Leger J, Czernichow P, Scotet V, Polak M (2007) Polymorphic length of FOXE1 alanine stretch: evidence for genetic susceptibility to thyroid dysgenesis. *Hum Genet* **122**: 467-76
- Carre A, Szinnai G, Castanet M, Sura-Trueba S, Tron E, Broutin-L'Hermite I, Barat P, Goizet C, Lacombe D, Moutard ML, Raybaud C, Raynaud-Ravni C, Romana S, Ythier H, Leger J, Polak M (2009) Five new TTF1/NKX2-1 mutations in brain-lung-thyroid syndrome: rescue by PAX8 synergism in one case. *Hum Mol Genet* **18**: 2266-76
- Carvalho H, da Costa RM, Chigancas V, Weinlich R, Brumatti G, Amarante-Mendes GP, Sarasin A, Menck CF (2003) Effect of cell confluence on ultraviolet light apoptotic responses in DNA repair deficient cells. *Mutat Res* **544**: 159-66
- Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simoes M (2006) PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 213-20
- Cavaco BM, Batista PF, Martins C, Banito A, do Rosario F, Limbert E, Sobrinho LG, Leite V (2008a) Familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTc): analysis of fPTC/PRN, NMTC1, MNG1 and TCO susceptibility loci and identification of somatic BRAF and RAS mutations. *Endocr Relat Cancer* **15**: 207-15
- Cavaco BM, Batista PF, Sobrinho LG, Leite V (2008b) Mapping a new familial thyroid epithelial neoplasia susceptibility locus to chromosome 8p23.1-p22 by high-density single-nucleotide polymorphism genome-wide linkage analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **93**: 4426-30
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* **305**: 779-84
- Charkes ND (1998) On the prevalence of familial nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid* **8**: 857-8
- Charkes ND (2006) On the prevalence of familial nonmedullary thyroid cancer in multiply affected kindreds. *Thyroid* **16**: 181-6

- Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, Wentworth J, Philips J, Clifton-Bligh R, Robinson BG (2003) Detection of the PAX8-PPAR gamma fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 354-7
- Christophe-Hobertus C, Christophe D (1999) Two binding sites for thyroid transcription factor 1 (TTF-1) determine the activity of the bovine thyroglobulin gene upstream enhancer element. *Mol Cell Endocrinol* **149**: 79-84
- Civitareale D, Lonigro R, Sinclair AJ, Di Lauro R (1989) A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO J* **8**: 2537-42
- Clark DP, Faquin, W.C. (2010) *Thyroid Cytopathology*. Vol. 8, 2nd edn. NY, USA: Springer-Verlag
- Clements WM, Wang J, Sarnaik A, Kim OJ, MacDonald J, Fenoglio-Preiser C, Groden J, Lowy AM (2002) beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res* **62**: 3503-6
- Congdon T, Nguyen LQ, Nogueira CR, Habiby RL, Medeiros-Neto G, Kopp P (2001) A novel mutation (Q40P) in PAX8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 3962-7
- Cuesta I, Zaret KS, Santisteban P (2007) The forkhead factor FoxE1 binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure. *Mol Cell Biol* **27**: 7302-14
- D'Elia AV, Tell G, Russo D, Arturi F, Puglisi F, Manfioletti G, Gattei V, Mack DL, Cataldi P, Filetti S, Di Loreto C, Damante G (2002) Expression and localization of the homeodomain-containing protein HEX in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 1376-83
- Damante G, Di Lauro R (1994) Thyroid-specific gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1218**: 255-66
- De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, Macchia PE, Mattei MG, Mariano A, Scholer H, Macchia V, Di Lauro R (1998) A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* **19**: 395-8
- DeLellis RA, Lloyd, R.V., Heitz, P.U., Eng, C. (2004) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon, França: IARC Press
- Di Palma T, Nitsch R, Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M (2003) The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem* **278**: 3395-402
- Eichberger T, Regl G, Ikram MS, Neill GW, Philpott MP, Aberger F, Frischauf AM (2004) FOXE1, a new transcriptional target of GLI2 is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol* **122**: 1180-7
- Fabbro D, Pellizzari L, Mercuri F, Tell G, Damante G (1998) Pax-8 protein levels regulate thyroglobulin gene expression. *J Mol Endocrinol* **21**: 347-54
- Farid NR (2004) *Molecular basis of thyroid cancer*. Vol. 122. Boston, USA: Kluwer Academic
- Francis-Lang H, Price M, Polycarpou-Schwarz M, Di Lauro R (1992) Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol Cell Biol* **12**: 576-88
- Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M, Vecchio G (1987) One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol Cell Biol* **7**: 3365-70
- Gray A, Doniach I (1969) Morphology of the nuclei of papillary carcinoma of the thyroid. *Br J Cancer* **23**: 49-51
- Grossman RF, Tu SH, Duh QY, Siperstein AE, Novosolov F, Clark OH (1995) Familial nonmedullary thyroid cancer. An emerging entity that warrants aggressive treatment. *Arch Surg* **130**: 892-7; discussion 898-9
- Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A, Bergthorsson JT, He H, Blondal T, Geller F, Jakobsdottir M, Magnusdottir DN, Matthiasdottir S, Stacey SN, Skarphedinsson OB, Helgadottir H, Li W, Nagy R, Aguillo E, Faure E, Prats E, Saez B, Martinez M, Eyjolfsson GI, Bjornsdottir US, Holm H, Kristjansson K, Frigge ML, Kristvinsson H, Gulcher JR, Jonsson T, Rafnar T, Hjartarsson H, Mayordomo JI, de la Chapelle A, Hrafnkelsson J, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K (2009) Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet* **41**: 460-4
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70

- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-74
- He H, Nagy R, Liyanarachchi S, Jiao H, Li W, Suster S, Kere J, de la Chapelle A (2009) A susceptibility locus for papillary thyroid carcinoma on chromosome 8q24. *Cancer Res* **69**: 625-31
- Hemminki K, Sundquist J, Lorenzo Bermejo J (2008) Familial risks for cancer as the basis for evidence-based clinical referral and counseling. *Oncologist* **13**: 239-47
- Hishinuma A, Ohyama Y, Kuribayashi T, Nagakubo N, Namatame T, Shibayama K, Arisaka O, Matsuura N, Ieiri T (2001) Polymorphism of the polyalanine tract of thyroid transcription factor-2 gene in patients with thyroid dysgenesis. *Eur J Endocrinol* **145**: 385-9
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **60**: 277-300
- Jones PA (1996) DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* **56**: 2463-7
- Kallel R, Belguith-Maalej S, Akdi A, Mnif M, Charfeddine I, Galofre P, Ghorbel A, Abid M, Marcos R, Ayadi H, Velazquez A, Hadj Kacem H (2010) Genetic investigation of FOXE1 polyalanine tract in thyroid diseases: new insight on the role of FOXE1 in thyroid carcinoma. *Cancer Biomark* **8**: 43-51
- Katoh M (2009) Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF-kappaB, Hedgehog, TGFbeta, and Notch signaling cascades. *Int J Mol Med* **23**: 763-9
- Kikkawa F, Gonzalez FJ, Kimura S (1990) Characterization of a thyroid-specific enhancer located 5.5 kilobase pairs upstream of the human thyroid peroxidase gene. *Mol Cell Biol* **10**: 6216-24
- Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ (1996) The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* **10**: 60-9
- Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 820-3
- Kondo T, Ezzat S, Asa SL (2006) Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* **6**: 292-306
- Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao AS, Schofl C, Andersson T, Brabant G (2005) Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene* **24**: 2144-54
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA (2000) PAX8-PPARGgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* **289**: 1357-60
- Krude H, Schutz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, Tonnie H, Weise D, Lafferty A, Schwarz S, DeFelice M, von Deimling A, van Landeghem F, DiLauro R, Gruters A (2002) Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest* **109**: 475-80
- Landa I, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Inglada-Perez L, Schiavi F, Leskela S, Pita G, Milne R, Maravall J, Ramos I, Andia V, Rodriguez-Poyo P, Jara-Albarran A, Meoro A, del Peso C, Arribas L, Iglesias P, Caballero J, Serrano J, Pico A, Pomares F, Gimenez G, Lopez-Mondejar P, Castello R, Merante-Boschin I, Pelizzo MR, Mauricio D, Opocher G, Rodriguez-Antona C, Gonzalez-Neira A, Matias-Guiu X, Santisteban P, Robledo M (2009) The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS Genet* **5**: e1000637
- Lazzaro D, Price M, de Felice M, Di Lauro R (1991) The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* **113**: 1093-104
- Li J, Ying J, Fan Y, Wu L, Ying Y, Chan AT, Srivastava G, Tao Q (2010) WNT5A antagonizes WNT/beta-catenin signaling and is frequently silenced by promoter CpG methylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther* **10**: 617-24
- Loh KC (1997) Familial nonmedullary thyroid carcinoma: a meta-review of case series. *Thyroid* **7**: 107-13
- Macchia PE, Mattei MG, Lapi P, Fenzi G, Di Lauro R (1999) Cloning, chromosomal localization and identification of polymorphisms in the human thyroid transcription factor 2 gene (TTF2). *Biochimie* **81**: 433-40
- Malchoff CD, Malchoff DM (2006) Familial nonmedullary thyroid carcinoma. *Cancer Control* **13**: 106-10
- Malchoff CD, Sarfarazi M, Tendler B, Forouhar F, Whalen G, Joshi V, Arnold A, Malchoff DM (2000) Papillary thyroid carcinoma associated with papillary renal neoplasia: genetic linkage analysis of a distinct heritable tumor syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 1758-64

- Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P (1998) Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* **19**: 87-90
- Marfil V, Moya M, Pierreux CE, Castell JV, Lemaigre FP, Real FX, Bort R (2010) Interaction between Hhex and SOX13 modulates Wnt/TCF activity. *J Biol Chem* **285**: 5726-37
- Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V (2002) Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 3947-52
- Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D, Kioussis D, Beddington RS (2000) The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* **127**: 2433-45
- Matsuse M, Takahashi M, Mitsutake N, Nishihara E, Hirokawa M, Kawaguchi T, Rogounovitch T, Saenko V, Bychkov A, Suzuki K, Matsuo K, Tajima K, Miyauchi A, Yamada R, Matsuda F, Yamashita S (2011) The FOXE1 and NKX2-1 loci are associated with susceptibility to papillary thyroid carcinoma in the Japanese population. *J Med Genet* **48**: 645-8
- Maxwell EL, Hall FT, Freeman JL (2004) Familial non-medullary thyroid cancer: a matched-case control study. *Laryngoscope* **114**: 2182-6
- McKay JD, Lesueur F, Jonard L, Pastore A, Williamson J, Hoffman L, Burgess J, Duffield A, Papotti M, Stark M, Sobol H, Maes B, Murat A, Kaariainen H, Bertholon-Gregoire M, Zini M, Rossing MA, Toubert ME, Bonichon F, Cavarec M, Bernard AM, Boneu A, Leprat F, Haas O, Lasset C, Schlumberger M, Canzian F, Goldgar DE, Romeo G (2001) Localization of a susceptibility gene for familial nonmedullary thyroid carcinoma to chromosome 2q21. *Am J Hum Genet* **69**: 440-6
- Miccadei S, De Leo R, Zammarchi E, Natali PG, Civitareale D (2002) The synergistic activity of thyroid transcription factor 1 and Pax 8 relies on the promoter/enhancer interplay. *Mol Endocrinol* **16**: 837-46
- Moses W, Weng J, Kebebew E (2011) Prevalence, clinicopathologic features, and somatic genetic mutation profile in familial versus sporadic nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid* **21**: 367-71
- Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Leite V (2011) High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* **96**: E863-8
- Muratovska A, Zhou C, He S, Goodyer P, Eccles MR (2003) Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene* **22**: 7989-97
- Muro-Cacho CA, Ku NN (2000a) Tumors of the thyroid gland: histologic and cytologic features--part 1. *Cancer Control* **7**: 276-87
- Muro-Cacho CA, Ku NN (2000b) Tumors of the thyroid gland: histologic and cytologic features--part 2. *Cancer Control* **7**: 377-85
- Myatt SS, Lam EW (2007) The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**: 847-59
- Ngan ES, Lang BH, Liu T, Shum CK, So MT, Lau DK, Leon TY, Cherny SS, Tsai SY, Lo CY, Khoo US, Tam PK, Garcia-Barcelo MM (2009) A germline mutation (A339V) in thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKX2-1) in patients with multinodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **101**: 162-75
- Nitsch R, Di Dato V, di Gennaro A, de Cristofaro T, Abbondante S, De Felice M, Zannini M, Di Lauro R (2010) Comparative genomics reveals a functional thyroid-specific element in the far upstream region of the PAX8 gene. *BMC Genomics* **11**: 306
- Nonaka D, Tang Y, Chiriboga L, Rivera M, Ghossein R (2008) Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms. *Mod Pathol* **21**: 192-200
- Nose V (2008) Familial non-medullary thyroid carcinoma: an update. *Endocr Pathol* **19**: 226-40
- Oguchi H, Kimura S (1998) Multiple transcripts encoded by the thyroid-specific enhancer-binding protein (T/EBP)/thyroid-specific transcription factor-1 (TTF-1) gene: evidence of autoregulation. *Endocrinology* **139**: 1999-2006
- Ozkara HA, Sandhoff K (2003) A new point mutation (G412 to A) at the last nucleotide of exon 3 of hexosaminidase alpha-subunit gene affects splicing. *Brain Dev* **25**: 203-6
- Park SM, Chatterjee VK (2005) Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet* **42**: 379-89
- Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, Mansouri A, Kimura S, Di Lauro R, De Felice M (2004) An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev Biol* **276**: 464-75
- Pasca di Magliano M, Di Lauro R, Zannini M (2000) Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13144-9

- Pellizzari L, D'Elia A, Rustighi A, Manfioletti G, Tell G, Damante G (2000) Expression and function of the homeodomain-containing protein Hex in thyroid cells. *Nucleic Acids Res* **28**: 2503-11
- Perrone L, Pasca di Magliano M, Zannini M, Di Lauro R (2000) The thyroid transcription factor 2 (TTF-2) is a promoter-specific DNA-binding independent transcriptional repressor. *Biochem Biophys Res Commun* **275**: 203-8
- Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss P (1990) Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* **110**: 643-51
- Placzkowski KA, Reddi HV, Grebe SK, Eberhardt NL, McIver B (2008) The Role of the PAX8/PPARgamma Fusion Oncogene in Thyroid Cancer. *PPAR Res* **2008**: 1-10
- Puppin C, D'Elia AV, Pellizzari L, Russo D, Arturi F, Presta I, Filetti S, Bogue CW, Denson LA, Damante G (2003) Thyroid-specific transcription factors control Hex promoter activity. *Nucleic Acids Res* **31**: 1845-52
- Puppin C, Presta I, D'Elia AV, Tell G, Arturi F, Russo D, Filetti S, Damante G (2004) Functional interaction among thyroid-specific transcription factors: Pax8 regulates the activity of Hex promoter. *Mol Cell Endocrinol* **214**: 117-25
- Qu GZ, Ehrlich M (1999) Demethylation and expression of methylated plasmid DNA stably transfected into HeLa cells. *Nucleic Acids Res* **27**: 2332-8
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-4
- Sambrook J, Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 1, 3rd edn. NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-7
- Santarpia L, Valenzise M, Di Pasquale G, Arrigo T, San Martino G, Ciccio MP, Trimarchi F, De Luca F, Benvenega S (2007) TTF-2/FOXE1 gene polymorphisms in Sicilian patients with permanent primary congenital hypothyroidism. *J Endocrinol Invest* **30**: 13-9
- Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M (2003) Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* **63**: 3735-42
- Schlumberger MJ (1998) Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med* **338**: 297-306
- Sequeira MJ, Morgan JM, Fuhrer D, Wheeler MH, Jasani B, Ludgate M (2001) Thyroid transcription factor-2 gene expression in benign and malignant thyroid lesions. *Thyroid* **11**: 995-1001
- Sinclair AJ, Lonigro R, Civitareale D, Ghibelli L, Di Lauro R (1990) The tissue-specific expression of the thyroglobulin gene requires interaction between thyroid-specific and ubiquitous factors. *Eur J Biochem* **193**: 311-8
- Sippel RS, Caron NR, Clark OH (2007) An evidence-based approach to familial nonmedullary thyroid cancer: screening, clinical management, and follow-up. *World J Surg* **31**: 924-33
- Sobrinho-Simoes M, Preto A, Rocha AS, Castro P, Maximo V, Fonseca E, Soares P (2005) Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas. *Virchows Arch* **447**: 787-93
- Sobrinho B, Brion M, Carracedo A (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int* **154**: 181-94
- Soufi A, Jayaraman PS (2008) PRH/Hex: an oligomeric transcription factor and multifunctional regulator of cell fate. *Biochem J* **412**: 399-413
- Strachan T, Read, A.P. (2004) *Human Molecular Genetics*, 3rd edn. NY, USA: Garland Science
- Sturgeon C, Clark OH (2005) Familial nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid* **15**: 588-93
- Suh I, Filetti S, Vriens MR, Guerrero MA, Tumino S, Wong M, Shen WT, Kebebew E, Duh QY, Clark OH (2009) Distinct loci on chromosome 1q21 and 6q22 predispose to familial nonmedullary thyroid cancer: a SNP array-based linkage analysis of 38 families. *Surgery* **146**: 1073-80
- Syvanen AC (2001) Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet* **2**: 930-42

- Szczepanek E, Ruchala M, Szaflarski W, Budny B, Kilinska L, Jaroniec M, Niedziela M, Zabel M, Sowinski J (2011) FOXE1 polyalanine tract length polymorphism in patients with thyroid hemiagenesis and subjects with normal thyroid. *Horm Res Paediatr* **75**: 329-34
- Takahashi M, Saenko VA, Rogounovitch TI, Kawaguchi T, Drozd VM, Takigawa-Imamura H, Akulevich NM, Ratanajaraya C, Mitsutake N, Takamura N, Danilova LI, Lushchik ML, Demidchik YE, Heath S, Yamada R, Lathrop M, Matsuda F, Yamashita S (2010) The FOXE1 locus is a major genetic determinant for radiation-related thyroid carcinoma in Chernobyl. *Hum Mol Genet* **19**: 2516-23
- Tanaka T, Inazu T, Yamada K, Myint Z, Keng VW, Inoue Y, Taniguchi N, Noguchi T (1999) cDNA cloning and expression of rat homeobox gene, Hex, and functional characterization of the protein. *Biochem J* **339** (Pt 1): 111-7
- The1000GenomesProjectConsortium (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* **467**: 1061-73
- Thomas PQ, Brown A, Beddington RS (1998) Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* **125**: 85-94
- Tonacchera M, Banco M, Lapi P, Di Cosmo C, Perri A, Montanelli L, Moschini L, Gatti G, Gandini D, Massei A, Agretti P, De Marco G, Vitti P, Chiovato L, Pinchera A (2004) Genetic analysis of TTF-2 gene in children with congenital hypothyroidism and cleft palate, congenital hypothyroidism, or isolated cleft palate. *Thyroid* **14**: 584-8
- Venza I, Visalli M, Tripodo B, De Grazia G, Loddo S, Teti D, Venza M (2009) FOXE1 is a target for aberrant methylation in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* **162**: 1093-7
- Venza I, Visalli M, Tripodo B, Lentini M, Teti D, Venza M (2010) Investigation into FOXE1 genetic variations in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* **162**: 681-3
- Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M, Malvaux P, Renneboog B, Parma J, Costagliola S, Vassart G (2001) Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 234-8
- Vineis P, Malats N, Boffetta P (1999) Why study metabolic susceptibility to cancer? *IARC Sci Publ*: 1-3
- Wang Y, Luo W, Reiser G (2008) Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. *Cell Mol Life Sci* **65**: 237-52
- Watkins WJ, Harris SE, Craven MJ, Vincent AL, Winship IM, Gersak K, Shelling AN (2006) An investigation into FOXE1 polyalanine tract length in premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* **12**: 145-9
- Watt F, Molloy PL (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* **2**: 1136-43
- Weinberg RA (1994) Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J Clin* **44**: 160-70
- Weisenberger DJ, Trinh BN, Campan M, Sharma S, Long TI, Ananthnarayan S, Liang G, Esteva FJ, Hortobagyi GN, McCormick F, Jones PA, Laird PW (2008) DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight. *Nucleic Acids Res* **36**: 4689-98
- Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, Arnone MI, Sato K, Pischetola M, Taylor BA, Phillips SJ, Simeone A, Di Lauro R (1997) TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J* **16**: 3185-97
- Zannini M, Francis-Lang H, Plachov D, Di Lauro R (1992) Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol Cell Biol* **12**: 4230-41

VIII. ANEXOS

Quadro I – Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do locus *NKX2-1*.

Locus <i>NKX2-1</i>	Nome do Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl₂ (mM)	Hibridação (°C)
Região	rs944289-F	CTGTTGGTTGTGACTCTCTGG	143	1,6	59
5' US	rs944289-R	GCCTGTGAATGGACATTAGATT			
Exão 1	NKX2-1-1F	CCTTCCCCCTCTCCCTTTT	380	1,4*	58
	NKX2-1-1R	GCTGTTCCCTCATGGTGCCT			
Exão 2	NKX2-1-2F	ACAAGAAAGTGGGCATGGAG	500	1,2*	58
	NKX2-1-2R	ACCAAGTGCCTGTTCTTGGAC			
Exão 3	NKX2-1-3F	GCCAATGGCGCGGAAAACA	504	1,2*	61
	NKX2-1-3R	TGCTGCGCGTGGCCTTGTA			
Exão 3	NKX2-1-4F	GAACCACCGCTACAAAATGAA	564	1,2*	61
	NKX2-1-4R	GTGGATGGTGGTCTGTGTGG			

5'US, 5' upstream sequence. * Adicionou-se DMSO 6% (v/v)

Quadro II – Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo de microssatélites do locus *FOXE1*.

Nome do Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl₂ (mM)	Hibridação (°C)
9S1786-F ^{FAM}	TGTCTTCAAGGTATTTGCACTC	196-214	1,2	60
D9S1786-R	CCATGTTGTGATAAATGTCAGG			
D9S1851-F ^{TET}	TGCTTGACTGTAGTAAACATTTTAC	143-159	1,2	60
D9S1851-R	AGTCCCGTTAGCATTTCTTG			
D9S971-F ^{TET}	CCGCCACTCCTAAGGATG	119	1,2	60
D9S971-R	CAGGTTGAACTATAAGCTCAC			
D9S180-F ^{TET}	CAGTGGTTTGAATCGAACC	220-230	1,2	60
D9S180-R	AGCTATTTTTGGGGGCTGAG			
D9S763-F ^{FAM}	CGCTGGCTCTGATACGAAG	367	1,2	61
D9S763-R	ACTCCAGCCTGGGTGACAG			
D9S272-F ^{FAM}	ACTGAACTCCAGCATGGG	149	1,2	60
D9S272-R	CTCTCCTACAGGGAAACCG			
D9S176-F ^{TET}	AGCTGGCTGTTGGAGAAA	129-147	1,2*	60
D9S176-R	TGACCAATGGCAGGGTAT			

FAM, 6-carboxi-fluoresceína; TET, tetracloro-6-carboxi-fluoresceína. * Adicionou-se DMSO 6% (v/v)

Quadro III – Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do *locus FOXE1*.

Locus FOXE1	Nome do Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl₂ (mM)	Hibridação (°C)
Região	rs965513-F	GGTAGCAGGCAGAGAATGTAGG			
5' US	rs965513-R	ACCCAGGCTCAGGTTATGTCT	159	1,2*	59
Promotor	Promotor-F	GTGGAGAGGACCAGCCTCA	527	1,6	60
	Promotor-R	CTTCTGCGGAGAGCTCAGG			
Exão 1	FOXE1-1F	CTGAGCTCTCCGAGAAGG	499	1,6*	61
	FOXE1-1R	GTC AAGCGCCAGTAGTTG			
Exão 1	FOXE1-2F	CCTCACACTCAACGACTGCTT	586	1,6*	60
	FOXE1-2R	AGCGGCAAAGATCGCACT			
Exão 1	FOXE1-3F	GCCAATGGCGCGGAAAACA	439	1,6*	58
	FOXE1-3R	CCTCTCTCCATTCTGTTCCG			
qRT-PCR	hFOXE1-F	GACCACGGTGGACTTCTAC	157	1,6*	58
	hFOXE1-R	GGACACGAACCGATCTATC			

5'US, 5' upstream sequence. * Adicionou-se DMSO 6% (v/v)

Quadro IV – Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do gene *HHEX*.

Gene HHEX	Nome do Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl₂ (mM)	Hibridação (°C)
Exão 1	HHEX-1F	GGAGCGCGGATAAATGTAG	540	1,5*	57
	HHEX-1R	CTTTTGCCACAGCCGTCTA			
Exão 2	HHEX-2F	CTCCTGGCCTACCTTTGTCAT	560	1,8**	59
	HHEX-2R	TACAACCATAACAGCCTTGC			
Exão 3	HHEX-3F	AGTGAGCAAAAAGCACAAAGTATG	549	1,2**	61
	HHEX-3R	GTTAATTGAGCAGTGCACCAAAA			

* O segmento 1 foi amplificado com o *kit* do *GC-Rich*. ** Adicionou-se DMSO 6% (v/v).

Quadro V – Sequências dos *primers* e condições de amplificação por PCR, utilizados no estudo do gene *PAX8*.

Gene PAX8	Nome do Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho do segmento (bp)	MgCl₂ (mM)	Hibridação (°C)
Exão 1	PAX8-1F	CTTGCAAATCCTCCCCTTC	286	1,2	58
	PAX8-1R	ACCCTCTCCTTTCTTCCATCC			
Exão 2	PAX8-2F	ACGATGCAGGTGTAAGGATG	471	1,2	58
	PAX8-2R	AACCCCTCTAACTCCACAGA			
Exão 3	PAX8-3F	ACACACACACCAGCACCTGTA	338	1,2	58
	PAX8-3R	GGAATTCTCTAGCTGCCCTGA			
Exão 4	PAX8-4F	CTCATACCCCTACCCAGAAGC	389	1,2	58
	PAX8-4R	CCAGGCCTTTCTGTCTCTTT			

Quadro VI – Fenótipos observados em 144 doentes de 60 famílias com FNMTc.

Família	Doentes com NMTC				
	Total	cPTC	fvPTC	Outros tipos de PTC	Outros tipos de NMTC
1	5	5			
2	4	2	2		
3	3	2	1		
4	4	3	1		
5	3	2	1		
6	4	3		1 mPTC	
7	3	1	1	1 mPTC	
8	3	3			
9	2	1	1		
10	3	2	1		
11	2			2 cPTC+fvPTC	
12	2	2			
13	2	1	1		
14	2	2			
15	2		1		1 FTC
16	2	2			
17	2				1 FTConc; 1 FTAonc
18	2	1	1		
19	2	1			1 FTConc
20	2	1	1		
21	2	2			
22	2	2			
23	2	2			
24	2	2			
25	3	2	1		
26	4	4			
27	2	2			
28	2	2			
29	2	2			
30	2	2			
31	2	1			1 FTC
32	2		1	1 mPTC	
33	2	1	1		
34	2				2 FTConc
35	2	2			
36	2	2			
37	2	1		1 mPTC	
38	2	1		1 mPTC	
39	2	2			
40	2	1			1 FTConc
41	2	2			
42	2	2			
43	3	1		1 mPTC; 1 tcPTC	
44	2	2			
45	3	2		1 mPTC	
46	2	1		1 fvPTConc	
47	2	1		1 PTConc	
48	2	1	1		
49	3	2	1		
50	2	2			
51	2	2			
52	3	2	1		
53	2	2			
54	2	2			
55	2	2			
56	2	2			
57	2	2			
58	3	3			
59	2	2			
60	4	4			
Total	144	106	18	12	8

PTC, Carcinoma Papilar da Tiróide; cPTC, PTC clássico; fvPTC, PTC variante folicular; mPTC, PTC misto; tcPTC, PTC variante de células altas; onc, variante oncocítica; FTA, Adenoma Folicular da Tiróide; FTC, Carcinoma Folicular da Tiróide.

*Caracterização molecular e funcional de variantes genéticas
em factores de transcrição da tiróide em formas familiares de cancro da tiróide*

(A)	ENSG00000178919_ENST0000037512	SPGPCR VFGLVPERPLSPDLGPAPSGPAGGSCAFASAGAPATTTGYQPAGC
(B)	ENSMUSG00000070990_ENSMUST0000	SPGPCR VFGLVPERPLSPDLGPAPSAAGGSCAFAAAAGAAGTGSFQPAVC
(C)	ENSRNOG00000023497_ENSRNOT0000	SPGPCR VFGLVPERPLSPDLGPAPSAAGGSCAFAAAAGAPGTGSFOPAVC
(D)	ENSSSCG00000005369_ENSSSCT0000	SPGPCR VFGLVPERPLSPDLGPSPSPGVPVGS CAFASAGASAATTGYQPTGC
(E)	ENSBTAG00000014760_ENSBTAT0000	SPGPCR VFGLVPERPLSPDLGPAPSGPAGGSCAFASAGGSAASTAYQPAGC

Figura I – Alinhamento de sequências próximas do codão 248 na proteína FOXE1 nas espécies *Homo sapiens sapiens* (A), *Mus musculus* (B), *Rattus norvegicus* (C), *Sus scrofa* (D) e *Bos taurus* (E), obtido com o software ClustalW2. O codão 248 está destacado com um retângulo vermelho.

0	QUERY:	... FGGPLYFPRTVNDYTHALLRHDP	GKPLLWSPFLQRPLHKRKGQVRFSN...
1	ref XP_587977.2	PREDICTED: similar to huprobox [Bos taurus]	... FGGPLYFPRTVNDYTHALLRHDP
2	dbj BAB29163.1	unnamed protein product [Mus musculus]	... FGGPLYFPRTVNDYTHALLRHDP
3	ref NP_077361.1	hematopoietically expressed homeobox [Rattus no...]	... FGGPLYFPRTVNDYTHALLRHDP
4	ref XP_001367281.1	PREDICTED: similar to huprobox [Monodelphis ...]	... AGPLYFPF-RTVNDYTHALLRHDP
5	ref NP_989420.1	homeodomain transcription factor [Xenopus tropi...]	... ANPLYPFS-RPVSEYTHALIRHDTL
6	ref NP_990583.1	probox protein [Gallus gallus] >gj 547657 sp Q0...	... LYSFP----RAVGDYTHALIRQDPL
7	ab AAD11792.1	homeobox protein [Oryctolagus cuniculus]	... -----GKPLLWSPFLQRPLHKRKGQVRFSN...
8	ref NP_571009.1	hematopoietically expressed homeobox [Danio rer...]	... -----RSVGDFAHALIRHDP
9	emb CAF94642.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	... IYPFHQHPRFVGEYAQSLLRHDP
10	ab ABD97279.1	Hex [Saccoglossus kowalevskii]	... YYPYS----RPDQHYSHSFLRHEAL
11	ref XP_781292.2	PREDICTED: similar to Hex [Strongylocentrotus p...]	... -----NDYPHSFLRVDHF
12	ref XP_001197103.1	PREDICTED: similar to Hex [Strongylocentrotu...]	... -----NDYPHSFLRVDHF
13	ref NP_001071730.1	transcription factor protein [Ciona intestin...]	... -----DYPNWFDRQPF
14	dbj BAC81689.1	homeodomain protein Hex [Ciona savignyi]	... -----HDYANWFDRQPF

Figura II – Alinhamento de sequências próximas do codão 121 na proteína HHEX em várias espécies, obtido com o software PolyPhen. O codão 121 está destacado com um retângulo vermelho.